

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL  
PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA**

**VALESKA PORTELA LIMA**

**IMPACTO DOS GENES *cag*-PAI (*cagA*, *cagE* e *virB11*) E  
*vacA* DO *Helicobacter pylori* NA PATOGÊNESE DE  
ADENOCARCINOMAS GÁSTRICOS.**

**FORTALEZA-CE  
2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL  
PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA**

**VALESKA PORTELA LIMA**

**IMPACTO DOS GENES *cag*-PAI (*cagA*, *cagE* e *virB11*) E  
*vacA* DO *Helicobacter pylori* NA PATOGÊNESE DE  
ADENOCARCINOMAS GÁSTRICOS.**

Dissertação submetida à  
Coordenação do Curso de Pós-  
Graduação em Microbiologia  
Médica da Universidade federal  
do Ceará como requisito parcial  
para obtenção do grau de  
Mestre em Microbiologia  
Médica.

Orientadora

Profa Dra Sílvia Helena Barem Rabenhorst

**FORTALEZA-CE  
2008**

VALESKA PORTELA LIMA

IMPACTO DOS GENES *cag*-PAI (*cagA*, *cagE* e *virB11*) E *vacA* DO *Helicobacter pylori* NA  
PATOGENESE DE ADENOCARCINOMAS GÁSTRICOS.

**Aprovada em: 27 de fevereiro de 2008.**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa Dra Sílvia Helena Barem Rabenhorst (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Profa Dra Rosely de Vasconcelos. Meissner  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

---

Profa Dra Márcia Valéria Pitombeira Ferreira  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

Profa Dra Cibele Barreto Mano de Carvalho  
Universidade Federal do Ceará - UFC

Á Deus, que foi minha fortaleza e a minha família, que me apoiaram e concederam forças nos momentos mais difíceis.

## **Agradecimentos**

Primeiramente a Deus, fonte infinita de amor e misericórdia, que me sustenta nos momentos mais difíceis.

A todos os pacientes que em meio à dificuldade vivida, souberam contribuir para o progresso científico.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

Ao programa de Pós-graduação em Microbiologia Médica, representado pelos professores e demais funcionários, pelo empenho na formação científica dos pós-graduandos.

A Profa. Dra. Sílvia Helena Barem Rabenhorts, pelo empenho dedicado à realização dessa pesquisa, além da sua generosidade em compartilhar conhecimentos e excelente orientação.

A Profa. Dra. Márcia Valéria Pitombeira Ferreira, pela colaboração quanto à análise anátomo-patológica e a estimada participação na banca examinadora.

Ao Cirurgião Marcos Aurélio Pessoa Barros, pela inestimável colaboração no desenvolvimento desse estudo.

Ao Prof. Ms. Marcos Antônio Pereira de Lima, pela colaboração quanto à análise estatística do trabalho.

Ao Hospital Universitário Walter Cantídeo, no nome do Dr. Marcelo Alcântara Holanda e a Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza, em nome do Dr. José Wilson Mourão de Farias, pela anuência do desenvolvimento do estudo.

Ao laboratório PATHUS<sup>®</sup>, no nome da patologista Luciana Gomes Rocha de Arruda, pela prontidão no fornecimento do material clínico oriundo da Santa Casa de Misericórdia e Fortaleza.

Ao Prof. Dalgimar Bezerra de Menezes, pela análise histopatológica dos tumores congelados.

As Professoras Doutoras Rosely de Vasconcelos. Meissner e Cibele Barreto Mano de Carvalho pela participação na banca.

Aos amigos do Laboratório de Genética Molécula-LABGEM, Analice, Camilla Teixeira Pinheiro, Débora Menezes da Costa, Germano Paulo Venceslau de Lima, Gervina Brady Moreira Holanda, Thiago Fernando Vasconcelos Freire, Marcelo Sousa Oliveira Nunes, Mário Henrique

Girão Faria, Markênia Kélia Santos Alves, Roberta Barroso Cavalcante e Rita de Cássia Carvalho Barbosa pela amizade, apoio e ensinamentos.

Aos amigos Alexandre Rocha Matos Júnior, Chintya Soares Cândido e Joyce Fonteles Ribeiro pelo apoio, companheirismo e grande amizade.

A técnica laboratorial Susana de Mesquita, pela contribuição quanto aos cortes de material congelado.

Ao Ronaldy Magalhães Aguiar, pela contribuição técnica na execução da dissertação.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização desse trabalho, a minha eterna gratidão.

“Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte, não temeria mal algum, porque tu estás comigo; a tua vara e o teu cajado me consolam.”Sl 23:4.

## Resumo

O câncer gástrico é a quarta neoplasia maligna mais freqüente e a segunda causa de morte por câncer no mundo, registrando-se aproximadamente 934 mil novos casos e 700 mil mortes por ano. No Brasil, o câncer gástrico é o sexto tumor maligno mais freqüente. Na região Nordeste é a segunda neoplasia mais freqüente entre os homens e a quarta entre as mulheres, sendo que no estado do Ceará é a terceira neoplasia mais freqüente. Dentre os agentes infecciosos, a bactéria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), considerada pela OMS agente carcinogênico do grupo I, tem sido destacada, nas últimas décadas, visto sua relação com a gastrite crônica ativa, com o desenvolvimento de úlceras gástricas e duodenais e aumento do risco de câncer gástrico. Além da presença, a variação genética das cepas de *H. pylori* parece influenciar na gravidade das doenças causadas pela infecção. O caráter patogênico é dado pela presença, em algumas cepas, da denominada ilha de patogenicidade, *cag*-PAI; um fragmento de DNA de 35-40 Kb cepa específico, a qual possui uma série de genes associados a um virulento aparato secretório. Além disso, outro gene, denominado *vacA*, também apresenta-se como um importante fator de virulência. Apesar dessas associações não há ainda uma relação direta entre a presença desses genes com o processo tumorigênico. Uma das possíveis explicações é a presença de outros genes que contribuam para o fenótipo mais grave ou maligno, principalmente associada a *cag*-PAI. Nesse contexto, o presente estudo objetivou investigar a freqüência de *H. pylori* genotipando quanto as variantes alélicas de *vacA*, a presença dos genes *cagA*, *cagE* e *virB11* e sua associação com os dados clínico- patológicos de adenocarcinoma gástricos de uma população do Estado do Ceará. Para tanto, 101 casos de adenocarcinoma gástricos (68 homens e 33 mulheres), obtidos de dois hospitais de Fortaleza, foram analisados por PCR quanto à presença de *H. pylori* e os genes estudados. A distribuição do câncer gástrico por sexo, sítio anatômico do tumor e análise histopatológicas, de modo geral, reproduziram as tendências da literatura mundial. A bactéria esteve presente em 93% dos casos analisados. Os genes de *H. pylori* apresentaram as seguintes freqüências: *vacAs1m1* (75,5%), *vacAs1m2* (13,8%), *vacAs2m1* (4,6%), *vacA s2m2* (6,5%), *cagA* (64,9%), *cagE* (53,2%) e *virB11* (60,6%). Esse dados são os primeiros na literatura mundial citando a freqüência *virB11* e o segundo para o gene *cagE* em câncer gástrico e indicam uma variação de cepas circulantes quanto a presença desses genes quando comparado esses dados com os de outras doenças gástricas. A combinação mais freqüente foi *vacAs1m1cagA(+)**cagE(+)**virB11(+)*, encontrada em 36,2% dos casos analisados, sendo considerada a cepa mais patogênica. A integridade de *cag*-PAI foi verificada em 38,3% dos casos, quando considerados os três marcadores estudados, entretanto, considerando-se pelo menos um marcador de lado direito (*cagA* e/ou *cagE*) e o marcador do lado esquerdo (*virB11*), a freqüência foi de 56,4%. A distribuição dos genótipos de *H. pylori* em grupos demonstrou que a maior freqüência das cepas consideradas mais patogênicas foi em tumores do antro gástrico, não houve predileção das variações genotípicas por nenhum dos tipos histológicos, além de verificar-se a alta freqüência das cepas mais patogênicas nos estadiamentos II e IV, demonstrando a participação de *H. pylori* na carcinogênese gástrica.

Palavras-chave: *Helicobacter pylori*, Adenocarcinoma gástrico, Genótipos.

## Abstract

The gastric cancer is the fourth more frequent cancer, and the second cause of death for cancer in the world, recording approximately 934 thousand of new cases and 700 thousand of deaths a year. In Brazil, the gastric cancer is the sixth more frequent malignant tumor. In the Northeast area, it is the second more frequent cancer among the men and fourth among the women. In the state of Ceara, it is the third more frequent neoplasia. Among the infectious agents, the bacterium *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), which is considered carcinogenic agent of the group I, has been pointed in the last decades because of the connection with activated chronic gastritis, with the development of peptic ulcers and duodenais, and the increase of the risk of gastric cancer. Besides the presence, genetic variation of the strains of *H. pylori* seems to influence in the seriousness of the disease caused by infection. The pathogenic character is given by the presence, in some cepas, of the called *cag* pathogenicity island, *cag*-PAI; one gene fragment of 35-40 Kb strain specific, which possess a series of genes associates to a virulent type IV secretion apparatus. Moreover, another gene, called *vacA*, it is presented as an important virulence factor. Despite these associations does not have still a direct relation enters the presence of these genes with the tumorigenic process. One of the possible explanations is the presence of other genes that contribute for fenotype more serious or malignant, mainly associates *cag*-PAI. In this context, the present study objectified to investigate the frequency of *H. pylori* genotyped how much the alelics variants of *vacA* the presence of the genes *cagA*, *cagE* and *virB11* and its association with the clinic- pathological dates of gastric adenocarcinoma of one population of the Ceara State. For in such a way, 101 cases of gastric adenocarcinoma (68 men and 33 women), gotten of two hospitals of Fortaleza, had been analyzed by PCR how much to the presence of *H. pylori* and the studied genes. The distribution of the gastric cancer by sex, anatomical sites and the histopatologic analysis, in general way, had reproduced the trends of world-wide literature. The bacterium was present in 93% of the analyzed cases. The genes of *H. pylori* had presented the following frequencies: *vacAs1m1* (75,5%), *vacAs1m2* (13,8%), *vacAs2m1* (4,6%), *vacAs2m2* (6,5%), *cagA* (64,9%), *cagE* (53,2%) and *virB11* (60,6%). These data are the first ones in world-wide literature citing the frequency of *virB11* and as for the gene *cagE* in gastric cancer and indicate a circulating variation of strains how much the presence of these genes when compared these data with the ones of other gastric diseases. The most frequent combination was *vacAs1m1cagA(+cagE(+virB11(+)*, found in 36,2% of the analyzed cases, being considered strain more pathogenic. The integrity of *cag*-PAI was verified in 38,3% of the cases, when considered the three studied markers, however, considering at least one marker of right side (*cagA* and/or *cagE*) and the marker of the left side (*virB11*), the frequency was of 56,4%. The distribution of the genotypes of *H. pylori* in groups demonstrated that the biggest frequency of strains considered more pathogenic was in tumors of the gastric antrum, did not have predilection of the genotypic variations for none of the histologic types, besides verifying it high frequency of more pathogenic strains in tumor stage II and IV, demonstrating to the participation of *H. pylori* in gastric carcinogenesis.

Key-words: *Helicobacter pylori*, Gastric adenocarcinoma, Genotypes

## Lista de Figuras

FIGURA 1: Incidência de Câncer no Mundo, distribuídos quanto ao sexo, 2002.

FIGURA 2: Incidência de Câncer no Brasil, distribuídos quanto ao sexo, 2002.

FIGURA 3: Regiões anatômicas do estômago e a frequência de tumores correspondentes

FIGURA 4: Adenocarcinoma gástrico [a] tipo intestinal e [b] tipo difuso.

FIGURA 5: Esquema da ilha de patogenicidade *cag*-PAI.

FIGURA 6: esquema do sistema de secreção do tipo IV.

FIGURA 7: Percentual de casos de adenocarcinoma gástrico estudados, distribuídos segundo a procedência dos pacientes (n=99).

FIGURA 8: Percentual de casos distribuídos quanto à profissão dos pacientes (n=88).

FIGURA 9: Percentual de casos de carcinoma gástricos distribuídos quanto ao sexo dos pacientes (n=101).

FIGURA 10: Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto ao sexo e faixa etária dos pacientes (n=101,  $p=0,247$ ).

FIGURA 11: Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto à cor da pele dos pacientes (n=101).

FIGURA 12: Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto ao sexo, tabagismo (n=91; teste de Mantel-Haenszel,  $p= 0,086$ ) e ao etilismo (n=90 teste de Mantel-Haenszel,  $p<0,0001$ ).

FIGURA 13: Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto à presença de história familiar (n=101).

FIGURA 14: Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto à localização anatômica dos tumores (n=101).

FIGURA 15: Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto à classificação de Låuren e a faixa etária dos pacientes (n=101,  $p=0,012$ ).

FIGURA 16: Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto à classificação de Låuren e o sexo dos pacientes (n=101, teste de Mantel-Haenszel ,  $p = 0,034$ ).

FIGURA 17: Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto estadiamento tumoral (n=101).

FIGURA 18: Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto estadiamento tumoral e à classificação de Låuren (n=101,  $p = 0,616$ ).

FIGURA 19: Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto ao tamanho do tumor (n=93).

FIGURA 20: Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto ao estadiamento e a faixa etária dos pacientes (n=101).

FIGURA 21: Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto ao grau de diferenciação dos tumores (n=101).

FIGURA 22: Detecção do gene *ureC* em gel de poliacrilamida a 6% corado pela prata. A seta mostra um fragmento amplificado de 294pb. Os casos 1, 2, 7 e 8 foram positivos e os casos 3, 4, 5 e 6 foram negativos.

FIGURA 23: Percentual de casos de carcinoma gástrico com infecção por *H. pylori* estudados, distribuídos quanto ao sexo e faixa etária (n=94).

FIGURA 24: Percentual de casos de carcinoma gástrico com infecção por *H. pylori* estudados, distribuídos quanto ao sítio dos tumores (n=94).

FIGURA 25: Percentual de casos de carcinoma gástrico com infecção por *H. pylori* estudados, distribuídos quanto à classificação de Låuren e a faixa etária dos pacientes (n=94,  $p = 0,026$ ).

FIGURA 26: Percentual de casos de carcinoma gástrico com infecção por *H. pylori* estudados, distribuídos quanto à classificação de Låuren e ao sexo dos pacientes (n=94, teste de Mantel-Haenszel,  $p=0.013$ ).

FIGURA 27: Percentual de casos de carcinoma gástrico com infecção por *H. pylori* estudados, distribuídos quanto à classificação de Låuren e estadiamento dos tumores (n=94,  $p=0,822$ ).

FIGURA 28: Percentual de casos de carcinoma gástrico com infecção por *H. pylori* estudados, distribuídos quanto ao grau de diferenciação dos tumores (n=94).

FIGURA 29: Percentual de casos de carcinoma gástrico com infecção por *H. pylori* estudados, distribuídos quanto a presença do gene *cagA* (n=94).

FIGURA 30: Percentual de casos de carcinoma gástrico com infecção por *H. pylori* estudados, distribuídos quanto aos subtipos do gene *vacA* (n=94).

FIGURA 31: Percentual de casos de carcinoma gástrico com infecção por *H. pylori* estudados, distribuídos quanto a presença do gene *cagA* e aos subtipos do gene *vacA* (n=94, Teste Exato de Fisher  $p= 0.003$ ).

FIGURA 32: Detecção do gene *virB11* em gel de agarose a 2% corado com Brometo de Etídeo. A seta mostra um fragmento amplificado de 491pb. Os casos 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14 foram positivos e os casos 4 e 5 foram negativos.

FIGURA 33: Percentual de casos de carcinoma gástrico com infecção por *H. pylori* estudados, distribuídos quanto aos grupos estabelecidos e o sexo dos pacientes (n=71).

FIGURA 34: Percentual de casos de carcinoma gástrico com infecção por *H. pylori* estudados, distribuídos quanto aos grupos estabelecidos e o sexo dos pacientes (n=17).

FIGURA 35: Percentual de casos de carcinoma gástrico com infecção por *H. pylori* estudados, distribuídos quanto aos grupos estabelecidos e o sítio dos tumores (n=71).

FIGURA 36: Percentual de casos de carcinoma gástrico com infecção por *H. pylori* estudados, distribuídos quanto aos grupos estabelecidos e o sítio dos tumores (n=17).

FIGURA 37: Percentual de casos de carcinoma gástrico com infecção por *H. pylori* estudados, distribuídos quanto aos grupos estabelecidos e a classificação de Låuren (n=71).

FIGURA 38: Percentual de casos de carcinoma gástrico com infecção por *H. pylori* estudados, distribuídos quanto aos grupos estabelecidos e a classificação de Låuren (n=17).

FIGURA 39: Percentual de casos de carcinoma gástrico com infecção por *H. pylori* estudados, distribuídos quanto ao estadiamento dos tumores (n=94).

FIGURA 40: Percentual de casos de carcinoma gástrico com infecção por *H. pylori* estudados, distribuídos quanto aos grupos estabelecidos e a diferenciação dos tumores (n=71).

FIGURA 41: Percentual de casos de carcinoma gástrico com infecção por *H. pylori* estudados, distribuídos quanto aos grupos estabelecidos e a diferenciação dos tumores (n=17).

## **Lista de Tabelas**

TABELA 1: Definição do TNP patológico

TABELA 2: Agrupamento por Estadiamento

TABELA 3: genes de *H. pylori* relacionados com doenças.

TABELA 4: Agrupamento dos genótipos de *H. pylori* segundo os genes *cagA*, *cagE* e *virB11*

TABELA 5: Agrupamento dos genótipos de *H. pylori* segundo a integridade de *cag*-PAI e os subtipos do gene *vacA*.

TABELA 6: Associação dos grupos estabelecidos com etilismo e tabagismo, concomitante.

TABELA 7: Distribuição dos casos de câncer gástrico do grupo C quanto aos dados clínico-epidemiológicos e histopatológicos.

## Sumário

1. Introdução.....	16
1.1 Câncer Gástrico .....	16
1.1.1 Epidemiologia do Câncer Gástrico.....	16
1.1.2 Classificações Clínico-Histopatológicas do Câncer Gástrico .....	18
1.1.3 Etiologia do Câncer Gástrico.....	21
1.2 <i>Helicobacter pylori</i> .....	23
1.2.1 Detecção de <i>Helicobacter pylori</i> .....	24
1.2.2 Genes associados à virulência de <i>Helicobacter pylori</i> .....	26
1.2.2.1 Genes associados à virulência .....	27
1.2.3 <i>Helicobacter pylori</i> e Câncer Gástrico .....	35
1.3. Pergunta de Partida.....	36
1.4. Hipóteses .....	37
2. Objetivos.....	38
2.1 Geral .....	38
2.2 Específicos.....	38
3. Material e Métodos.....	39
3.1 Casuística.....	39
3.2. Aspectos Éticos .....	39
3.3 Coleta de Dados.....	40
3.4. Avaliação Histopatológica.....	40
3.5.Extração do DNA de Espécimes Congelados.....	40
3.6. Reação em Cadeia da Polimerase.....	41
3.6.1. Detecção de <i>H. pylori</i> .....	41
3.6.2. Presença e subtipos do gene <i>vacA</i> de <i>H. pylori</i> .....	41
3.6.3. Detecção do gene <i>cagA</i> .....	42
3.6.4. Detecção do gene <i>cagE</i> .....	43
3.6.5. Detecção do gene <i>virB11</i> .....	43
3.7. Análise Estatística .....	44
4. Resultados.....	45
4.1. Análise Clínico-Epidemiológica.....	45
4.2. Resultado Histopatológico.....	48
4.3. Detecção e Genótipos de <i>H. pylori</i> .....	52
4.3.1. Resultados Histopatológicos dos tumores com infecção por <i>H. pylori</i> .....	53
4.3.2. Análise dos tumores com infecção e genótipo de <i>H. pylori</i> .....	56
4.3.2. Análise dos tumores gástricos associados ao genótipo de <i>H. pylori</i> .....	60
5. Discussão .....	66
5.1. Análise Clínico-Epidemiológica.....	66
5.2. Análise Histopatológica.....	69
5.3. <i>H. pylori</i> e o câncer gástrico.....	70
5.3.1. <i>H. pylori</i> e o câncer gástrico: Análise Histopatológica .....	70
5.4. Genótipos de <i>H. pylori</i> .....	71
6. Conclusões.....	79
7. Referências Bibliográficas.....	80
8. Anexos.....	97
Anexo I.....	98
Anexo II.....	99
Anexo III.....	100

Anexo IV ..... 101  
Anexo V..... 102

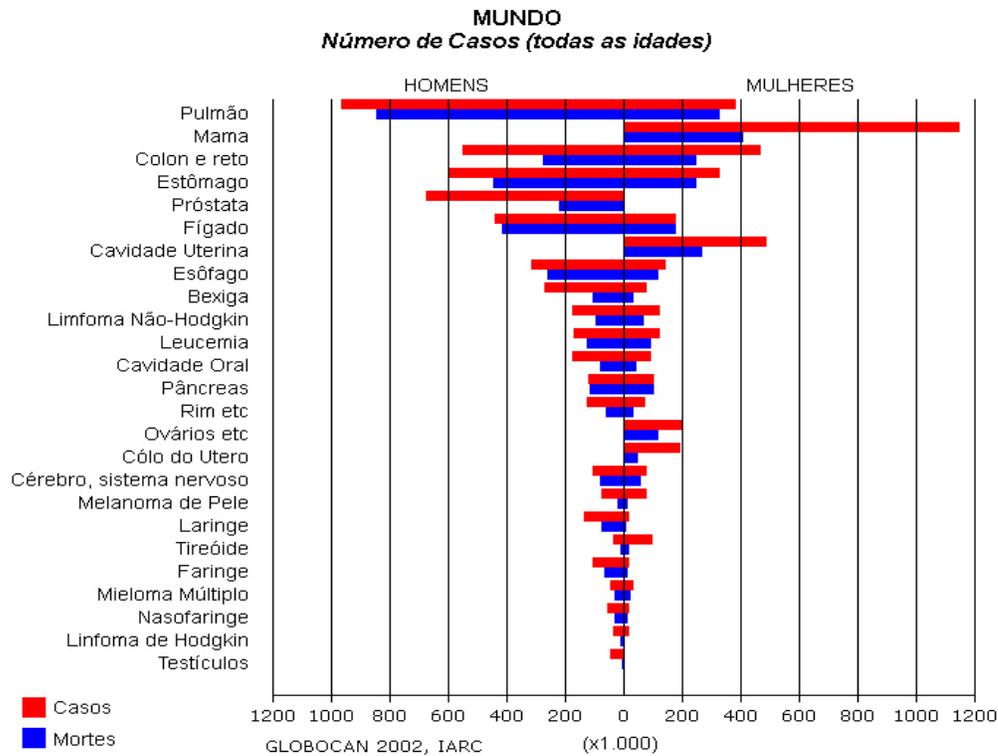
# **1. Introdução**

## **1.1 Câncer Gástrico**

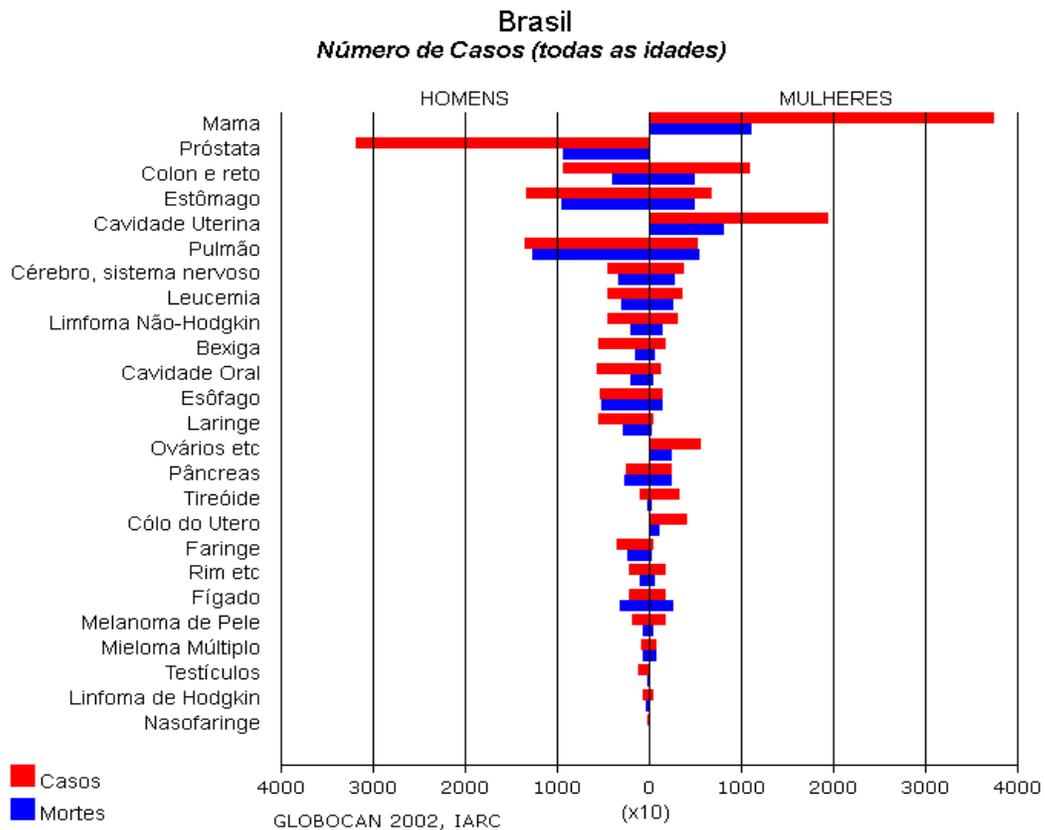
### **1.1.1 Epidemiologia do Câncer Gástrico**

O câncer gástrico é o quarto câncer mais freqüente e a segunda causa de morte por câncer no mundo, registrando-se aproximadamente 934 mil novos casos e 700 mil mortes por ano (PARKIN et al., 2005). Cerca de dois terços dos casos ocorrem em países em desenvolvimento e 42% dos casos do mundo ocorrem na China. A distribuição geográfica do câncer gástrico é caracterizada por alta variação mundial, apresentando áreas de alta prevalência (China, Japão, Europa Oriental, parte da América Central e do Sul) e áreas de baixa prevalência (Sudeste da Ásia, Norte e Leste da África, América do Norte, Austrália e Nova Zelândia) (PARKIN et al., 2005) A figura 1 mostra a incidência dos diversos tipos de câncer no mundo.

O câncer de estômago é a terceira neoplasia mais freqüente do mundo entre os homens e a quarta entre as mulheres (IARC-GLOBOCAN 2002). No Brasil, de acordo com os dados do Instituto Nacional do Câncer – INCA, o câncer gástrico é o sexto tumor maligno mais freqüente no país, sendo estimado para o ano de 2008, cerca de 21.800 novos casos, perfazendo uma taxa de 22,85 por 100 mil habitantes. Na região Nordeste, é a segunda neoplasia mais freqüente entre os homens e a quarta entre as mulheres. No Estado do Ceará, é a terceira neoplasia mais freqüente (INCA, 2007). A figura 2 mostra os diversos tipos de câncer distribuídos quanto ao sexo, no Brasil.



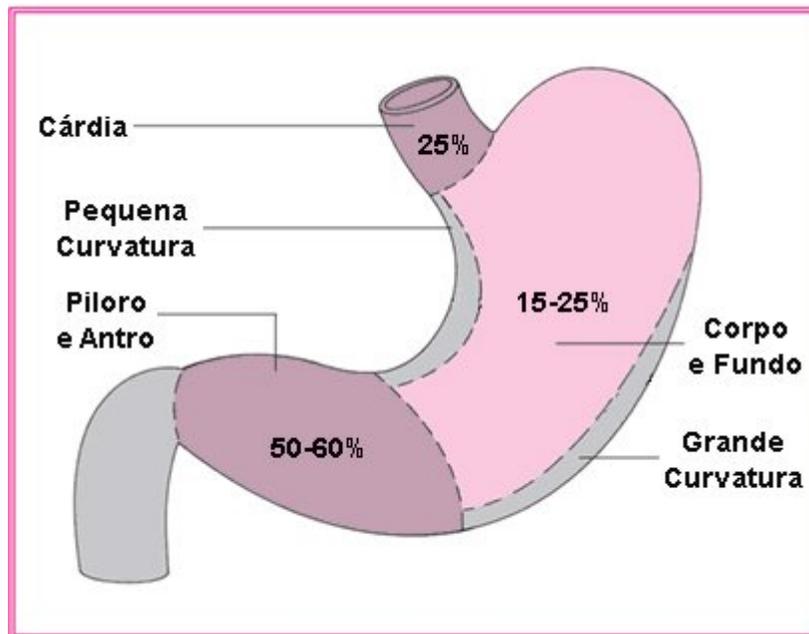
**FIGURA 1: Incidência de Câncer no Mundo, distribuídos quanto ao sexo, 2002.**  
Fonte: Global Câncer 2002, IARC.



**FIGURA 2: Incidência de Câncer no Brasil, distribuídos quanto ao sexo, 2002.**  
Fonte: Global Câncer 2002, IARC

### 1.1.2 Classificações Clínico-Histopatológicas do Câncer Gástrico

Considerando-se o aspecto macroscópico, os tumores gástricos podem ser classificados em quatro tipos: poliplóide e vegetante (Borrmann I); lesão ulcerada com bordas elevadas (Borrmann II); lesão ulcerada infiltrando a parede gástrica (Borrmann III) e lesões difusamente infiltrativas, também denominadas “linite plática” (Borrmann IV); além dos tumores não-classificáveis (Borrmann V) (BORRMANN, 1929; ESPEJO e NAVARRETE, 2003). Atualmente, essa classificação utiliza números arábicos. Quanto à localização anatômica do tumor, cerca de 50% são observadas no piloro e antro, 10% na cárdia e os demais no corpo e fundo gástricos (ROBBINS e COTRAN, 2005). A figura 3 ilustra os sítios anatômicos do estômago e a freqüência de tumores em cada sítio.

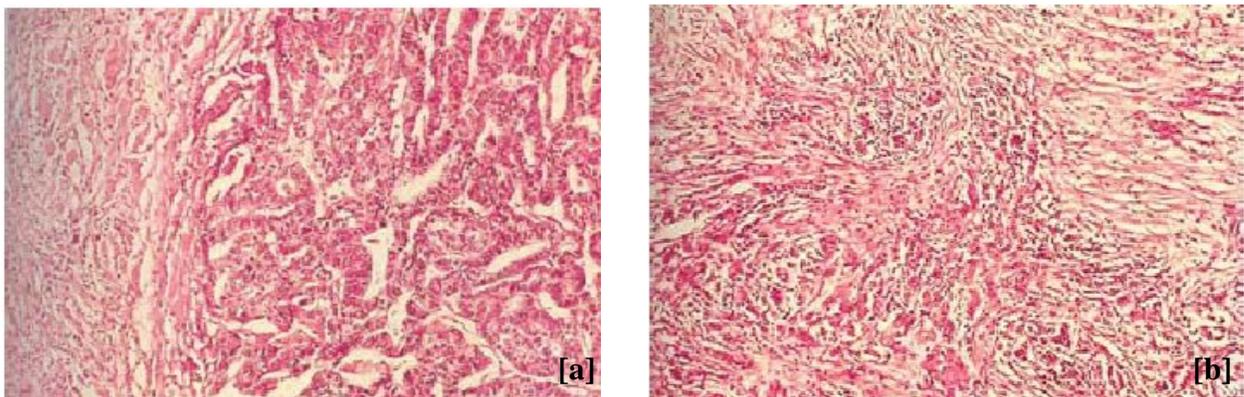


**Figura: 3 – Regiões anatômicas do estômago e a freqüência de tumores correspondentes (ROBBINS e COTRAN, 2005. Fonte: [www.wrongdiagnosis.com/.../book-diseases-7k.htm](http://www.wrongdiagnosis.com/.../book-diseases-7k.htm)).**

Quanto a histopatologia, dentre os tumores de estômago, o adenocarcinoma, que tem origem epitelial, é o mais freqüente, correspondendo a aproximadamente 95% do total. Logo em seguida observam-se os linfomas, com cerca de 5%. Existem, ainda, tumores gástricos de células neuroendócrinas (carcinóides) e os tumores de origem mesenquimal, tais como leiomiossarcoma e tumores estromais gastro-intestinais-GIST. Além desses, existe uma variante pouco freqüente do adenocarcinoma, apresentando um proeminente infiltrado linfocitário, denominado de adenocarcinoma do tipo linfo-epitelial, cujo padrão histológico é semelhante ao do carcinoma de

nasofaringe indiferenciado (TSUCHIYA, 2002). Os adenocarcinomas gástricos, como outras neoplasias, podem ser classificados quanto ao grau de diferenciação, isto é, quanto ao nível de semelhança com as células normais maduras do tecido de origem, que inclui as seguintes denominações: indiferenciado ou anaplástico, pouco diferenciado, moderadamente diferenciado e bem diferenciado (ROBBINS e COTRAN, 2005).

Devido à diversidade de arranjos histológicos, diferentes classificações baseadas em aspectos morfológicos foram propostas para os adenocarcinomas gástricos, dentre elas destacam-se as classificações da Organização Mundial de Saúde – OMS e a de Làuren (1965), sendo a última a mais utilizada nos países ocidentais. De acordo com a OMS, os adenocarcinomas são classificados em cinco subtipos histológicos: Papilar, Tubular, Anel-de-Sinete, Indiferenciado e Mucinoso. A classificação de Làuren (1965) dividiu-os em dois subtipos: intestinal e difuso. O tipo intestinal, que compreende principalmente tumores diferenciados, apresenta células com núcleos grandes e irregulares, os quais apresentam coesão celular a ponto de permitir a formação de estruturas tubulares do tipo glandular semelhantes a células intestinais. O tipo difuso, que em geral, inclui tumores pouco diferenciados, constituídos de pequenas células não coesas, difusamente dispersas, que não formam estruturas glandulares, podendo apresentar células com núcleos deslocados para a periferia do citoplasma devido a elevada produção de mucina, conferindo um aspecto de “anel-de-sinete”. Além destes, pode-se observar uma forma intermediária denominada “padrão misto” (ESPEJO e NAVARRETE, 2003). A figura 4 ilustra os subtipos segundo a classificação de Làuren.



**FIGURA 4: Adenocarcinoma gástrico [a] tipo intestinal e [b] tipo difuso. Fonte: ESPEJO e NAVARRETE, 2003.**

O tipo intestinal é, geralmente, precedido de lesões pré-neoplásicas progressivas, como gastrite crônica, atrofia gástrica, metaplasia intestinal e displasia, sendo mais associado à infecção por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*). Quanto ao tipo difuso, observa-se que pode ter como condição precursora gastrite com infecção por *H. pylori*, além disso, apresenta evolução clínica mais agressiva e pode prosseguir para metástase precoce (STADTLANDER et al., 1999; WERNER et al., 2001; CÉSAR et al., 2002; ROBBINS e COTRAN, 2005; VAUHKONEN et al., 2006).

Assim como nos outros tumores, determina-se o estadiamento do câncer gástrico através da avaliação do seu grau de disseminação, informando sobre sua taxa de crescimento, extensão da doença e tipo de tumor. O estadiamento de uma neoplasia pode ser clínico ou patológico. O primeiro é estabelecido a partir de dados do exame físico auxiliado por exames radiográficos, endoscópicos e histológicos, além da exploração cirúrgica. O segundo é efetuado pela avaliação macro e microscópica do espécime clínico proveniente da ressecção cirúrgica, que visa analisar a profundidade da invasão do tumor na parede do estômago, possível acometimento de estruturas adjacentes, linfonodos comprometidos e se existe metástase à distância, classificação definida pelo sistema “pTNM”(TABELA 1). O resultado do “pTNM” é utilizado para definir o estadiamento tumoral (AJCC, 2002). A tabela 2 mostra o estadiamento baseado na combinação de TNM.

TABELA 1: Definição do TNM patológico

<b><i>Tumor Primário (pT)</i></b>	
<b>TX</b>	Tumor primário não pode ser avaliado
<b>T0</b>	Sem evidência de tumor primário
<b>Tis</b>	Carcinoma <i>in situ</i>
<b>T1</b>	Tumor invade a lâmina própria ou submucosa
<b>T2</b>	Tumor invade a muscular própria ou subserosa
<b>T2a</b>	Tumor invade a muscular própria
<b>T2b</b>	Tumor invade subserosa
<b>T3</b>	Tumor invade a serosa sem invadir estruturas adjacentes
<b>T4</b>	Tumor invade estruturas adjacentes
<b><i>Linfonodos Regionais (pN)</i></b>	
<b>NX</b>	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
<b>N0</b>	Sem metástase para linfonodos regionais
<b>N1</b>	Metástase em 1 a 6 linfonodos regionais
<b>N2</b>	Metástase em 7 a 15 linfonodos regionais
<b>N3</b>	Metástase em mais de 15 linfonodos regionais
<b><i>Metástase à distância (pM)</i></b>	
<b>MX</b>	Presença de metástase a distância não pode ser avaliada

<b>M0</b>	Sem metástase à distância
<b>M1</b>	Com metástase à distância

Adaptado do *Cancer Staging Handbook* (AJCC, 2002).

TABELA 2: Agrupamento por Estadiamento

<b>Estadiamento</b>	<b>Combinações TNM</b>		
<b>0</b>	Tis	N0	M0
<b>IA</b>	T1	N0	M0
<b>IB</b>	T1	N1	M0
	T2a/b	N0	M0
<b>II</b>	T1	N2	M0
	T2a/b	N1	M0
	T3	N0	M0
<b>IIIA</b>	T2a/b	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0	M0
<b>IIIB</b>	T3	N2	M0
<b>IV</b>	T4	N1-3	M0
	T1-3	N3	M0
	Qualquer	Qualquer	M1

Adaptado do *Cancer Staging Handbook* (AJCC, 2002).

### 1.1.3 Etiologia do Câncer Gástrico

A patogênese do câncer gástrico representa um exemplo clássico da interação das características genéticas do indivíduo com o ambiente (KATO et al, 2004; QIU et al, 2005; CHAN, 2006; TAMURA et al, 2006).

Dentre as alterações genéticas que podem influenciar no desenvolvimento do câncer gástrico pode-se destacar alterações genéticas no gene *CDH/E-caderina*, cuja proteína codificada está relacionada à adesão celular, com a Síndrome do câncer gástrico familiar do tipo difuso (CALDAS et al, 1999; BRESCIANI et al, 2003; LYNCH et al, 2005; CHAN, 2006; TAMURA, 2006). Além disso, existem relatos de polimorfismos em genes relacionados à produção de algumas citocinas inflamatórias, como as Interleucinas 10 e 1 $\beta$  (IL-10, IL-1 $\beta$ ), Fator de Necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), Interferon (INF- $\gamma$ ) e prostaglandinas (PGE). Tais polimorfismos podem alterar a transcrição gênica com conseqüente alteração na resposta imunológica individual a doenças infecciosas (KONTUREK et al, 2003; PRINZ et al, 2006), especialmente quanto à infecção por

*H. pylori*. Polimorfismos relacionados à produção da Interleucina 8 (IL-8) têm sido relacionados ao aumento do risco de úlcera e câncer gástrico (LAMARQUE e PEEK, 2003; PERMIN e ANDERSEN, 2005; KAMALI-SARVESTANI et al, 2006). Os indivíduos geneticamente predispostos a maior produção dessa citocina apresentam maior risco para o desenvolvimento da doença, pois apresentam uma resposta inflamatória mais acentuada à exposição à *H. pylori*, induzindo a gastrite crônica, gastrite atrófica e finalmente câncer gástrico (OHYAUCHI et al, 2005; KAMALI-SARVESTANI et al, 2006). Estima-se que 5-10% dos adenocarcinomas gástricos se devam a fatores hereditários (PARK et al, 2000).

Os fatores ambientais incluem o tabagismo, já identificado como um fator de risco (YOU et al, 2000; CÉSAR et al., 2002); o refluxo biliar crônico, o qual tem sido associado a metaplasia intestinal da cárdia, podendo apresentar um importante papel na carcinogênese nesse sítio gástrico (DIXON et al, 2002); o uso do álcool, apresenta estudos controversos e não conclusivos, entretanto acredita-se que desempenhe uma função sinérgica ao fumo (BRITO, 1997); dieta rica em sal, a qual pode lesar a mucosa gástrica tornando-a mais suscetível à ação de agentes genotóxicos; cirurgia gástrica anterior e história de lesões, ainda que benignas (CÉSAR et al, 2002). A ingestão de alimentos em conserva, defumados, carnes curadas, peixes secos e outros alimentos conservados em sal (BRITO, 1997) são fatores fortemente associados ao risco; enquanto que dietas ricas em frutas, legumes frescos, ácido ascórbico ou vitamina C podem reduzir o risco de displasias e câncer gástrico (YOU et al, 2000; TEIXEIRA e NOGUEIRA, 2003). Os compostos *N*-nitrosos, como nitrosaminas, nitrosamidas e nitrosouréias, também apresentam atividade carcinogênica e podem ser formados endogenamente a partir da ingestão de nitritos e nitratos. Estes, além de encontrados na natureza são também amplamente utilizados na preservação de alimentos e como fertilizantes na agricultura. Os nitratos formados endogenamente têm sua síntese modulada por alterações funcionais do estômago, como hipocloridria ou acloridria, as quais podem permitir a colonização por bactérias redutoras de nitrato a nitrito (GOMES-CARNEIRO et al, 1997; RAJ et al, 2002).

Dentre os agentes infecciosos, a infecção pela bactéria *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), considerada agente carcinogênico do grupo I pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC, 1994), tem sido destacada nas últimas décadas visto sua relação com a gastrite crônica ativa, com o desenvolvimento de úlceras gástricas e duodenais e aumento do risco de câncer gástrico (YAMAOKA et al, 1999; MARSHALL, 2002; SUGIYAMA, 2004; CREW e NEUGUT, 2006; PRINZ et al, 2006). Há também evidências de associação entre a infecção pelo vírus

Epstein-Barr, considerado um agente carcinogênico do grupo I (IARC, 1997), com o câncer gástrico (STADTLÄNDER et al, 1999; LIMA, 2006).

## **1.2 *Helicobacter pylori***

*H. pylori* é um bacilo gram-negativo, microaerófilo, móvel, não-esporulado, medindo aproximadamente 0,1 a 0,5 µm de largura e 3 µm de comprimento. Possui forma helicoidal ou espiralada, superfície lisa e extremidades arredondadas, contendo 5 a 7 flagelos unipolares embainhados, cuja regulação, secreção e montagem são controladas por cerca de 40 proteínas (MARAIS et al, 1999; MARSHALL, 2002; LADEIRA et al, 2004). Assim como as demais bactérias do gênero *Helicobacter*, *H. pylori* possui a capacidade de colonizar a mucosa gástrica sendo associada à gastrite, úlcera péptica, Linfoma MALT e carcinoma gástrico. A infecção é, normalmente, assintomática sendo, na maioria das vezes, não tratada, propiciando assim uma resposta inflamatória crônica, a qual pode se estender por décadas (MARAIS et al, 1999; PASSARO, 2002).

A *H. pylori* foi isolada pela primeira vez, em 1983, por Warren e Marshall, na Austrália, (Prêmio Nobel de Medicina – 2005) a partir de fragmentos de biópsia gástrica de pacientes com gastrite crônica e úlcera péptica. Entretanto, data do século passado o encontro de bactérias espiraladas no estômago de animais. Krienitz (1906) foi o primeiro a observar “espiroquetas” no estômago humano (TONELLI e FREIRE, 2000).

A bactéria apresenta uma distribuição cosmopolita sendo que, a baixa condição sócio-econômica, condições sanitárias precárias, alimentação inadequada e outros fatores relacionados têm sido associados à sua alta prevalência mundial (BROWN, 2000; CORREA, 2003). Nos países em desenvolvimento a taxa de infecção é em torno de 50-90%, sendo geralmente adquirida na infância, enquanto nos países desenvolvidos observam-se taxas de prevalência que variam entre 5-20% em jovens e indivíduos de até 40 anos (MARSHALL, 2002).

O mecanismo de transmissão mais provável é o contato pessoa-a-pessoa, inclusive entre familiares, especialmente mãe-filho. Essa evidência é reforçada pela observação de que em indivíduos de áreas com baixa condição sócio-econômica e educacional, condições sanitárias inadequadas e habitações aglomeradas ou superlotadas observam-se maiores taxas de infecção (ESCOBAR e KAWAKAMI, 2004; AHMED et al, 2006). São sugeridas as vias de infecção fecal-oral, oral-oral e gastro-oral, visto que a bactéria já foi detectada em placa dentária, inclusive de crianças, além dessa, outras fontes de infecção vem sendo pesquisadas, sendo que as mais

prováveis são saliva, fezes, refluxos gástricos ou vômitos, água não tratada e alimentos preparados em condições não-higiênicas (NGUYEN et al, 1993; BROWN, 2000; ALLAKER et al, 2002; AHMED et al, 2006).

Apesar da alta prevalência da infecção nos países em desenvolvimento e na população mundial (PLUMMER, 2004), apenas uma pequena proporção, de 1 a 3% dos pacientes infectados, desenvolve o câncer gástrico (HANSSON, 1993; WATANABE, 1997; WISNIEWSKI e PEURA, 1997; KONTUREK et al, 2003). Esse fato sugere que outros fatores, ambientais e/ou do hospedeiro, devem atuar de forma importante se somando a ação bacteriana.

### **1.2.1 Detecção de *Helicobacter pylori***

Existe uma grande variedade de testes utilizados para detecção da infecção por *H.pylori*, como histologia do tecido gástrico, cultura da bactéria, teste rápido da urease e PCR, que, por utilizarem o tecido gástrico, requerem endoscopia. Entretanto, testes respiratórios, sorologia, PCR do suco gástrico e teste respiratório com uréia marcada com isótopos de carbono ( $C^{14}$  e  $C^{13}$ ), são testes não invasivos. A escolha do método a ser usado para diagnóstico de infecção por *H. pylori* dependerá das informações clínicas, do local a ser avaliado e do custo (SIQUEIRA et al., 2007).

A cultura é um dos métodos mais específicos para identificação da bactéria e o único que determina a suscetibilidade aos antimicrobianos. Contudo, *H pylori* é uma bactéria muito adaptada a seu habitat e de crescimento lento, sendo assim, é muito difícil cultivá-la *in vitro*. O crescimento pode ser afetado por vários fatores como o número de biópsias, o meio, a duração, a temperatura do transporte e o próprio método de cultivo. Sua detecção pode ser influenciada inclusive, pelo uso prévio de alguns medicamentos, usados por pacientes em tratamentos de dispepsia, como o omeprazol, alguns antimicrobianos, bismuto ou benzocaínas (MALFERTHEINER et al., 2002).

O teste da urease em fragmento de tecido é baseado na potente atividade ureásica da bactéria. Ele é altamente específico e sensível e é o teste mais usado para o diagnóstico endoscópico. Um fragmento do antro ou dois fragmentos, sendo um do antro e outro do corpo gástrico, são introduzidos, imediatamente após a coleta, em um substrato contendo uréia e um indicador de pH (vermelho fenol). A urease hidrolisa a uréia em amônia e dióxido de carbono, com conseqüente aumento do pH e mudança da cor do meio, que passa de amarelo para rosa. Quando a mudança de cor ocorre dentro das primeiras 24 horas, o teste é considerado positivo (ORNELLAS et al., 2000). Apesar das várias preparações disponíveis no mercado, o teste de urease não tamponado tem mostrado acurácia comparável e custo cumulativo menor (CHU et al.,

1997), sendo largamente utilizados na prática clínica, entretanto não fornece informações sobre a intensidade da inflamação.

Quanto às análises histológicas, embora não estejam livres de falha, a especificidade e a sensibilidade destas são altas (PEREIRA et al., 2001). Além da identificação da bactéria, a análise histopatológica permite avaliar o tipo e a intensidade da inflamação da mucosa gástrica. Este exame é feito em biópsias retiradas para rotina histológica através de colorações específicas como Giemsa, hematoxilina e eosina, Warthin-Starry, Steiner, carbolfucsina para detectar a bactéria, sendo necessárias várias horas ou mesmo até 2 dias para se obter o resultado. Este método pode apresentar falhas e inconveniências, tanto pela falta de visualização e identificação da área mais afetada, como por coletas realizadas em locais inadequados, devido à distribuição desigual do organismo na mucosa gástrica (ROCHA, 1996).

O princípio do teste respiratório com uréia marcada é o mesmo do teste da urease: a produção de grande quantidade de urease por *H. pylori*. O paciente ingere uma solução de uréia marcada  $C^{14}$  e  $C^{13}$ . Sob ação da urease, a uréia é convertida em amônia e bicarbonato, o qual é absorvido e convertido em  $CO_2$  nos pulmões (TONELLI e FREIRE, 2000). O paciente então expira em um balão ou outro recipiente próprio onde a presença do carbono marcado pode ser detectada por cintilação ou espectrografia. Por ser radioativo, o  $C^{14}$  não pode ser usado em menores de 18 anos nem em mulheres grávidas, entretanto, pode-se utilizar o  $C^{13}$ , não-radioativo, sendo ideal para o diagnóstico da infecção em pediatria. É um teste com mais de 90% de sensibilidade e altamente específico. Pode ser usado em estudos epidemiológicos e é o teste de preferência para o controle da erradicação da infecção, por não ser invasivo (GODOY e RIBEIRO, 2004).

Devido ao fato de ser um método não invasivo e de custo acessível, o teste sorológico é o método escolhido quando os sintomas não indicam uma endoscopia. Este exame se baseia na detecção de anticorpos específicos [imunoglobulina G (IgG)] contra *H. pylori* encontradas em amostra de soro das pessoas infectadas. Resultados falso-negativos podem ocorrer em crianças, idosos e em indivíduos imunodeprimidos que não desenvolvem reação imunológica contra a infecção (PORTORREAL e KAWAKAMI, 2002). Vários métodos sorológicos têm sido descritos na literatura (KHANNA et al., 1998), no entanto, o método ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) ou látex-aglutinação parece ser o mais sensível e específico em pacientes adultos de países desenvolvidos (PORTORREAL e KAWAKAMI, 2002). A recomendação é de que o teste sorológico deve ser validado e padronizado localmente antes de seu uso (FELDMAN

e EVANS, 1995). O teste sorológico tem sido utilizado em estudos epidemiológicos (BLEECKER et al., 1994), mas por ser uma infecção restrita à mucosa, em alguns casos, a estimulação antigênica pode ser lenta e resultados falso-negativos podem ocorrer em poucas semanas ou meses após nova infecção. A maior desvantagem do teste sorológico é que se tem de esperar de 6 a 12 meses antes de se repetir o teste para checar a erradicação. (MÉGRAUD, 1996).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) apresenta altíssima sensibilidade e especificidade, podendo ser feito diretamente das biópsias gástrica ou duodenal, do suco gástrico, da placa dentária, da saliva, da cultura e até mesmo das fezes. Os genes *rRNA* 16s *rRNA*, *ureA* e o *ureC* têm sido utilizados na identificação da bactéria. Além disso, por sua alta sensibilidade, o PCR é muito utilizado em estudos epidemiológicos ligados à identificação de reservatórios ambientais, em trabalhos de determinação do modo de transmissão além de ser bastante utilizada em pesquisas (LEHOURS et al., 2003). Lage et al. (1995) verificaram alta especificidade do PCR em relação a testes como cultura, teste rápido de urease e histologia, assim como outros autores observaram alta porcentagem de detecção de *H. pylori* por PCR (FABRE et al, 1994; WEISS et al., 1994).

### **1.2.2 Genes associados à virulência de *Helicobacter pylori***

Desde a descoberta de *H. pylori*, pesquisas intensivas levaram a conclusão de que a infecção por essa bactéria é um importante fator para o desenvolvimento de câncer gástrico (SIPPONEN e MARSHALL, 2000; UEMURA et al., 2001; BLASER, 2005; PRINZ et al., 2006). Embora metade da população mundial esteja infectada com este microorganismo, 80% desses indivíduos permanecem sem nenhuma evidência clínica de doença (WISNIEWSKI e PEURA, 1997) e somente uma pequena porcentagem, cerca de 3%, dos indivíduos que apresentam *H. pylori* desenvolvem neoplasias relacionadas à sua presença, indicando que outros fatores como o tipo de cepa da bactéria, a predisposição genética do hospedeiro e o meio ambiente parecem estar relacionados à sua fisiopatogenia (HANSSON, 1993; WATANABE, 1997; WISNIEWSKI e PEURA, 1997).

O sucesso da infecção gástrica pela *H. pylori* deve-se ao fato de que esta é capaz de produzir enzimas tóxicas, especialmente lipase, urease e proteases, desregulando os fatores defensivos do epitélio, além de apresentar alguns fatores que ajudam na aderência à célula hospedeira e possuir flagelo (OPLUSTIL et al., 2001).

Até o presente, a biotipagem, a análise do genoma e a diversidade plasmídica permitiram a identificação de cerca de quarenta cepas da bactéria não-relacionadas epidemiologicamente. As

variações genômicas das cepas podem ser responsáveis pela codificação de diferentes fatores de virulência, capazes de determinar diversos tipos de lesão no hospedeiro (BASER et al., 2001). Os genes de virulência mais estudados dessa bactéria são *vacA*, que codifica proteína de mesmo nome, que induz a vacuolização da célula gástrica e o gene *cagA*, cuja proteína induz diversas alterações na morfologia da célula do hospedeiro.

### 1.2.2.1 Genes associados à virulência

#### 1.2.2.1.1 *vacA*

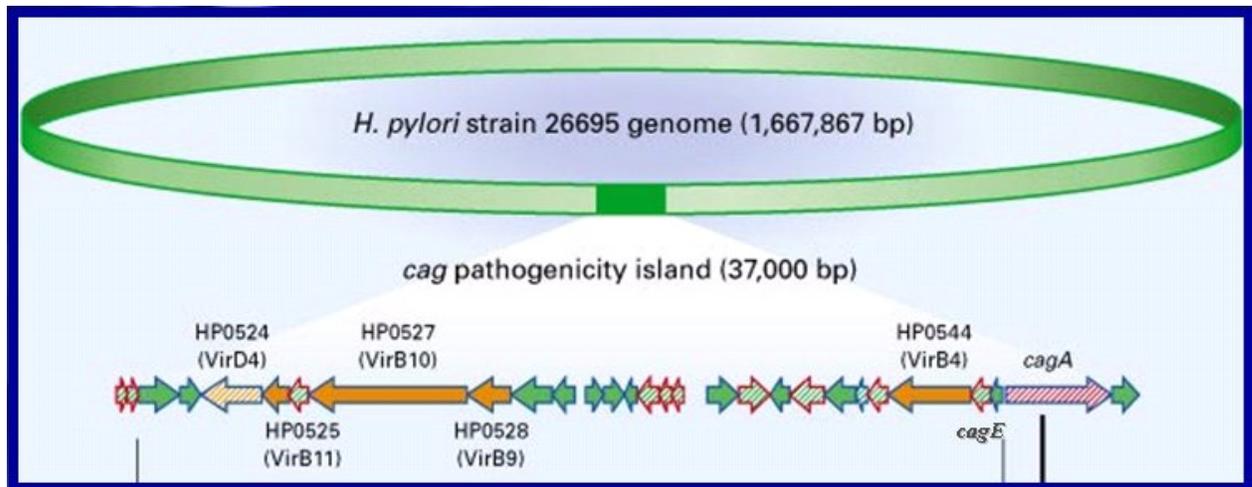
A *VacA* (*vacuolating cytotoxin A*), citotoxina vacuolizante A, é considerada um importante fator de virulência na patogênese da ulceração péptica e do câncer gástrico. Esta toxina pode induzir múltiplas atividades celulares, incluindo vacuolização da célula, formação de canais na membrana, interrupção das funções endossomais e lisossomais, apoptose e imunomodulação. O gene *vacA* está presente em todas as cepas de *H. pylori* e compreende duas partes variáveis, **s** e **m**. A região **s**, que codifica o peptídeo sinal, está localizada na extremidade da cadeia 5' e possui dois alelos, **s1** ou **s2**, sendo que para o alelo **s1** existem três subtipos: **s1a**, **s1b** e **s1c**. A região média (**m**) possui os alelos **m1** ou **m2** (ATHERTON, 1995). A combinação em mosaico dos alelos da região **s** com os alelos da região **m** determina a produção da citotoxina, responsável pelo grau de virulência da bactéria. As cepas portadoras do genótipo *vacA* s1m1 produzem grande quantidade de citotoxina, enquanto as cepas s1m2 e s2m1 produzem quantidade moderada e as cepas s2m2, pouca ou nenhuma citotoxina. As cepas *vacA* do tipo s1a parecem ser mais patogênicas que as s1b, s1c ou s2, sendo mais relacionadas à úlcera péptica e câncer gástrico. As cepas do tipo m1 estão associadas a maior risco de danos às células epiteliais do que as do tipo m2 (VAN DOORR, 1998; ATHERTON, 1999).

#### 1.2.2.1.2 Ilha de patogenicidade

Um fator determinante de virulência é a ilha de patogenicidade *cag* (*cytotoxin associated gene pathogenicity island - cag-PAI*), elemento insercional de 40kb, presente em 60%-90% das cepas mundiais e que contém cerca de 31 genes. Dentre os genes integrantes da *cag-PAI*, existem genes homólogos aos de outras bactérias os quais codificam componentes do sistema de secreção do tipo IV, que atua como “seringa” e serve para injetar moléculas efetoras da bactéria na célula hospedeira, permitindo que a bactéria module vias do metabolismo celular da célula hospedeira, incluindo a expressão de proto-oncogenes (COVACCI, et al. 1999; COVACCI et al. 2000). A

*cag*-PAI é encontrada em cerca de 60% das cepas ocidentais e está formalmente associado ao risco para desenvolvimento de câncer gástrico (PEEK et al., 1999).

As cepas de *H. pylori* que apresentam *cag*-PAI estão mais relacionadas à úlcera péptica e ao câncer gástrico do que as cepas que não apresentam *cag*-PAI (BLASER et al., 1995; PARSONNET et al., 1997; VAN DOORN et al., 1998). A integridade da *cag*-PAI parece ser relevante por conter genes com função no sucesso da infecção pelo *H. pylori*. Ali et al. (2005), verificaram que a *cag*-PAI íntegra está mais relacionada a doenças gástricas mais graves, inclusive câncer gástrico. Dentre os genes que formam essa ilha, podemos destacar os genes *cagA*, que é o fator de virulência mais estudado da *cag*-PAI, *cagE*, *cagG*, *virB11* e *virD4*. A figura 5 mostra um esquema da *cag*-PAI.



**FIGURA 5:** Esquema da ilha de patogenicidade *cag*-PAI. Fonte: <http://content.nejm.org/content/vol347/issue15/images/large/10f1.jpeg>

### 1.2.2.1.3 *cagA*

O primeiro gene cepa-específico identificado na *H. pylori* foi o gene *cagA* (*cytotoxin associated gene A*), localizado na metade direita da ilha e considerado marcador de *cag*-PAI (BLASER et al., 1995; BACKERT et al., 2001; HIGASHI et al., 2002).

A proteína CagA de *H. pylori* atua como antígeno altamente imunogênico. Esta é injetada na célula hospedeira via sistema de secreção do tipo IV, induzindo alterações na fosforilação de tirosinas, nas vias de sinalização e de transdução da célula hospedeira, resultando em rearranjos do citoesqueleto e alterações morfológicas que estimulam a célula a se espalhar e se alongar de maneira idêntica à produzida pelo fator de crescimento de hepatócitos da célula hospedeira. Além disso, fatores da bactéria podem induzir a desfosforilação de proteínas normalmente fosforiladas (SEGAL

et al., 1999; ATHERTON, 2000; ASAH I et al. 2000; ODENBREIT et al. 2000; STEIN et al. 2000; CHOI et al., 2007).

As cepas *cagA*(+) tendem a ser mais virulentas e induzem níveis mais altos de expressão de citocinas, tais como IL-1b e IL-8 (BLASER e BERG, 2001). Parsonet et al. (1997) mostraram que pacientes infectados por cepas que expressam *cagA* têm probabilidade três vezes maior de desenvolver câncer gástrico do que aqueles infectados por cepas *cagA* negativas. Contudo, mais de 90% das cepas de *H. pylori* isoladas da Ásia Oriental, incluindo Coréia, Japão e China, são *cagA* positivas, enquanto que apenas cerca de 60% das cepas isoladas de países ocidentais apresentam gene (KIM et al., 2000). Além disso, alguns estudos não conseguiram relacionar doenças mais graves com cepas *cagA* positivas, principalmente em estudos asiáticos (JENKS et al., 1998; MAEDA et al., 1998; PARK et al., 1998; KIM et al., 2000), fenômeno conhecido como Paradoxo Asiático (PRINZ et al., 2006). As diferenças quanto ao potencial patogênico do gene *cagA* podem ser devido a diferenças na sua estrutura gênica. A estrutura do gene *cagA* revela uma região 5' altamente conservada, mas com uma região 3' com número variável de seqüências repetitivas, sendo subtipado de acordo com seu tamanho: *cagA* subtipo A (621-651 pb), *cagA* subtipo B (732-735pb), *cagA* subtipo C (525 pb) e *cagA* subtipo D (756 pb) (RUDI et al., 1998; YAMAOKA et al., 1998). Yamaoka et al. (1998) estudaram a variabilidade da região 3' do gene *cagA* para investigar se diferenças nesta região estariam relacionadas a diferentes processos patológicos no Japão. Estes autores constataram que, embora o tipo A fosse mais freqüente, 86% das variantes do tipo C eram provenientes de pacientes com câncer gástrico e concluíram que outras diferenças na região 3' do gene *cagA* podem estar relacionadas a diferentes processos patológicos. No Brasil, Rota et al. (2001) verificaram maior freqüência do subtipo A (81%), sendo seguido dos subtipos B ou D (28%) e do subtipo C (16%) em doenças gastrointestinais.

Como a proteína CagA é fortemente imunogênica, qualquer variação em seu comprimento pode levar a diferentes respostas do hospedeiro, incluindo diferentes graus de resposta inflamatória. Higashi et al. (2002) e Evans e Evans (2001) sugerem que diferenças estruturais na proteína *cagA* estão associadas com as diferenças funcionais nos sítios de fosforilação de *cagA* observadas em diversas regiões com altas taxas de incidência do câncer gástrico, como Japão e Coréia. De fato, verifica-se que nas regiões onde o câncer gástrico é mais freqüente ocorre a circulação endêmica da proteína biologicamente mais ativa. Segundo os autores acima citados, o potencial de *cagA* para iniciar a resposta na célula hospedeira seria variável, entretanto, não se sabe, de que forma esse polimorfismo poderia influenciar os epítomos protéicos. Ramelah et al.

(2005), em estudo na Malásia, relata a heterogeneidade do gene *cagA*, tipos A, B e C, relacionada a diferentes grupos étnicos residentes naquele país. Uma das variantes, a *cagA* tipo A, estaria mais associada a grupo étnico específico (Chinês) que apresenta maior risco para o desenvolvimento de úlcera péptica e câncer gástrico. A heterogeneidade do gene *cagA* é também relatada por Tomasini et al. (2003) que observaram que a infecção por uma única cepa bacteriana pode incluir variáveis proporções de colônias com diferentes genótipos de *cagA*.

#### **1.2.2.1.4 *cagE* e *cagG***

O gene *cagE* (*cytotoxin associated gene E*), localizado acima do *cagA*, na extremidade direita da *cag*-PAI, codifica uma proteína envolvida no processo de expressão da interleucina 8 nas células gástricas epiteliais (VAN DOORN et al., 1998; KAUSER, 2000; AUDIBERT, 2001). Estudos verificando a integridade de *cag*-PAI citam que o gene *cagE* se mostra melhor marcador que o gene *cagA* (IKENOUE et al., 2001; SOZZI et al., 2005). Módena et al., (2007) demonstraram associação da presença de *cagE* com úlcera duodenal péptica (PUD).

O gene *cagG* (*cytotoxin associated gene G*), gene associado à citotoxina G, possui homologia com gene que codifica proteína do flagelo motor ou com gene que codifica proteína toxina corregulada pela bissíntese do “pilus” (CENSINI et al., 1996; TOMB et al., 1997). Mizushima et al., (2002) mostraram que o gene *cagG* está envolvido na aderência de *H. pylori* à célula gástrica epitelial. Xu et. al., (2003) encontraram alta frequência de *cagG* em diversas doenças gastrintestinais, mas não encontrou relação com uma doença específica.

#### **1.2.2.1.5 *virB 11* e *virD4***

Os genes *virB11* e *virD4* são homólogos dos genes de virulência (*vir*) de *Agrobacterium tumefaciens*, que juntamente com outros genes codificam o sistema de secreção do tipo IV que permite a translocação de moléculas efetoras, como a proteína CagA, para as células gástricas epiteliais (VAN DOORN et al., 1998; KRAUSE et al., 2000; AUDIBERT et al., 2001).

O gene *virB11* localiza-se na extremidade esquerda da *cag*-PAI. A proteína VirB11 apresenta estrutura composta por 6 monômeros e é essencial para o transporte de proteínas via sistema de secreção do tipo IV além de exibir atividade de ATPase (BACKERT et al., 2001; KRAUSE et al., 2000). Sozzi et al., (2005) verificaram a presença de *H. pylori virB11* positiva em pacientes com úlcera e gastrite atrófica.

O *virD4* é outro componente chave do sistema de secreção do tipo IV (AUDIBERT et al., 2001). Em *Agrobacterium tumefaciens*, VirD4 parece mediar a introdução do complexo de

nucleoproteínas no mecanismo de transporte sem gasto de energia (COVACCI et al., 1999; CHRISTIE e VOGEL, 2000). Em *H. pylori*, VirD4 provavelmente atua como proteína adaptadora na transferência da proteína CagA e de outras proteínas dentro do canal de transferência. Esta suposição é baseada em estudos *in vivo*, que mostraram que a ausência do gene *virD4* resultou na não translocação e/ou fosforilação de CagA assim como na perda da capacidade de *H. pylori* induzir rearranjos no citoesqueleto da célula do hospedeiro (CRABTREE et al., 1999). Embora o papel de VirD4 em relação à secreção de IL-8 pela célula do hospedeiro permaneça desconhecido, o consenso é que a perda de VirD4 não reflete na redução de IL-8, diferente de outras proteínas Vir da *cag*-PAI (CRABTREE et al., 1999; FISCHER et al., 2001; SELBACH et al., 2002). A figura 6 ilustra as proteínas formadoras do sistema de secreção do tipo IV de *H. pylori*.

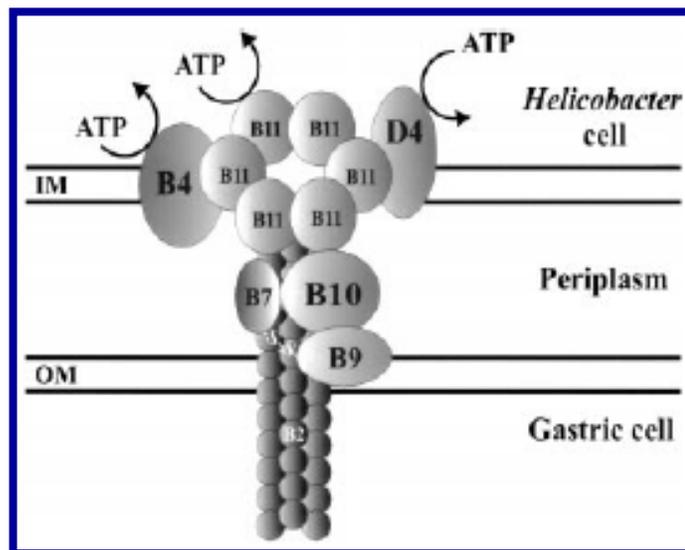


FIGURA 6: esquema do sistema de secreção do tipo IV. Fonte. BARCKET et al , 2000.

#### 1.2.2.1.6 Fatores de aderência

O *H. pylori* possui um tropismo pela mucosa gástrica, aderindo à célula epitelial e, às vezes, penetrando no espaço entre elas, facilitando a ação dos produtos tóxicos produzidos pela bactéria, que podem atuar na estimulação da produção de citocinas pela célula epitelial além de facilitar o acesso da bactéria aos nutrientes (MAHDAVI et al., 2002; MAEDA e MENTIS, 2007). Fatores de aderência são uma das características da bactéria que auxiliam no estabelecimento da colonização persistente no epitélio gástrico e contribuem para sua patogenicidade (PRINZ, et al., 2001).

Várias proteínas de membrana externa de *H. pylori* foram identificadas como fatores de aderência, como BabA, SabA, SabB, OipA, contudo, excetuando-se a adesina BabA, o papel dessas proteínas na patogenicidade de *H. pylori* não está bem estabelecido (MAEDA e MENTIS, 2007).

#### **1.2.2.1.1.7. babA**

O fator de aderência *babA* (*blood group antigen adhesin gene*), ligado ao grupo sanguíneo Lewis-b foi um dos fatores de aderência mais estudados (ILVER et al., 1998). Embora tenham sido identificados três alelos do gene *bab*, *babA1*, *babA2* e *babB*, apenas o produto do alelo *babA2* é capaz de se ligar ao antígeno Lewis-b. Em 1999, Gerhard et al. (1999) demonstraram associação entre o alelo *babA2* e a presença de úlcera péptica e adenocarcinoma gástrico, confirmado por estudos posteriores. No Brasil, estudo com pacientes de Minas Gerais, a presença de *babA2* foi associada à presença de *cagA* sendo ambos associados de forma independente a úlcera duodenal e câncer gástrico (OLIVEIRA et al., 2003). Entretanto, no estudo de Mattar et al. (2005), realizado em São Paulo, com pacientes com úlcera, mesmo sendo observando uma alta frequência de *babA2* não foi encontrado uma associação entre os genes *cagA* e *bab2*.

#### **1.2.2.1.8 iceA**

O gene *iceA* foi identificado por ser transcricionalmente super regulado quando em contato com o epitélio e por essa razão denominado *iceA* (*induced by contact with epithelium gene*). O gene *iceA* possui 2 variantes distintos: *iceA1* e *iceA2* com diferentes distribuição geográfica. *iceA1* é predominante na Turquia, no Japão e Coréia, mas na China não houve predominância de nenhum genótipo comparando áreas do Norte de alto e baixo risco para o câncer gástrico. Por outro lado, na Colômbia *iceA2* é o genótipo predominante em gastrite e câncer gástrico (YAMAOKA et al., 1998; ERZIN et al., 2006). No estudo de Caner et al. (2007), em pacientes da Turquia, o alelo *iceA1* foi significativamente associado com úlcera duodenal enquanto que o alelo *iceA2* foi associado com câncer gástrico. No Brasil os dados são controversos: enquanto o gene *iceA2* é o alelo mais freqüente, independente da doença, em um estudo de Minas Gerais (ASHOUR et al., 2001), *iceA1* foi o mais freqüente alelo encontrado em outro estudo realizado no interior de São Paulo, apesar de neste estudo, *iceA2* ter sido associado com a presença de úlcera péptica (GATTI et al., 2006).

### 1.2.2.1.9 *sabA* e *sabB*

A SabA (*sialic acid binding adhesin A*), adesina que se liga ao ácido siálico A, é uma das proteínas da membrana externa da bactéria a qual liga-se especificamente ao antígeno sialil-Lewis-x (sLex) da célula epitelial gástrica humana (MAHDAVI et al., 2002; LEHOURS et al., 2004). As glicoproteínas de sialil-Lewis-x são relacionadas ao processo inflamatório e funcionam como receptores para selectinas expressas na superfície dos leucócitos mediando sua migração para o local da inflamação (KANWAR et al., 1995). Raramente essas glicoproteínas estão presentes no tecido saudável, contudo, são abundantes no tecido inflamado, com é observado durante a infecção por *H. pylori* (MUNRO et al., 1992). A quantidade de SabA presente está diretamente relacionada com o grau de danos ao tecido (OTA et al., 1998; MAHDAVI et al., 2002). A expressão dessa proteína está, aparentemente, submetida à regulação da fase de variação por mudança na matriz de leitura (*frame-shift*) ocasionado por mutação no dinucleotídeo de repetição CT da região 5' da seqüência codificadora. Acredita-se que algumas cepas produzem apenas pequenos fragmentos não funcionais que não conseguem se ligar ao epitélio gástrico. O gene *sabA* funcional foi encontrado em 81% dos isolados de pacientes japoneses, enquanto que no Ocidente, sua freqüência é de cerca de 40% (MAHDAVI et al., 2002; YANAI et al., 2007).

O gene *sabB* (*sialic acid binding adhesin B*), adesina que se liga ao ácido siálico B, codifica a adesina SabB. Embora se tenha poucas informações sobre SabB, sabe-se que é homóloga da proteína SabA, contudo sua função específica não está bem estabelecida (MAHDAVI et al., 2002), podendo ter um papel na ligação de glicoproteínas sialilizada não identificadas. Em estudo de De Jonge et al., (2004) as repetições de dinucleotídeos que correspondem ao estatus desligado de *sabB* foram associados com a presença de úlcera duodenal.

### 1.2.2.1.10 *oipA*

O gene *oipA* (*outer inflammatory protein gene*), codifica uma proteína da membrana externa relacionada ao processo inflamatório. Está localizado no cromossomo de *H. pylori*, aproximadamente a 100Kb da *cag*-PAI e pode apresentar-se tanto o gene funcional como não funcional. O *oipA* funcional é regulado por um mecanismo de reparo “slipped strand” de acordo com o número de dinucleotídeos CT repetidos na região 5' do gene. Em estudo de Yamaoka et al. (2000), o gene *oipA* funcional apresentava 6 e 9 repetições do dinucleotídeo CT, já o *oipA* não funcional apresentava 5 e 7 dinucleotídeos CT repetidos. A presença do gene *oipA* funcional foi associado com o aumento da produção de IL-8 em células de linhagem de câncer gástrico

(YAMAOKA et al., 2000), embora Salih et al.,(2007) tenham verificado maior associação da presença de cepas portadoras do gene *oipA* com úlcera péptica que com gastrite.

#### **1.2.2.1.11 *hopZ*, *alpA* e *alpB***

Além dos genes de aderência já descritos, os genes *hopZ*, *alpA* (*adherence-associated lipoprotein A gene*), gene da lipoproteína A associada à aderência, e *alpB* (*adherence-associated lipoprotein B gene*), gene da lipoproteína B associada à aderência, codificam as adesinas, HopZ, AlpA e AlpB. Não se conhece, ainda, suas funções específicas, contudo, vale ressaltar que a adesão bacteriana à célula hospedeira é essencial para que seja estabelecida a infecção bacteriana (COVACCI et al., 2003). Entretanto, poucos estudos sobre essas adesinas foram realizados *in vivo*, a fim de fazer associação com doenças causadas pela infecção por *H. pylori*.

#### **1.2.2.1.12 Outros genes**

##### **1.2.2.1.13 *flaA* e *flaB***

O gene *flaA* codifica a flagelina FlaA, que compõem a maior parte do flagelo bacteriano, o qual se apresenta como um importante fator de virulência. Bactérias que apresentam mutação no gene *flaA*, apresentam um flagelo curto e tem sua motilidade diminuída. A integridade do flagelo é essencial para a colonização da bactéria, para a sobrevivência da mesma no muco do estômago, além de proporcionar motilidade à bactéria em ambiente viscoso (KOSTRZYNSKA et al., 1991; JOSEPHANS et al., 1995).

O gene *flaB* codifica a flagelina FlaB, que é encontrada apenas na base do flagelo. Geneticamente, derivados mutantes que não apresentam FlaB, aparentemente, apresenta flagelo normal, mas tem sua motilidade diminuída (KOSTRZYNSKA et al., 1991; JOSEPHANS et al., 1995).

##### **1.2.2.1.14 Considerações**

A grande diversidade genotípica de *H. pylori* é um dos fatores que podem explicar a variabilidade de doenças gastrointestinais correlacionadas com esse microrganismo. A tabela 3 resume os genes de virulência citados com as respectivas doenças associadas.

Apesar de alguns desses genes, como *cagA* e *vacA*, estarem relacionados com maior virulência dessa bactéria e, conseqüentemente, com o desenvolvimento de doenças causadas por

ela, ainda não existem estudos conclusivos quanto à patogenicidade para a maioria dos genes aqui descritos. Entretanto, muitos desses são candidatos promissores a marcadores de virulência, como o polimorfismo da região 3' do gene *cagA*, alguns fatores de aderência, como *babA2* e *iceA*, genes que codificam proteínas do sistema de secreção do tipo IV, além dos genes da ilha *cag*, que se mostram relevantes pelos estudos de integridade. Dessa forma, estudos associando esses genes com as diferentes patologias gástricas devem ser incentivados a fim de estabelecer os perfis das cepas de *H. pylori* circulantes e, a partir disso, definir as cepas com perfil genotípico mais virulento.

TABELA 3: genes de *H. pylori* relacionados com doenças.

<i>Genes de H. pylori</i>	<i>Doenças relacionadas</i>
<i>vacA</i>	Úlcera péptica e câncer gástrico
<i>cag</i> -PAI	Úlcera péptica e câncer gástrico
<i>cagA</i>	Úlcera duodenal e câncer gástrico
Polimorfismo de <i>cagA</i>	Câncer gástrico
<i>cagE</i>	Úlcera péptica
<i>cagG</i>	Doenças gastrointestinais
<i>virB11</i>	Úlcera e gastrite atrófica
<i>virD4</i>	-
<i>babA</i>	Úlcera duodenal e câncer gástrico
<i>iceA</i>	Úlcera duodenal e câncer gástrico
<i>sabA</i>	Doenças gastrointestinais em países orientais
<i>sabB</i>	Úlcera duodenal
<i>oipA</i>	Gastrite e úlcera
<i>flaA</i>	-
<i>flaB</i>	-

### 1.2.3 *Helicobacter pylori* e Câncer Gástrico

Estudos revelam que a infecção crônica por *H. pylori* geralmente aumenta o risco de desenvolvimento de câncer gástrico em cinco ou seis vezes. A inflamação crônica da mucosa

gástrica reduz a secreção ácida (hipocloridria) e a secreção de pepsina, o que favorece o crescimento bacteriano, a perpetuação da inflamação crônica, a manutenção da proliferação das células epiteliais mucosas e, portanto, o risco aumentado de mutação gênica (PARSONNET et al., 1992; HANSSON et al 1993; ROBBINS e COTRAN, 2005).

A frequência de infecção por *H. pylori* em câncer gástrico varia de 59,45% a 95% (HANSSON et al., 1995; LUO et al., 2006; ARAÚJO FILHO et al., 2006; THOMAZINI et al., 2006; LIMA et al., 2008). O câncer gástrico associado à infecção por *H. pylori* ocorre, predominantemente, no antro gástrico e são mais comuns em homens (PARSONNET et al., 1992; HANSSON et al 1995). Quanto ao tipo histológico predominante do câncer de estômago associado à infecção por *H. pylori*, existem controvérsias, alguns estudos relacionam o câncer gástrico associado à *H. pylori* com o tipo intestinal, enquanto outros não encontraram diferença significativa entre o tipo intestinal e o difuso (PARSONNET et al., 1991; BURUK et al., 1993; HANSSON et al 1995).

Apesar das relações pontuais já estabelecidas entre a bactéria e o câncer gástrico, o modelo definitivo do seu mecanismo de ação no processo carcinogênico não está ainda bem esclarecido. Uma das justificativas para as dificuldades no estabelecimento do ou dos mecanismos pelo qual a bactéria atua na carcinogênese gástrica é a presença de um número variável de cepas circulantes, genotipicamente distintas e com graus variados de virulência. Assim, é evidente a necessidade de maior número de estudos que possam elucidar essas relações, as quais possibilitariam estabelecer novas ferramentas prognósticas e diagnósticas para este tipo de câncer. Além disso, informações sobre a variabilidade genética de *H. pylori* em câncer gástrico podem esclarecer por que a maioria dos indivíduos infectados por essa bactéria não desenvolve câncer gástrico e nem doenças associadas.

Dentro desse contexto, variações da presença de genes da *cag*-PAI bem como dos subtipos de *vacA* mostram a importância de estudos de variações genotípicas de *H. pylori*, principalmente associado com o câncer gástrico, visto ser esta associação a que apresenta carência de dados.

### **1.3. Pergunta de Partida**

Existe uma variação genotípica de *H. pylori* associada ao câncer gástrico?

#### **1.4. Hipótese**

Cepas mais virulentas de *H. pylori* estão associadas ao câncer gástrico.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Geral

- ✚ Determinar a integridade da ilha de patogenicidade (*cag*-PAI), pela presença dos genes *cagA*, *cagE* e *virB11*, além da variação alélica do gene *vacA* de *H. pylori* e associar com os aspectos histopatológicos dos tumores gástricos de uma população do Estado do Ceará;

### 2.2 Específicos

- ✚ Detectar a presença de *H. pylori* no tumor gástrico;
- ✚ Detectar a presença do gene *cagA* nos tumores *H. pylori* positivos;
- ✚ Determinar a variação alélica nas regiões **m** e **s** do gene *vacA* da *H. pylori*;
- ✚ Detectar a presença dos genes *cagE* e *virB11* nos tumores *H. pylori* positivos;
- ✚ Associar os perfis genotípicos da *H. pylori*, com os dados epidemiológicos, clinico-histopatológicos nos tumores gástricos estudados.

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1 Casuística**

Foram obtidos tumores gástricos de 101 pacientes submetidos a gastrectomias totais ou parciais nos hospitais: Hospital Universitário Walter Cantídeo (HUWC) e Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza (SCMF). Todos os casos foram coletados no centro cirúrgico imediatamente após a gastrectomia, em condições ideais de assepsia, de acordo com o protocolo de coleta (APÊNDICE 1), pequenos espécimes tumorais frescos de modo que não compromettesse a investigação patológica. Os fragmentos retirados foram identificados e rapidamente transportados em compartimento contendo gelo para o Laboratório de Genética Molecular – LABGEM do Departamento de Patologia e Medicina Legal – DPML, onde foram mantidos em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ , até o momento da extração do DNA. Antes de cada extração, foram realizados cortes histológicos de cada fragmento ainda congelado, em micrótomo criostato, com uma espessura de aproximadamente  $5\ \mu\text{m}$ , os quais foram corados com Hematoxilina-Eosina para a avaliação do percentual de células tumorais. A extração foi realizada apenas quando o fragmento apresentava no mínimo 70% de células tumorais.

#### **3.2. Aspectos Éticos**

O presente estudo faz parte do projeto integrado de pesquisa desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular – LABGEM, intitulado: “Alterações Moleculares no Câncer Gástrico: Associação com Fatores Epidemiológicos”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará, sob protocolo nº 199/04 Of. nº 712/04 (APÊNDICE 2), respeitando, dessa forma, as recomendações das Resoluções 196/96 e 251/97 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde, que regulamentam as pesquisas envolvendo seres humanos.

Os indivíduos submetidos à ressecção cirúrgica durante o período do estudo, foram previamente esclarecidos quanto à natureza da pesquisa e somente foram incluídos aqueles que concordaram em participar espontaneamente e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido da pesquisa (APÊNDICE 3).

### 3.3 Coleta de Dados

Os dados clínico-patológicos foram obtidos através de entrevista e de consulta de prontuários e foram registrados em fichas (APÊNDICE 4).

### 3.4. Avaliação Histopatológica

Os dados histopatológicos tais como subtipos tumorais, grau de diferenciação, profundidade da invasão, tamanho do tumor, acometimento de linfonodos e/ou metástase à distância foram extraídos dos laudos patológicos, presentes nos respectivos prontuários. Com relação à classificação de Laurèn (1965), aqueles casos que apresentavam adenocarcinoma de padrão misto foram reavaliados sendo considerado o padrão tumoral predominante.

### 3.5.Extração do DNA de Espécimes Congelados

No Laboratório de Genética Molecular – LABGEM do Departamento de Patologia e Medicina Legal – DPML, DNA genômico de alto peso molecular foi obtido dos tecidos tumorais previamente analisados, através da técnica de extração com o uso do detergente CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide), adaptado do protocolo descrito por Foster e Twell (1996), conforme apresentado a seguir:

- ✓ Fragmentos de aproximadamente 0,5g foram macerados com auxílio de bastão de vidro esterilizado, em tubo Falcon de 15mL;
- ✓ Após a maceração, foi adicionado o tampão de extração (2% CTAB; 1,4M de NaCl; 20mM de EDTA; 100mM de Tris-HCl pH 8,0; 0,2% de 2-Mercaptoetanol), na proporção de 6mL para cada 0,5g e incubado sob agitação à temperatura ambiente, por 16 horas;
- ✓ Para purificação, foi adicionado clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e centrifugado a 2000 rpm por 15 min;
- ✓ A fase superior foi transferida para tubo Flacon estéril de 15mL e o DNA foi precipitado com isopropanol à 100%, centrifugado a 2000rpm por 5 min;
- ✓ O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuscitado com NaCl 1M, para liberação do complexo DNA-CTAB;
- ✓ O DNA foi precipitado com etanol 100% gelado e centrifugado a 2000 rpm por 5 min;
- ✓ O sedimento foi lavado com etanol 70% e colocado para secar à 37°C;
- ✓ Depois de seco, o DNA foi ressuscitado em água Milli-Q estéril com DEPC 0,1% e armazenado em freezer à -14°C;

- ✓ Para avaliar a qualidade do DNA, cada amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo, avaliado sob transluminador de luz ultravioleta.

### 3.6. Reação em Cadeia da Polimerase

A detecção da presença de *H. pylori* assim como de seus genes foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) no LABGEM.

#### 3.6.1. Detecção de *H. pylori*

A presença de *H. pylori* nas amostras estudadas foi detectada pela presença do gene que codifica a proteína uréase (*ureC*), com os oligonucleotídeos iniciadores *sense* 5' AAG CTT TTA GGG GTG TTA GGG GTT T 3' e *anti sense* 5' AAG CTT ACT TTC TAA CAC TAA CGC 3' (LAGE *et al.*, 1995). A mistura para PCR foi composta por tampão 1x (Tris-HCl 20mM [pH 8,4], KCl 50 mM), 1,25 U de Platinum Taq DNA Polimerase Invitrogen®; 0,4 mM deoxinucleotídeos tri-fosfato (dNTP); 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,4 μM de cada oligonucleotídeo iniciador e 1μL de DNA, adicionada de água estéril suficiente para 25μL. A mistura foi submetida a uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos (desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto) extensão final a 72°C por 7 minutos.

A extensão esperada para o produto dessa reação foi de 294 pb. Os produtos amplificados nessas reações foram visualizados em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo sob transluminador de luz ultravioleta. Como controles positivos foram utilizadas amostras de DNA extraído de amostras sabidamente positivas para infecção por *H. pylori*.

#### 3.6.2. Presença e subtipos do gene *vacA* de *H. pylori*

##### 3.6.2.1. *vacA* s1 e s2

Os subtipos s1 e s2 forma amplificados com os oligonucleotídeos iniciadores *sense* 5' ATG GAA ATA CAA CAA ACA CAC 3' e *anti sense* 5' CTG CTT GAA TGC GCC AAA C 3' (ATHERTON *et al.* 1995). A extensão esperada para produto dessa reação foi de 259 pb para o subtipo s1 e 286 pb para o subtipo s2. A mistura para PCR era composta por tampão 1x (Tris-HCl 20mM [pH 8,4], KCl 50 mM), 1,25 U de Platinum Taq DNA Polimerase Invitrogen®, 0,4 mM deoxinucleotídeos tri-fosfato (dNTP), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4 μM de cada oligonucleotídeo

iniciador e 1µL de DNA, adicionada de água estéril suficiente para 25µL da solução. A mistura foi submetida a uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos (desnaturação a 94°C por 50 segundos, anelamento a 55°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos) e extensão final a 72°C por 7 minutos.

Os produtos amplificados nessa reação foram visualizados em gel de poliacrilamida 6%, corado pelo nitrato de prata, para melhor diferenciação entre os tamanhos dos fragmentos.

### 3.6.2.2. *vacA* m1 e m2

Os subtipos m1 e m2 foram amplificados individualmente. Para o subtipo m1 utilizou-se os oligonucleotídeos iniciadores *sense* 5'- GGT CAA AAT GCG GTC ATG G -3' e *anti sense* 5'- CCA TTG GTA CCT GTA GAA AC -3' e para o subtipo m2, os oligonucleotídeos iniciadores *sense* 5'- GGA GCC CCA GGA AAC ATT G -3' e *anti sense* 5'- CAT AAC TAG CGC CTT GCA C -3' (ATHERTON *et al.* 1995)., A mistura para PCR foi composta por tampão 1x (Tris-HCl 20mM [pH 8,4], KCl 50 mM), 1,25 U de Platinum Taq DNA Polimerase Invitrogen®, 0,4 mM deoxinucleotídeos tri-fosfato (dNTP), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 1µL de DNA, adicionando-se água estéril para um volume final de 25µL. A mistura foi submetida a uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos (desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 68°C por 2 minutos) extensão final a 68°C por 7 minutos.

Foram consideradas positivas para m1 as amostras que amplificaram um fragmento de 290pb e para m2, as amostras que amplificaram um fragmento de 192pb. Os produtos amplificados nessas reações foram visualizados em gel de poliacrilamida 6%, corado pelo nitrato de prata.

### 3.6.3. Detecção do gene *cagA*

A presença do gene *cagA* de *H. pylori* nas amostras estudadas foi detectada pela amplificação de uma região específica do gene com os oligonucleotídeos iniciadores *sense* 5'- ATA ATG CTA AAT TAG ACA ACT TGA GCG A - 3' e *anti sense* 5'- TTA GAA TAA TCA ACA AAC ATA ACG CCA T- 3' (DOMINGO *et al.*, 1999). A mistura para PCR era composta por tampão 1x (Tris-HCl 20mM [pH 8,4], KCl 50 mM); 1,25 U de Platinum Taq DNA Polimerase Invitrogen®; 0,4 mM deoxinucleotídeos tri-fosfato (dNTP); 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 1µL de DNA, adicionada da água estéril para um

volume final de 25µL. A mistura foi submetida a uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos (desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 56°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto) extensão final a 72°C por 7 minutos.

A presença de um produto de 297 pb caracterizava a presença do gene *cagA*. Os produtos amplificados nessas reações foram visualizados em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo sob transluminador de luz ultravioleta.

#### 3.6.4. Detecção do gene *cagE*

A presença do gene *cagE* de *H. pylori* nas amostras estudadas foi detectada pela amplificação de uma região específica do gene com os oligonucleotídeos iniciadores *sense* 5'-TTG AAA ACT TCA AGG ATA GGA TAG AGC - 3' e *anti sense* 5'-GCC TAG CGT AAT ATC ACC ATT ACC C - 3' (SOZZI *et al.*, 2005). A mistura para PCR era composta por tampão 1x (Tris-HCl 20mM [pH 8,4], KCl 50 mM), 1,25 U de Platinum Taq DNA Polimerase Invitrogen®; 0,4 mM deoxinucleotídeos tri-fosfato (dNTP); 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 1µL de DNA, adicionando-se água estéril suficiente para 25µL de solução. A mistura foi submetida a uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguidos de 45 ciclos (desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 53°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto) extensão final a 72°C por 10 minutos.

A presença de um fragmento de 509pb caracterizava uma amostra positiva para o gene *cagE*. Os produtos amplificados nessas reações foram visualizados em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo sob transluminador de luz ultravioleta.

#### 3.6.4. Detecção do gene *virB 11*

A presença do gene *virB 11* de *H. pylori* nas amostras estudadas foi detectada pela amplificação de uma região específica do gene com os oligonucleotídeos iniciadores *sense* 5'-TTA AAT CCT CTA AGG CAT GCT AC - 3' e *anti sense* 5'-GAT ATA AGT CGT TTT ACC GCT TC- 3' (SOZZI *et al.*, 2005). A mistura para PCR era composta por tampão 1x (Tris-HCl 20mM [pH 8,4], KCl 50 mM), 1,25 U de Platinum Taq DNA Polimerase Invitrogen®, 0,4 mM deoxinucleotídeos tri-fosfato (dNTP), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 1µL de DNA, adicionando-se, ainda, água estéril para completar o volume de 25µL. A mistura foi submetida a uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguidos de 45 ciclos

(desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 49°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto) extensão final a 72°C por 10 minutos.

A extensão esperada para o produto dessa reação foi de 491 pb. Os produtos amplificados nessas reações foram visualizados em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo sob transluminador de luz ultravioleta.

### **3.7. Análise Estatística**

Os dados clínico-patológicos e os resultados da PCR foram demonstrados através de gráficos e tabelas como auxílio do programa Microsoft Excel<sup>®</sup> 2003. A correção das variáveis observadas foi realizada através do programa estatístico EPINFO<sup>®</sup> versão 6.0d e SPSS<sup>®</sup> 12.0, utilizando-se o Teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ), Teste Exato de Fisher, Teste de Mann-Whitney. Foram considerados estatisticamente significantes, valores de  $p < 0,05$ .

## 4. Resultados

### 4.1. Análise Clínico-Epidemiológica

Os 101 pacientes portadores de adenocarcinoma gástrico utilizados neste estudo foram oriundos do município de Fortaleza (43,4%), seguidos dos pacientes dos municípios do interior do Estado (42,5%) e dos demais municípios da região metropolitana de Fortaleza (14,1%) [FIGURA 7]. Quanto à atividade profissional, não foi possível obter esse dado de treze pacientes, contudo, verificou-se que a amostra era composta, predominantemente, de agricultores (30,7%), seguido de atividades como do lar (20,5%), aposentado (18,2%) e pedreiro (5,7%). Apenas um indivíduo apresentava nível superior completo (1,1%) [FIGURA 8].

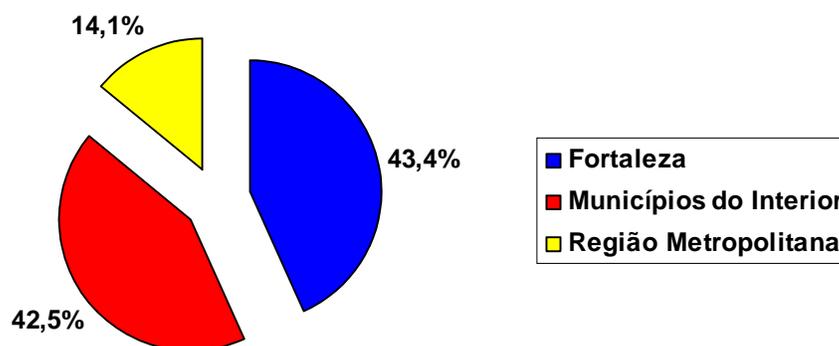


FIGURA 7: Percentual de casos de adenocarcinoma gástrico estudados, distribuídos segundo a procedência dos pacientes (n=99).

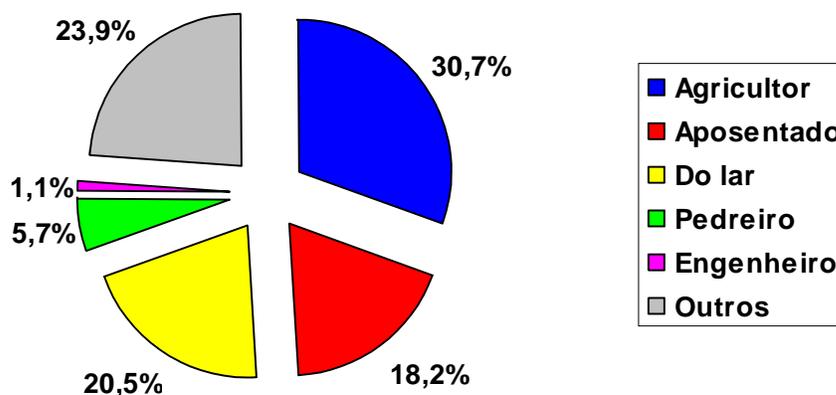


FIGURA 8: Percentual de casos distribuídos quanto à profissão dos pacientes (n=88).

Quanto à distribuição por sexo, 68 pacientes (67,3%) pertenciam ao sexo masculino e 33 (32,7%) ao sexo feminino (FIGURA 9), perfazendo uma razão masculino/feminino de 2,06. A idade dos pacientes foi distribuída de acordo com a padronização da IARC e não por décadas, pois foi a que mais se adequou à amostra estudada. A idade média foi de 62,7, variando entre 23 e 90 anos. Observou-se que 52,5% dos pacientes possuíam idade superior a 64 anos e apenas 7,9% eram adultos jovens (até 44 anos).

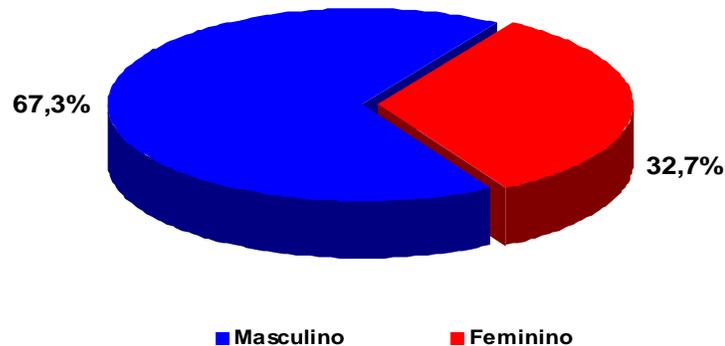


FIGURA 9: Percentual de casos de carcinoma gástricos distribuídos quanto ao sexo dos pacientes (n=101).

Pela figura 10 observa-se um aumento gradativo das frequências com o aumento das idades. Embora não tenha sido encontrada diferença estatística ( $p=0,247$ ) entre os sexos de acordo com as faixas etárias, observa-se um maior aumento do sexo masculino (39,6%) em relação à feminina (12,8%) na faixa etária acima de 65 anos.

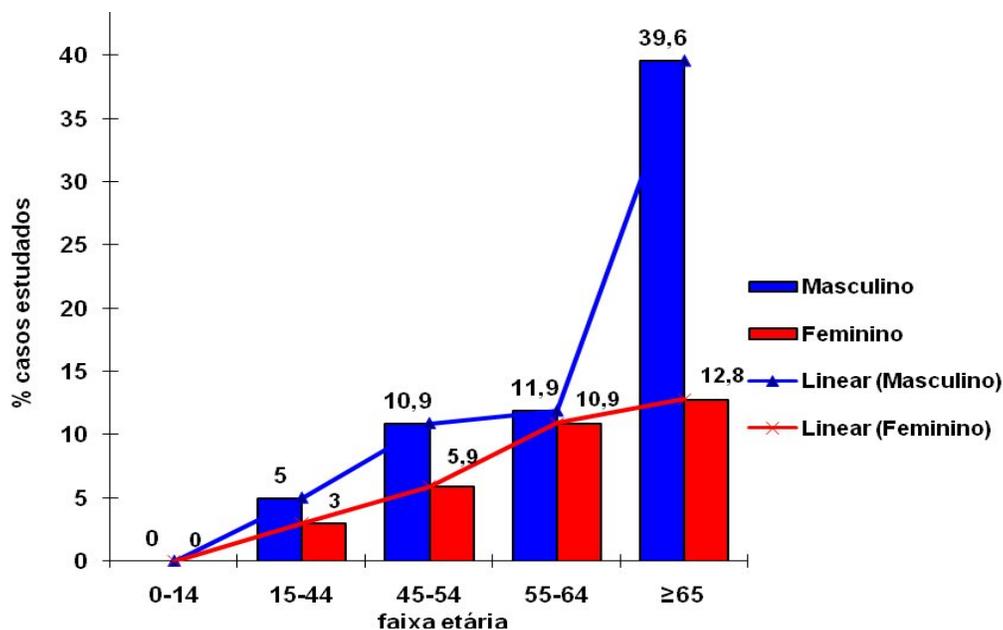
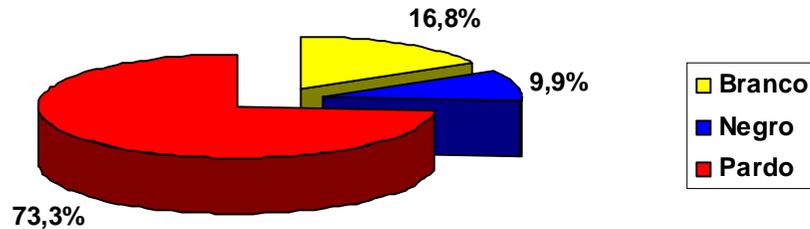


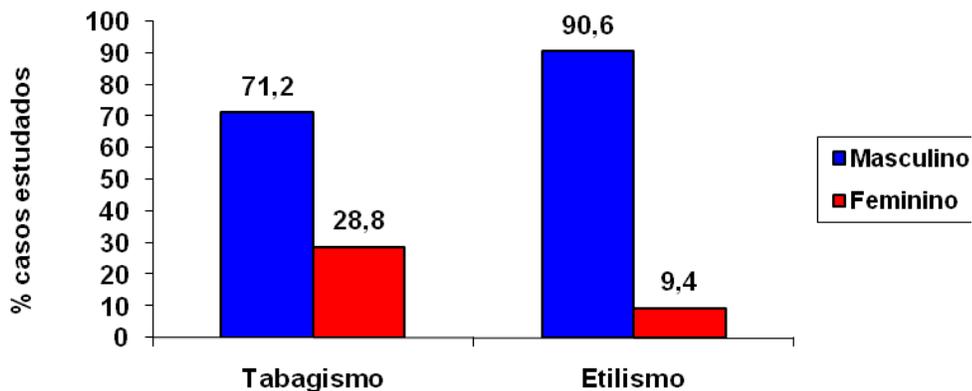
FIGURA 10: Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto ao sexo e faixa etária dos pacientes (n=101,  $p=0,247$ ).

No que se refere à cor da pele, a maioria 74 (73,3%) dos pacientes envolvidos nesse estudo eram pardos (FIGURA 11), sendo que, destes, 49 (66,2%) eram do sexo masculino. Os portadores de câncer gástrico brancos e negros representavam 16,8% e 9,9%, respectivamente.



**FIGURA 11:** Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto à cor da pele dos pacientes (n=101).

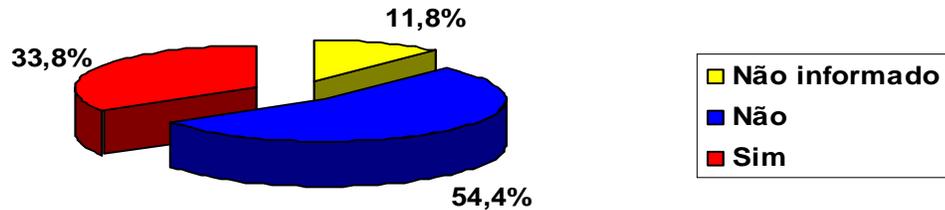
Dentre os casos os quais foi possível obter dados acerca dos fatores de risco para desenvolvimento de câncer gástrico, verificou-se que 65,5% (59/90) eram tabagistas a mais de 15 anos destacando-se o sexo masculino com 71,2% dos casos (FIGURA 12). Em relação ao consumo de bebidas alcoólicas, 58,2% (53/91) foram definidos como etilistas, sendo que destes os homens foram os mais frequentes com diferença estatisticamente significante, 90,6% ( $p < 0,0001$ ). Concomitância dos dois fatores de risco foi encontrada em 40,6% dos pacientes.



**FIGURA 12:** Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto ao sexo, tabagismo (n=91; teste de Mantel-Haenszel,  $p = 0,086$ ) e ao etilismo (n=90 teste de Mantel-Haenszel,  $p < 0,0001$ ).

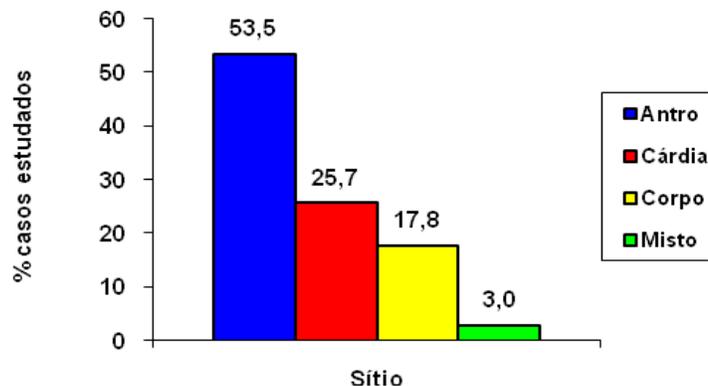
Quanto ao histórico familiar, 33,8% (34/101) dos pacientes relataram história de algum tipo de câncer em parentes de até segundo grau (FIGURA 13) não sendo possível obter a informação, na maioria das vezes, de qual o tipo de câncer. Em 11,8% (12/101) dos pacientes não foi possível obter dados sobre história familiar. Constatou-se que 13 indivíduos apresentaram três fatores de risco concomitantes, com média de idade de 63 anos, e destes, todos eram do sexo

masculino. Verificou-se, ainda, que 12 indivíduos não apresentavam nenhum dos fatores de risco, não havendo diferença entre sexo, com idades variando de 40 a 84 anos, sendo a média de idade desse grupo de 71,2 anos.



**FIGURA 13:** Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto à presença de história familiar (n=101).

Quanto à localização anatômica dos tumores, 53,5% situavam-se na região do antro gástrico, sendo que a frequência dos tumores situados na cárdia e no corpo foram 25,9% e 17,8%, respectivamente (FIGURA 14).

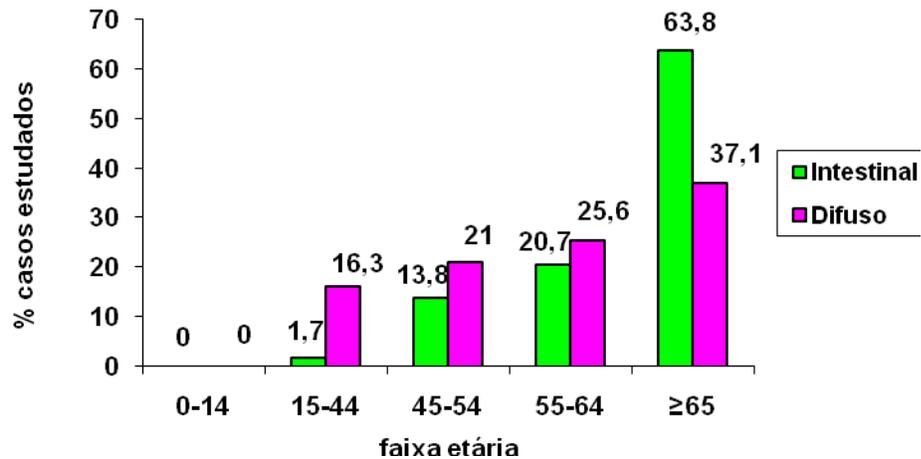


**FIGURA 14:** Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto à localização anatômica dos tumores (n=101).

## 4.2. Resultado Histopatológico

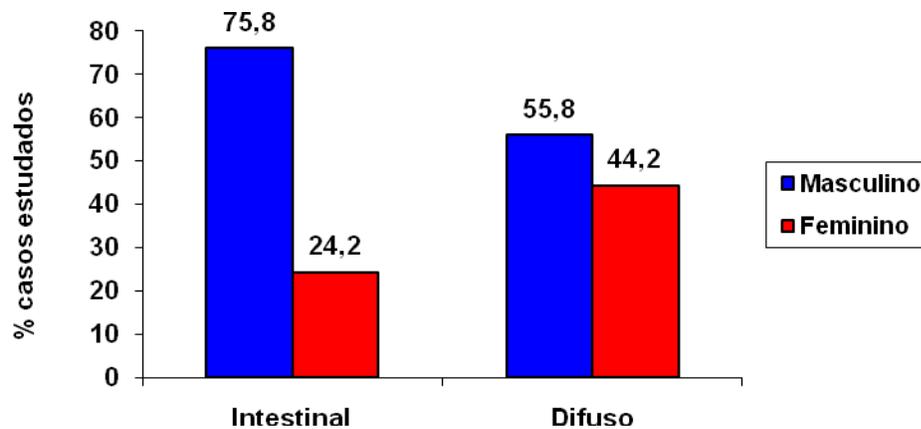
Na amostra estudada foram observados 57,4% de tumores do tipo intestinal e 42,6% de tumores do tipo difuso. Embora se tenha observado uma frequência um pouco maior do tipo intestinal em relação ao tipo difuso, esta não foi estatisticamente diferente. Em relação à faixa etária, houve um aumento estatisticamente significativo ( $p = 0,012$ ) do número de tumores do tipo

intestinal em função da idade (FIGURA 15), notavelmente, nos pacientes com mais de 54 anos. Nos tumores do tipo difuso, observou-se um discreto aumento do número de casos com a idade, contudo, este se sobrepôs ao tipo intestinal no grupo de pacientes mais jovens, com idade até 54 anos (15,5% intestinal e 37,3% difuso).



**FIGURA 15:** Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto à classificação de Lauren e a faixa etária dos pacientes (n=101,  $p=0,012$ ).

O sexo masculino foi predominante nos tumores do tipo intestinal, havendo uma diferença estatística ( $p = 0,034$ ) entre ambos os sexos. Nos tumores do tipo difuso, as frequências entre os sexos foram semelhantes, entretanto, observa-se que entre as mulheres os tumores do tipo difuso são mais frequentes (FIGURA 16).



**FIGURA 16:** Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto à classificação de Lauren e o sexo dos pacientes (n=101, teste de Mantel-Haenszel,  $p = 0,034$ ).

Quanto ao estadiamento, nota-se um aumento progressivo dos casos, excetuando-se os estadiamentos IIIA e IIIB que demonstraram um inesperado percentual inferior (FIGURA 17). Quando se distribuiu o estadiamento tumoral com os tipos histológicos, não se observa diferença estatística ( $p = 0,616$ ) (FIGURA 18). Vale salientar que houve uma importante elevação do número de tumores do tipo intestinal nos estadiamentos II e IIIA, correspondendo a uma razão intestinal/difuso de 2 e 1,7, respectivamente. Distribuíram-se, ainda, os tumores estudados de acordo com o seu tamanho e verificou-se um predomínio dos tumores T3 (56%) sobre os outros grupos (FIGURA 19).

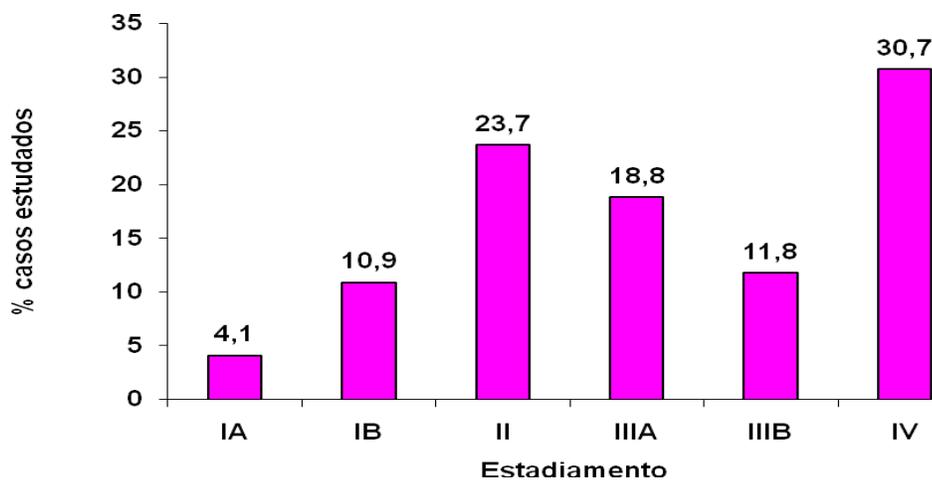


FIGURA 17: Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto estadiamento tumoral (n=101).

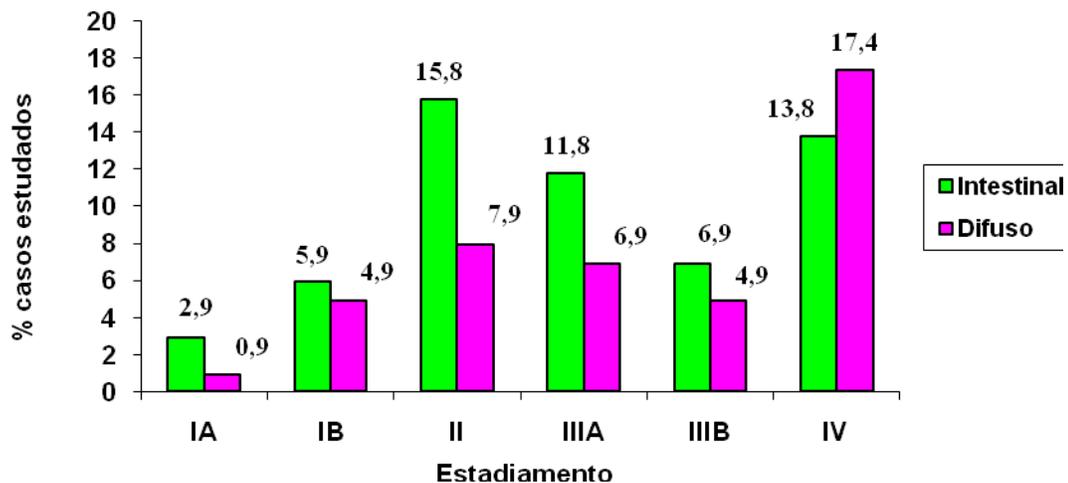
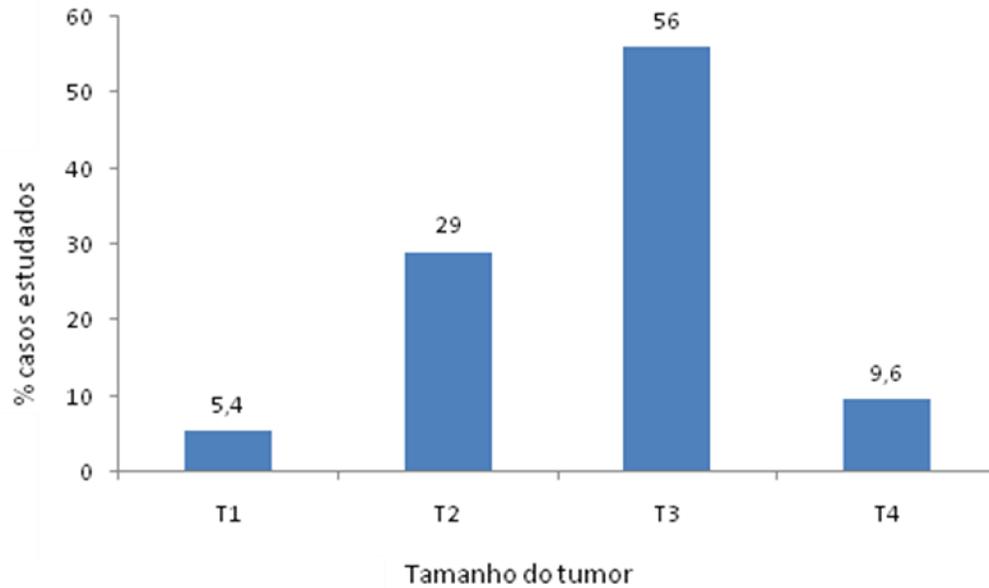
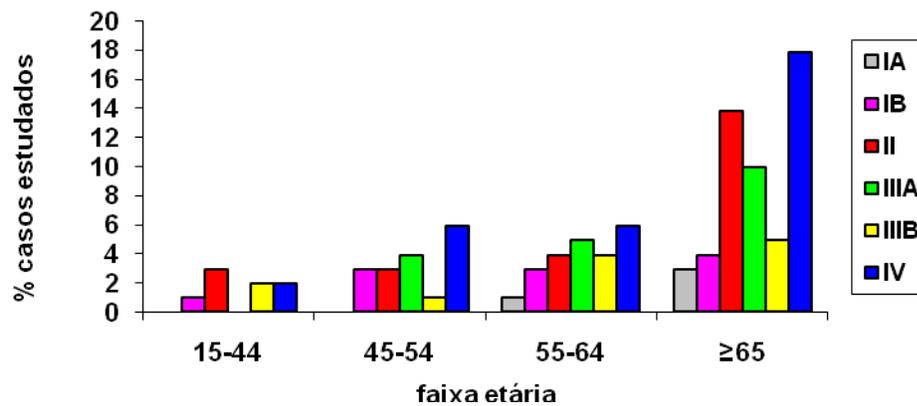


FIGURA 18: Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto estadiamento tumoral e à classificação de Låuren (n=101,  $p = 0,616$ ).



**FIGURA 19:** Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto ao tamanho do tumor (n=93).

Quando se distribui os estadiamentos tumorais nas faixas etárias, observa-se um aumento gradativo nas incidências dos tumores mais avançados em todas as faixas etárias, sendo que na faixa etária  $\geq 65$ , os tumores avançados são os predominantemente (FIGURA 20).



**FIGURA 20:** Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto ao estadiamento e a faixa etária dos pacientes (n=101).

Quanto ao grau de diferenciação, a maior parte (54,1%) dos tumores foi definida como moderadamente diferenciados seguidos dos tumores pouco diferenciados (40,8%). Os tumores indiferenciados e bem diferenciados foram pouco representados, com 1 e 4 casos, respectivamente (FIGURA 21).

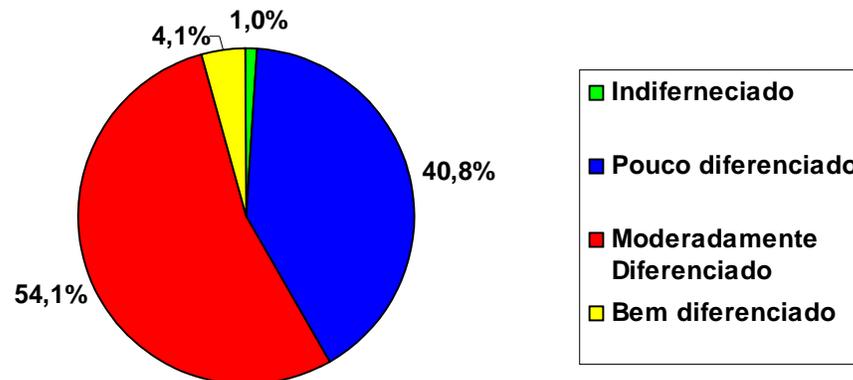


FIGURA 21: Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto ao grau de diferenciação dos tumores (n=101).

### 4.3. Detecção e Genótipos de *H. pylori*

A figura 22 ilustra um gel de poliacrilamida a 6% corado pela prata. A análise dos 101 casos estudados através da técnica de PCR demonstrou positividade para *H. pylori* em 94 (93%) dos casos.

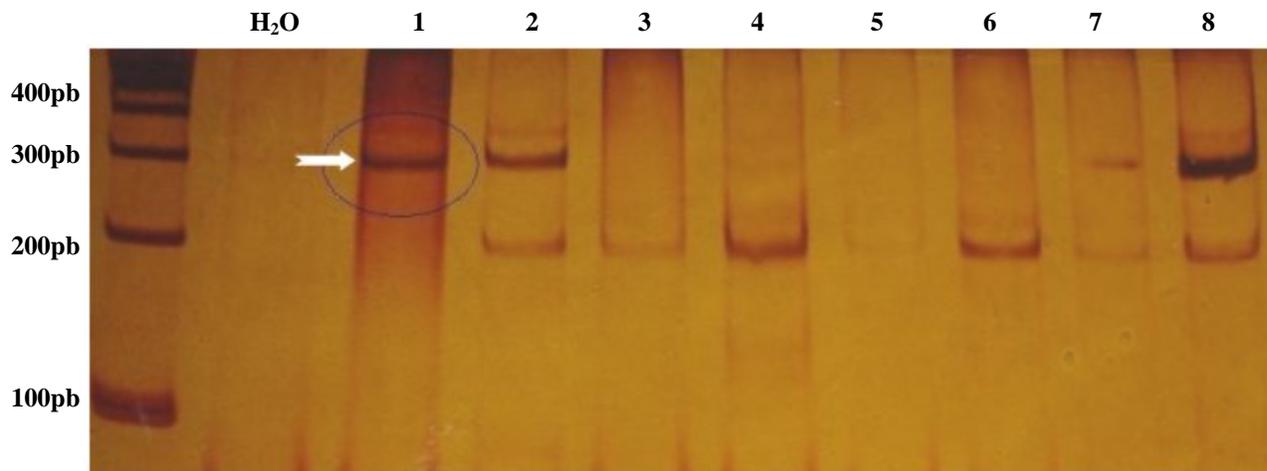


FIGURA 22: Detecção do gene *ureC* em gel de poliacrilamida a 6% corado pela prata. A seta mostra um fragmento amplificado de 294pb. Os casos 1, 2, 7 e 8 foram positivos e os casos 3, 4, 5 e 6 foram negativos.

Quanto ao sexo dos pacientes infectados por *H. pylori*, verificou-se que 32% (30/94) dos indivíduos eram do sexo feminino enquanto 68% (64/94) pertenciam ao sexo masculino. Quanto à faixa etária dos pacientes, verificou-se um aumento progressivo de pacientes infectados com o aumento da idade em ambos os sexos. Entretanto, observa-se que até a faixa etária de 55-64 anos

as mulheres foram as mais freqüentes, ocorrendo uma inversão na faixa etária  $\geq 65$  onde o sexo masculino foi mais freqüente (FIGURA 23).

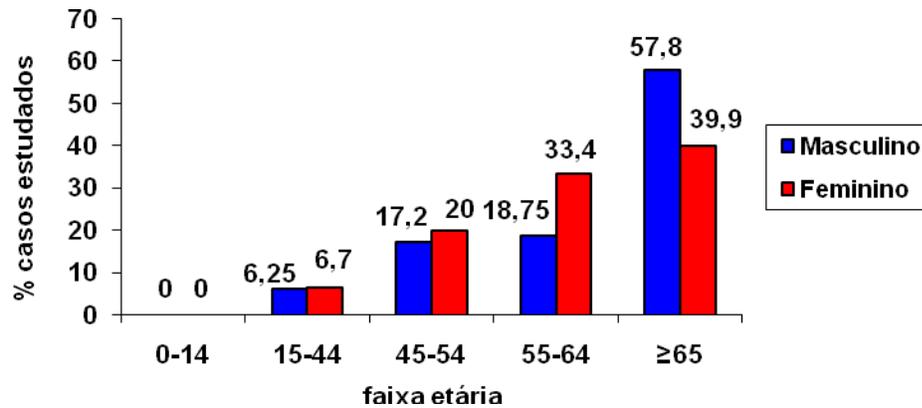


FIGURA 23: Percentual de casos de carcinoma gástrico com infecção por *H. pylori* estudados, distribuídos quanto ao sexo e faixa etária (n=94).

No que se refere ao sítio anatómico dos tumores infectados por *H. pylori*, verificou-se que 53,2% (50/94) localizavam-se na região do antro gástrico, sendo que a freqüência dos tumores localizados na cárdia e no corpo foram 25,5% e 18,0%, além desses, verificou-se que 3,3% dos tumores estavam em mais de um sítio anatómico (FIGURA 24).

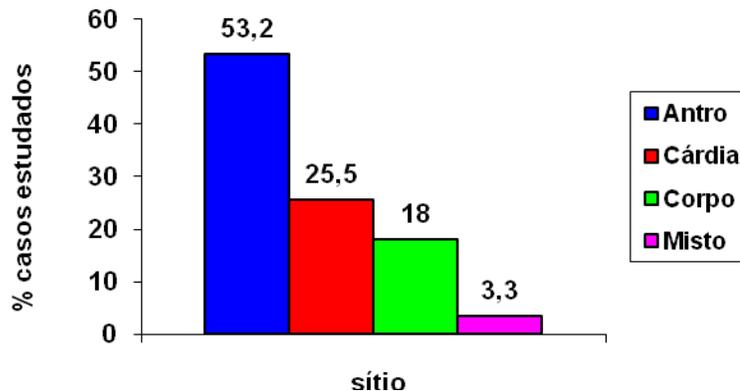
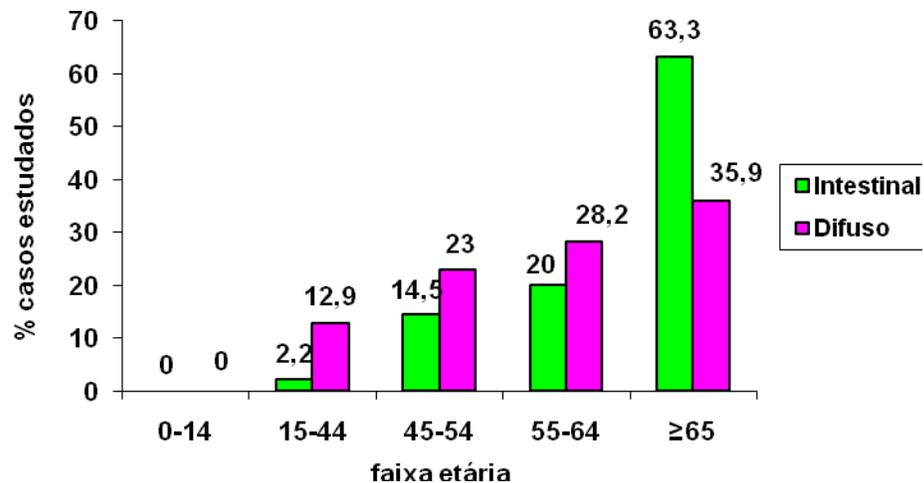


FIGURA 24: Percentual de casos de carcinoma gástrico com infecção por *H. pylori* estudados, distribuídos quanto ao sítio dos tumores (n=94).

#### 4.3.1. Resultados Histopatológicos dos tumores com infecção por *H. pylori*

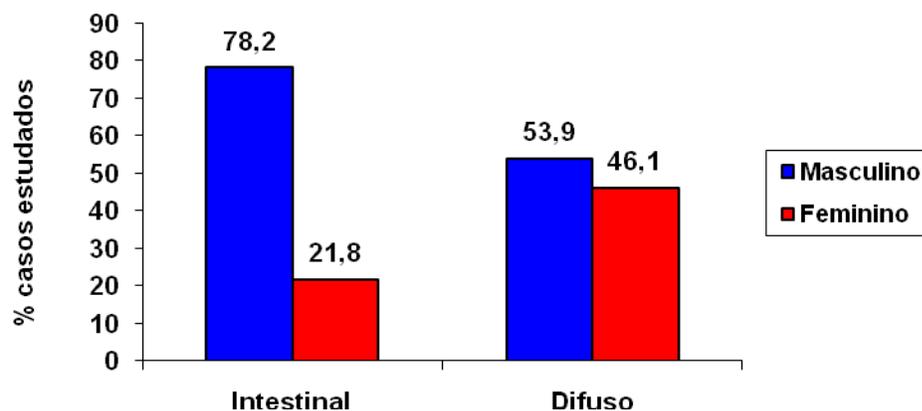
A análise histopatológica dos tumores associados à infecção por *H. pylori* não revelou diferença significativa quanto à presença de infecção entre os tipos intestinal (58,5%) e difuso

(41,5%), embora os tumores do tipo intestinal tenham sido um pouco mais frequentes. Em relação à faixa etária, houve um aumento progressivo do número de tumores com o aumento da faixa etária em ambos os tipos tumorais ( $p = 0,026$ ). Entretanto, os tumores do tipo intestinal foram predominantes (63,3%) na faixa  $\geq 65$  (FIGURA 25), possuindo frequências inferiores às dos tumores do tipo difuso nas faixas etárias inferiores a 65 anos. O tipo difuso, por sua vez, foi predominante (64,1%) nas faixas etárias até 64 anos.



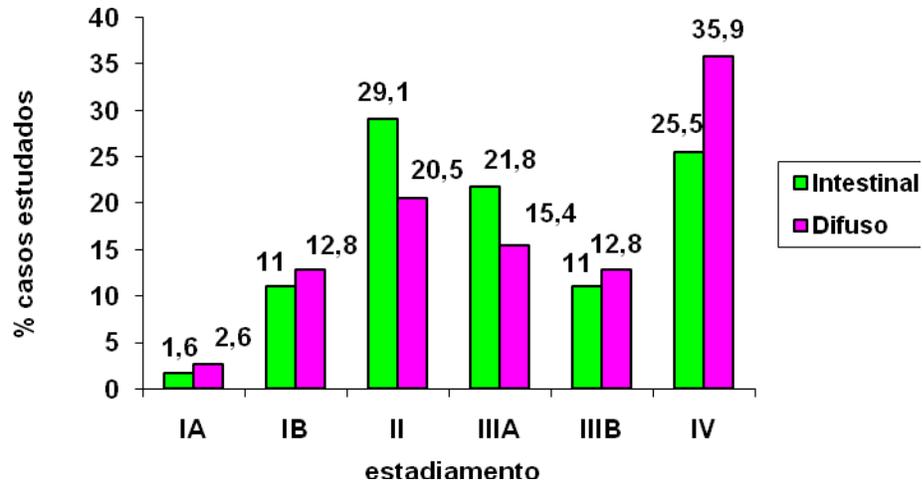
**FIGURA 25:** Percentual de casos de carcinoma gástrico com infecção por *H. pylori* estudados, distribuídos quanto à classificação de Lauren e a faixa etária dos pacientes ( $n=94$ ,  $p = 0,026$ ).

Considerando-se o sexo dos pacientes em relação aos tipos histológicos, verificou-se uma frequência superior estatisticamente significativa do tipo intestinal no sexo masculino ( $p = 0,013$ ), enquanto que no tipo difuso não se verificou diferença entre os sexos (FIGURA 26).



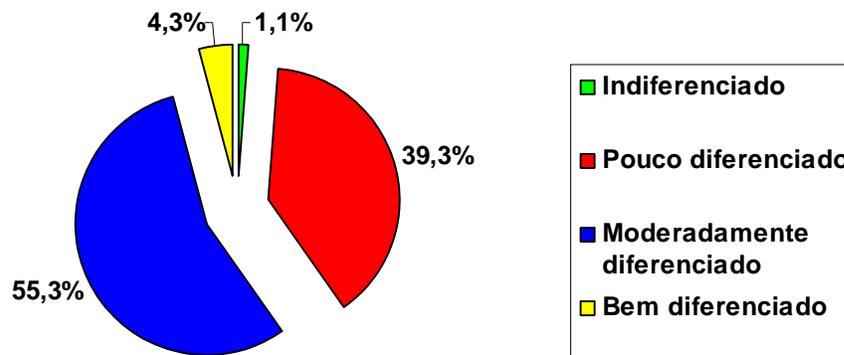
**FIGURA 26:** Percentual de casos de carcinoma gástrico com infecção por *H. pylori* estudados, distribuídos quanto à classificação de Låuren e ao sexo dos pacientes (n=94, teste de Mantel-Haenszel,  $p=0.013$ ).

Quanto ao estadiamento, nota-se maior freqüência de tumores infectados com *H. pylori* entre os estadiamentos II, IIIA e IV, havendo diferença estatística ( $p = 0,012$ ). Quando se distribui o estadiamento de acordo com os tipos histológicos dos tumores infectados com *H. pylori*, não se verifica diferença significativa ( $p = 0,822$ ) entre os tipos intestinal e difuso (FIGURA 27).



**FIGURA 27:** Percentual de casos de carcinoma gástrico com infecção por *H. pylori* estudados, distribuídos quanto à classificação de Låuren e estadiamento dos tumores (n=94,  $p=0,822$ ).

Em relação ao grau de diferenciação dos tumores (FIGURA 28), os moderadamente diferenciados (55,3%) representaram a maior freqüência dos casos estudados com infecção por *H. pylori*, seguidos dos pouco diferenciados (39,3%).



**FIGURA 28:** Percentual de casos de carcinoma gástrico com infecção por *H. pylori* estudados, distribuídos quanto ao grau de diferenciação dos tumores (n=94).

#### 4.3.2. Análise dos tumores com infecção e genótipo de *H. pylori*

O gene *cagA* estava presente em 61/94 (64,9%) dos casos estudados (FIGURA 29). Quanto ao gene *vacA*, verificou-se que quanto a região *s*, *s1* foi predominante com 89,4% dos casos, quanto a região *m*, *m1* foi mais freqüente, com 79,8% dos casos. Foi observado uma relação, estatisticamente significativa ( $p= 0.000$ ), entre os genótipos *s1* e *m1* de *vacA* no câncer gástrico, onde esse subtipo foi encontrado em 75,5% (71/94) dos casos. A figura 30 mostra a distribuição dos genótipos em relação às variações das regiões *s* e *m* de *vacA* encontrada na amostra estudada.

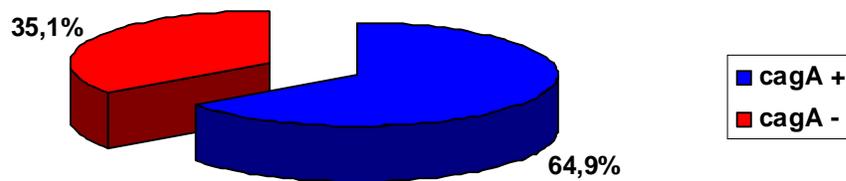


FIGURA 29: Percentual de casos de carcinoma gástrico com infecção por *H. pylori* estudados, distribuídos quanto a presença do gene *cagA* (n=94).

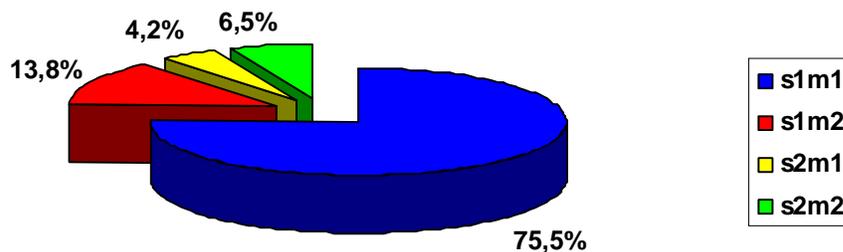


FIGURA 30: Percentual de casos de carcinoma gástrico com infecção por *H. pylori* estudados, distribuídos quanto aos subtipos do gene *vacA* (n=94).

Observando-se a concomitância do gene *cagA* e as variações alélicas do gene *vacA*, verificou-se associação estatisticamente significativa de *cagA*(+) com *vacAs1m1* ( $p=0,003$ ) (FIGURA 31).

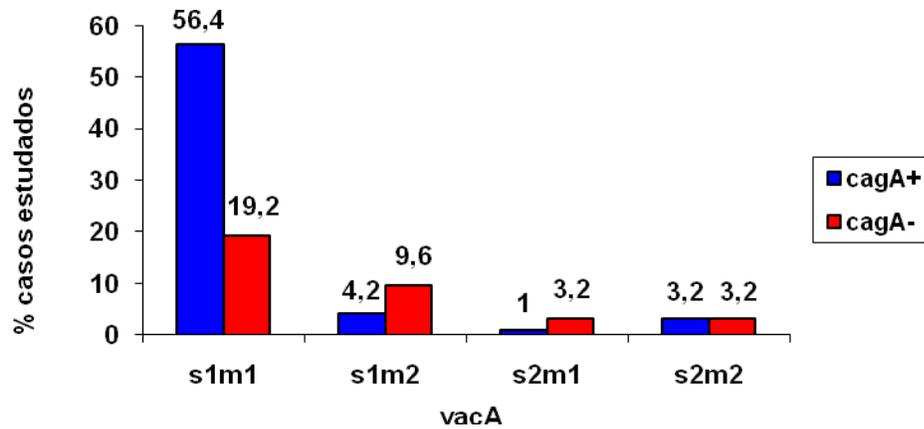


FIGURA 31: Percentual de casos de carcinoma gástrico com infecção por *H. pylori* estudados, distribuídos quanto a presença do gene *cagA* e aos subtipos do gene *vacA* (n=94, Teste Exato de Fisher  $p=0.003$ ).

A frequência dos genes *cagE* e *virB11*, na amostra estudada, foram 53,2% (50/94) e 60,6% (57/94), respectivamente. A figura 32 ilustra um gel de agarose corado com Brometo de Etídeo. A tabela 4 mostra a associação da presença dos genes *cagA*, *cagE* e *virB11* nos casos de câncer gástrico com infecção por *H. pylori* (*ureC*). Verifica-se que o genótipo de *H. pylori* mais freqüente foi *cagA*(+), *cagE*(+) e *virB11*(+), com 38,3%(36/94), seguidas do genótipo *cagA*(+), *cagE*(-) e *virB11*(-), com 18,1% (17/94) e de cepas com ausência de genes da ilha de patogenicidade, com 18,1% (17/94). Considerando-se pelo menos um marcador do lado direito (*cagA* e/ou *cagE*) e o marcador do lado esquerdo (*virB11*) verificamos uma frequência de 56,4%.

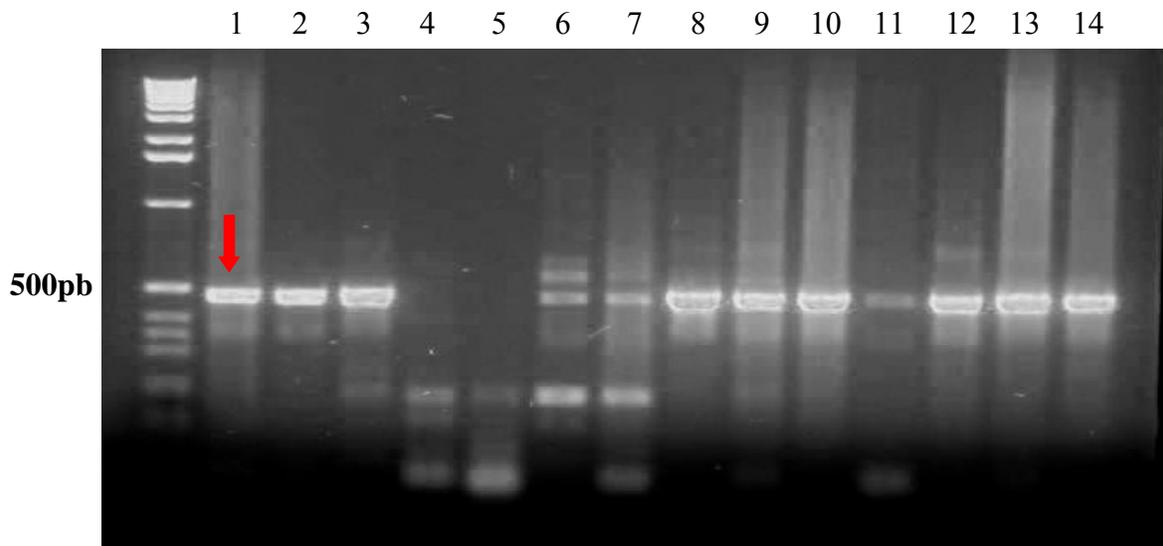


FIGURA 32: Detecção do gene *virB11* em gel de agarose a 2% corado com Brometo de Etídeo. A seta mostra um fragmento amplificado de 491pb. Os casos 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14 foram positivos e os casos 4 e 5 foram negativos.

**TABELA 4: Agrupamento dos genótipos de *H. pylori* segundo os genes *cagA*, *cagE* e *virB11***

<i>ureC</i>	<i>cagA</i>	<i>cagE</i>	<i>virB11</i>	TOTAL (94/100%)
+	+	+	+	36/94(38,3%)
+	+	+	-	2/94 (2,2%)
+	+	-	+	6/94 (6,4%)
+	+	-	-	17/94 (18,1%)
+	-	+	+	11/94 (11,7%)
+	-	+	-	1/94 (1%)
+	-	-	+	4/94 (4,2%)
+	-	-	-	17/94 (18,1%)

Com o objetivo de verificar a influência de determinados genótipos de *H. pylori* nos tumores gástricos, agrupou-se os casos levando-se em consideração a integridade de *cag*-PAI e os subtipos de *vacA*. Dentro deste contexto, os casos de câncer gástrico foram divididos em três grupos: A, casos com genótipo *vacAs1m1*; B, casos com genótipos *vacAs1m2* ou *vacAs2m1*, considerados moderadamente patogênicos, e C, casos com genótipo *vacAs2m2*, considerados menos patogênicos. Além disso, os genes foram considerados marcadores de integridade pelo seu posicionamento na ilha, dessa forma, *cagA* e *cagE* são considerados marcadores do lado direito e *virB11* do lado esquerdo. Dentro desse aspecto, dividiram-se os grupos acima em quatro subgrupos cada um. O primeiro subgrupo representa os casos que possuíam os três genes usados como marcadores de *cag*-PAI (A1, B1 e C1), o segundo representa os casos que possuíam, pelo menos, um marcador do lado direito da ilha e o marcador do lado esquerdo (A2, B2 e C2), o terceiro era composto dos casos que apresentavam apenas um gene de *cag*-PAI ou que apresentassem os dois marcadores do lado direito da ilha (A3, B3 e C3) e o quarto subgrupo era formado pelos casos que não apresentava nenhum dos três genes da ilha de patogenicidade de *H. pylori* (A4, B4 e C4). Dentro desses agrupamentos, verificou-se que o grupo mais freqüente foi aquele que apresentava o genótipo *vacAs1m1* [A= 71/94 (75,5%)], seguido dos grupos B (*vacAs1m2* e *vacAs2m1*), com 18,1% (17/94) e C, com 6,4% (6/94). A tabela 5 mostra a freqüência desses grupos genotípicos nos casos estudados, vale destacar o grupo A1, que concentra 34/94 (36,2%) da amostra analisada.

**TABELA 5: Agrupamento dos genótipos de *H. pylori* segundo a integridade de *cag*-PAI e os subtipos do gene *vacA*.**

<b>GRUPOA: vacAs1m1</b>	<b>71/94(75,5%)</b>
GRUPO A1: <i>cagA</i> (+), <i>cagE</i> (+) e <i>virB11</i> (+)	34/94(36,2%)
GRUPO A2: <i>cagA</i> (+) e <i>virB11</i> (+); <i>cagE</i> (+) e <i>virB11</i> (+)	14/94(14,9%)
GRUPO A3: <i>cagA</i> (+) ou <i>cagE</i> (+) ou <i>virB11</i> (+) ou <i>cagA</i> (+) <i>cagE</i> (+)	15/94(16%)
GRUPO A4: <i>ureC</i> (+)	08/94(8,5%)
<b>GRUPO B: vacAs1m2 e vacAs2m1</b>	<b>17/94(18,1%)</b>
GRUPO B1: <i>cagA</i> (+), <i>cagE</i> (+) e <i>virB11</i> (+)	02/94(2,1%)
GRUPO B2: <i>cagA</i> (+) e <i>virB11</i> (+); <i>cagE</i> (+) e <i>virB11</i> (+)	02/94(2,1%)
GRUPO B3: <i>cagA</i> (+) ou <i>cagE</i> (+) ou <i>virB11</i> (+) ou <i>cagA</i> (+) <i>cagE</i> (+)	07/94(7,4%)
GRUPO B4: <i>ureC</i> (+)	06/94(6,4%)
<b>GRUPO C: vacAs2m2</b>	<b>06/94(6,4%)</b>
GRUPO C1: <i>cagA</i> (+), <i>cagE</i> (+) e <i>virB11</i> (+)	00/94(0%)
GRUPO C2: <i>cagA</i> (+) e <i>virB11</i> (+); <i>cagE</i> (+) e <i>virB11</i> (+)	01/94(1,1%)
GRUPO C3: <i>cagA</i> (+) ou <i>cagE</i> (+) ou <i>virB11</i> (+) ou <i>cagA</i> (+) <i>cagE</i> (+)	02/94(2,1%)
GRUPO C4: <i>ureC</i> (+)	03/94(3,2%)

Com base na hipótese da virulência de *H. pylori* associada à integridade da ilha e aos subtipos da *vacA* foram realizadas as análises clínico – epidemiológicas relacionadas a esses grupos.

A fim de verificar a interferência de fatores de risco nos casos de câncer gástrico com infecção por *H. pylori*, associou-se o tabagismo e o etilismo, concomitantemente, aos grupos estabelecidos. A tabela 6 mostra a frequência de casos de pacientes com esses dois fatores de risco distribuídos nos diversos grupos genotípicos estabelecidos para *H. pylori*. Por essa tabela, verifica-se que entre os genótipos menos patogênicos (A3, A4, B3, B4, C3 e C4), encontram-se 53,8% dos pacientes etilistas e tabagistas.

**TABELA 6: Associação dos grupos estabelecidos com etilismo e tabagismo, concomitante.**

<b>GRUPOS</b>	<b>ETILISMO E TABAGISMO (n=39)</b>
A1	8/34 (23,5%)
A2	8/14 (57,1%)
A3	9/15(60%)
A4	5/8 (62%)
B1	1/2 (50%)
B2	0/2 (0%)
B3	2/7 (28,6%)
B4	3/6 (50%)
C1	0/0 (0%)
C2	1/1 (100%)
C3	1/2 (50%)
C4	1/3 (33,3%)

As análises dos grupos foram restritas aos grupos A e B devido aos poucos casos pertencentes ao grupo C.

#### **4.3.2. Análise dos tumores gástricos associados ao genótipo de *H. pylori***

Quanto ao sexo, observou-se que os pacientes do sexo feminino foram mais freqüentes que os do sexo masculino nos grupos A1 e A2, situação que se inverte nos grupos A3 e A4 (FIGURA 33). No grupo B, os pacientes do sexo masculino foram mais freqüentes que os indivíduos do sexo feminino nos grupos B1 e B4 (FIGURA 34). É interessante observar que o sexo masculino é predominante nas cepas com ausência da ilha.

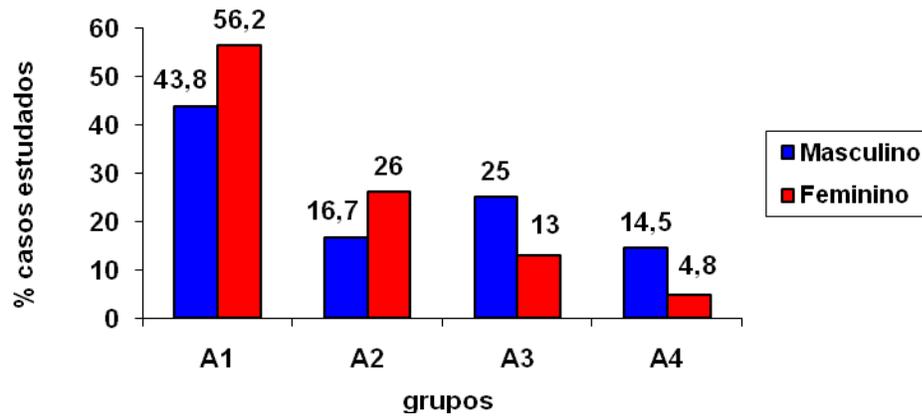


FIGURA 33: Percentual de casos de carcinoma gástrico com infecção por *H. pylori* estudados, distribuídos quanto aos grupos estabelecidos e o sexo dos pacientes (n=71).

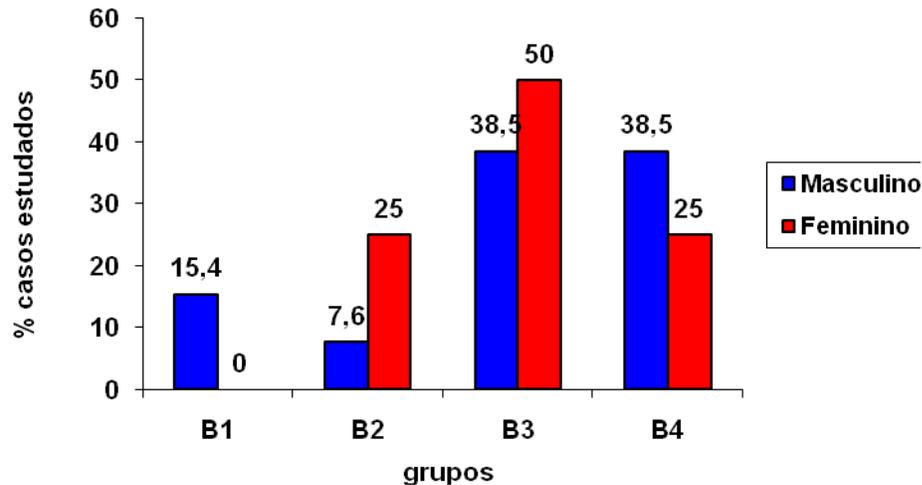


FIGURA 34: Percentual de casos de carcinoma gástrico com infecção por *H. pylori* estudados, distribuídos quanto aos grupos estabelecidos e o sexo dos pacientes (n=17).

Por serem os sítios anatômicos mais freqüentes na amostra estudada, analisou-se antro e cárdia quando aos grupos de genótipos (FIGURA 35). Considerando a integridade da ilha, observa-se uma relação inversa entre a integridade e os tumores localizados no antro gástrico. O antro gástrico foi mais freqüente nos grupo A1, enquanto a cárdia foi predominante no grupo A3. No grupo A4, sem *cag*-PAI, parece não haver predomínio de sítio anatômico. Por outro lado, no grupo B observa-se um aumento da freqüência de tumores localizados no antro com a perda da integridade da ilha. Da mesma forma que os tumores do grupo A4, os tumores do grupo B4 mostram um comportamento diferente, com alta incidência dos tumores na cárdia. (FIGURA 36).

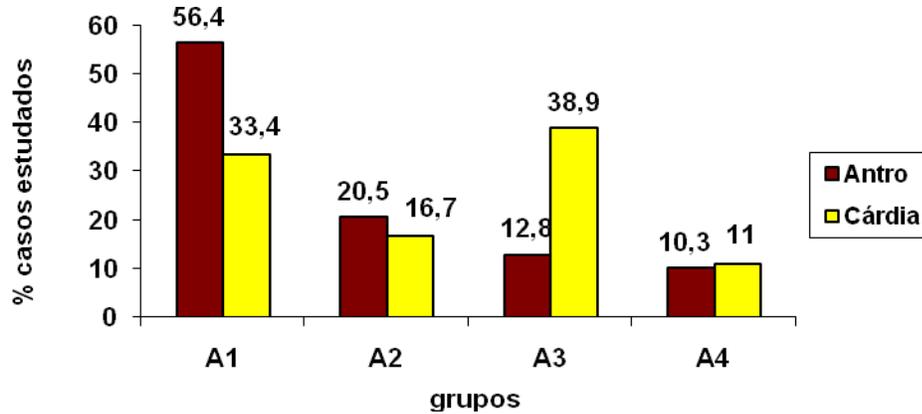


FIGURA 35: Percentual de casos de carcinoma gástrico com infecção por *H. pylori* estudados, distribuídos quanto aos grupos estabelecidos e o sítio dos tumores (n=71).

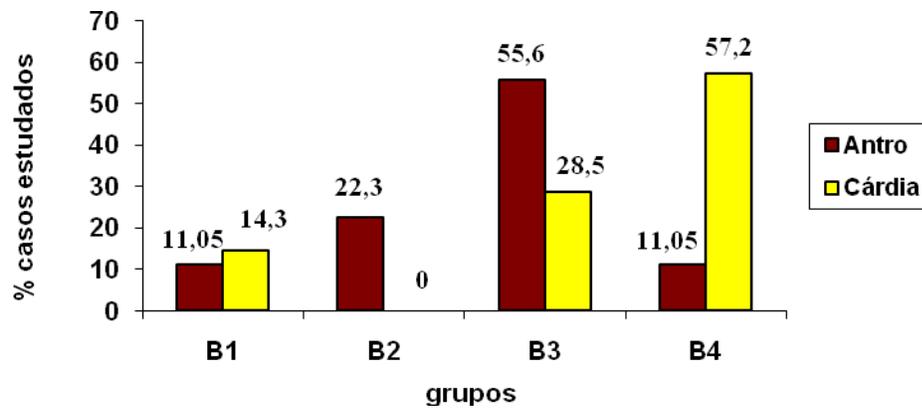


FIGURA 36: Percentual de casos de carcinoma gástrico com infecção por *H. pylori* estudados, distribuídos quanto aos grupos estabelecidos e o sítio dos tumores (n=17).

Considerando-se a histopatologia dos tumores e os grupos estabelecidos, verificou-se que no grupo A, houve uma distribuição semelhante dos tipos intestinal e difuso, exceto no subgrupo A4, onde as cepas apresentam apenas *vacAs1m1*, sem nenhum dos componentes de *cag*-PAI estudados, onde a relação difuso/intestinal foi de 2,5 (FIGURA 37). No grupo B, houve ligeiro predomínio do tipo difuso nos subgrupos B1 e B2 e do tipo intestinal nos subgrupos B3 e B4, contudo a maior frequência dos casos estava nos subgrupos B3 e B4, cujas cepas são menos patogênicas (FIGURA 38). Considerando-se somente a integridade da ilha (B1, B2 e B3), observa-se um aumento dos tumores intestinais com a diminuição da integridade da ilha, de certa forma, o mesmo acontece com os tumores do tipo difuso.

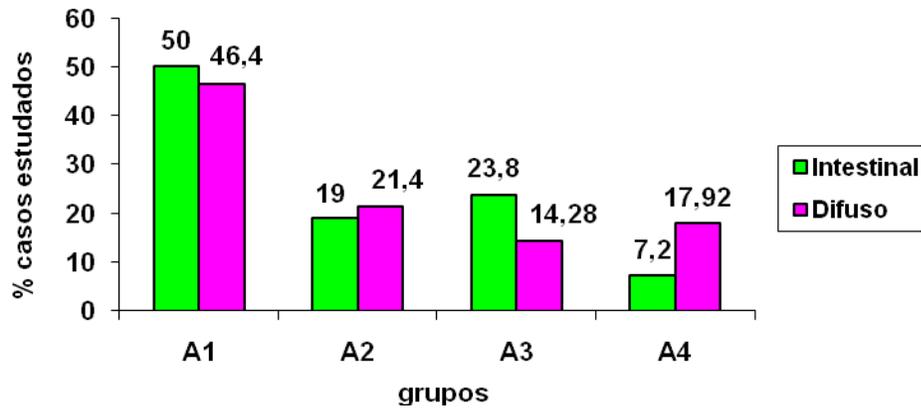


FIGURA 37: Percentual de casos de carcinoma gástrico com infecção por *H. pylori* estudados, distribuídos quanto aos grupos estabelecidos e a classificação de Låuren (n=71).

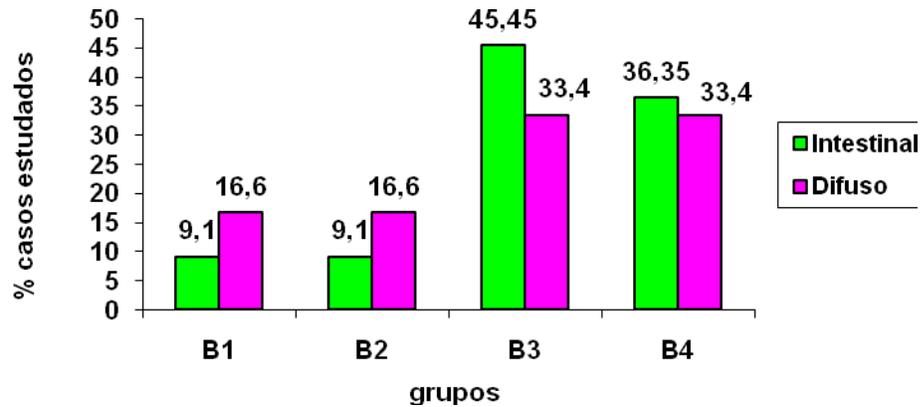


FIGURA 38: Percentual de casos de carcinoma gástrico com infecção por *H. pylori* estudados, distribuídos quanto aos grupos estabelecidos e a classificação de Låuren (n=17).

Quanto ao estadiamento tumoral (FIGURA 39), considerando-se o grupo A observa-se, de modo geral, uma diminuição de freqüência dos grupos de *H. pylori* de acordo com a ausência de genes bacterianos estudados dentro de cada estadiamento. Este fato é bem caracterizado nos estádios II, IV e pode-se incluir o estádios III se considerados os estadiamentos IIIA e IIIB juntos, já que a representação dos tumores classificados em IIIB foi pequena. Apesar da presença somente dos grupos genotípicos A3 e A4 no estadiamento IA, este possui apenas 4 casos, sendo que destes, apenas 2 apresentam infecção por *H. pylori*, o que impossibilita maiores inferências. Verifica-se, ainda, que os tumores dos outros grupos estão presentes em todos os estadiamentos. Os grupos que não pertenciam ao grupo A foram denominados de “outros” a fim de se estabelecer um parâmetro de comparação.

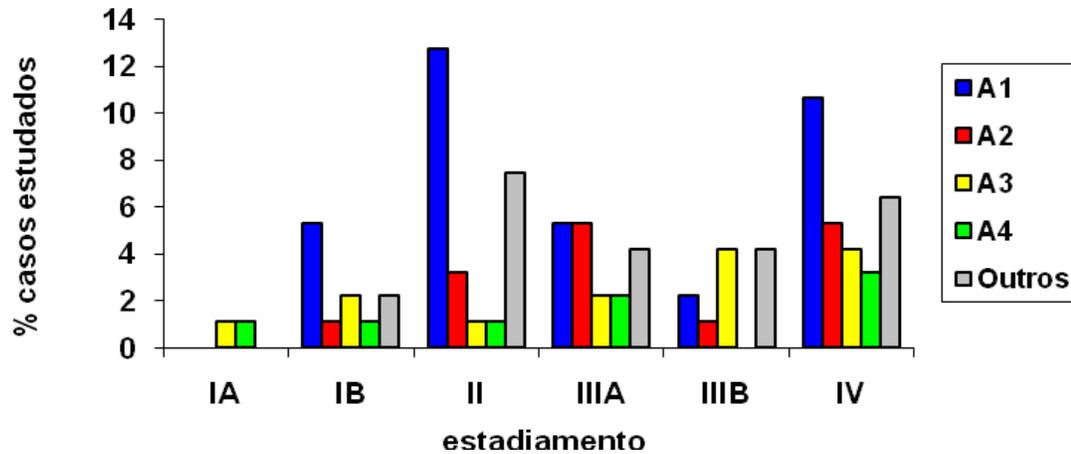


FIGURA 39: Percentual de casos de carcinoma gástrico com infecção por *H. pylori* estudados, distribuídos quanto ao estadiamento dos tumores (n=94).

Considerando-se a diferenciação dos tumores, dentro de todos os subgrupos, os tumores moderadamente diferenciados foram os mais frequentes em todos os subgrupos, excetuando-se o grupo A3 (FIGURA 40). Por outro lado, No grupo B, foi observada uma frequência semelhante dos tumores pouco e moderadamente em todos os grupos, excetuando-se o grupo B3, onde os tumores pouco diferenciados foram mais frequentes (FIGURA 41). A tabela 7 mostra a distribuição dos casos do grupo C quanto aos dados clínico-epidemiológicos e histopatológicos.

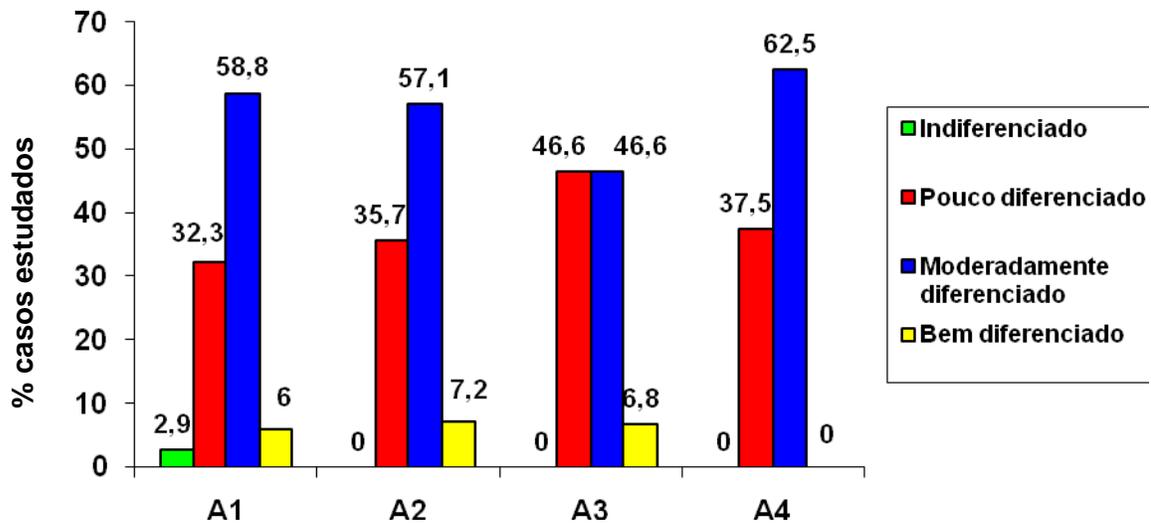


FIGURA 40: Percentual de casos de carcinoma gástrico com infecção por *H. pylori* estudados, distribuídos quanto aos grupos estabelecidos e a diferenciação dos tumores (n=71).

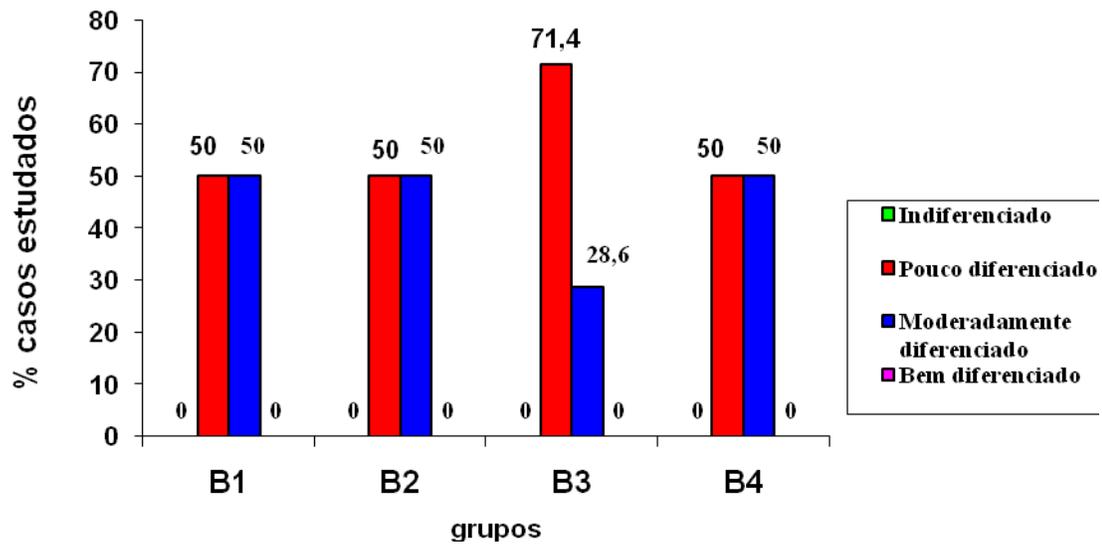


FIGURA 41: Percentual de casos de carcinoma gástrico com infecção por *H. pylori* estudados, distribuídos quanto aos grupos estabelecidos e a diferenciação dos tumores (n=17).

TABELA 7: Distribuição dos casos de câncer gástrico do grupo C quanto aos dados clínico-epidemiológicos e histopatológicos.

	<i>TOTAL</i>	<i>C1</i>	<i>C2</i>	<i>C3</i>	<i>C4</i>
<b>Sexo</b>	<b>6</b>				
Masculino	3	0	1	1	1
Feminino	3	0	0	1	2
<b>Sítio Anatômico</b>	<b>6</b>				
Antro	2	0	0	2	0
Cárdia	0	0	0	0	0
Corpo	3	0	1	0	2
Misto	1	0	0	0	1
<b>Tipo Histológico</b>	<b>6</b>				
Intestinal	2	0	0	1	1
Difuso	4	0	1	1	2
<b>Estadiamento</b>	<b>6</b>				
IA	0	0	0	0	0
IB	1	0	0	1	0
II	3	0	0	1	0
IIIA	0	0	0	0	2
IIIB	1	0	0	0	0
IV	1	0	1	0	1
<b>Diferenciação tumoral</b>	<b>6</b>				
Indiferenciado	0	0	0	0	0
Pouco	4	0	1	1	2
Moderado	2	0	0	1	1
Bem	0	0	0	0	0

## **5. Discussão**

### **5.1. Análise Clínico-Epidemiológica**

A estimativa do INCA (2007) para o ano de 2008 é de 1.090 novos casos de câncer gástrico no Estado do Ceará, sendo estimados 290 casos apenas em Fortaleza. Essas projeções colocam o Estado do Ceará no sexto lugar em número de novos casos de câncer de estômago, estando logo atrás dos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Paraná e Rio Grande do Sul, ao mesmo tempo em que situa Fortaleza no quinto lugar em número de novos casos entre as capitais, atrás apenas de São Paulo (SP), Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG) e Belém (PA). Esses dados revelam a importância do câncer gástrico no Estado do Ceará e a necessidade de estudos que possam ajudar a entender os fatores etiológicos dessa neoplasia com a consequente melhoria na prevenção e tratamento dessa neoplasia.

Neste estudo, verificaram-se frequências similares entre os pacientes oriundos da cidade de Fortaleza (43,4%) e dos municípios do interior do Estado (42,5%), além de um menor número de casos provenientes dos demais municípios da região metropolitana (14,1%). Considerando a inclusão aleatória de casos, esses dados devem refletir a real demanda de atendimento no Hospital Universitário Walter Catídeo e na Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza, demonstrando uma representatividade real de casos de tumores gástricos do estado do Ceará.

Considerando-se a atividade profissional dos pacientes, verificou-se o predomínio de profissões como agricultor, do lar e aposentados, em detrimento de profissões de nível superior, observando-se que a maioria dos indivíduos pertencia à classe socioeconômica pobre. Vale ressaltar que esse achado pode estar refletindo a clientela dos hospitais onde foram realizadas as coletas, visto que esses atendem, predominantemente, através do Sistema Único de Saúde - SUS. Entretanto, tem sido relatado que, em geral, a incidência de câncer gástrico é duas a três vezes maior nos países em desenvolvimento (PARKIN et al., 2005; INCA, 2007), sugerindo que a situação socioeconômica possa estar relacionada (NISHIMOTO et al, 2002; ALBERTS et al., 2003).

A maior incidência de câncer gástrico no sexo masculino relatada na literatura mundial e de outros estados do Brasil foi reproduzida neste estudo, onde os indivíduos do sexo masculino foram, aproximadamente, duas vezes mais acometidos que as mulheres (DE STEFANI et al.,

1990; CIPRIANI et al., 1991; CÉSAR et al., 2002; RODER, 2002; SIPPONEN e CORREA, 2002; ALBERTS et al., 2003; CUNNINGHAM et al., 2005; PARKIN et al., 2005). Segundo a estimativa do INCA (2007) para o ano de 2008 no Brasil, são previstos em torno de 22 mil novos casos de câncer gástrico, sendo 14 mil para os homens e 8mil para mulheres. Na região nordeste, sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer gástrico é a segunda neoplasia mais freqüente entre os homens e a quarta entre as mulheres. Para Estado do Ceará, são previstos 1.090 novos casos de câncer de estomago, sendo que 680 novos casos para o sexo masculino e 410 para o sexo feminino.

O caráter tardio do acometimento do câncer gástrico foi também observado neste estudo. De acordo com a revisão feita por César et al., (2002), o câncer de estômago afeta mais indivíduos da terceira idade, apresentando baixa freqüência aos 40 anos e aumentando progressivamente com a idade atingindo valores mais elevados por volta dos 70 anos. A variação etária encontrada neste estudo foi bastante ampla, de 23 a 90 anos. Verificou-se, ainda, maior freqüência de indivíduos acima de 55 anos, achado esse, compatível com de outros estudos (STADTLÄNDER e WATERBOR, 1999; CREW e NEUGUT, 2006). De fato, a maior incidência do sexo masculino é evidenciada em todas as faixas etárias, mas se destaca na faixa de idade acima de 65 anos enquanto no sexo feminino observa-se um aumento gradativo com a idade.

Apesar de a literatura relatar uma maior incidência de câncer gástrico nos indivíduos do sexo masculino e negro (CORREA, 2003; CREW e NEUGUT, 2006), na nossa amostra a maior incidência foi da cor parda. Essa discordância talvez possa ser explicada pela baixa freqüência de negros na população estudada e a alta incidência de pardos, a qual pode ser constatada em estudos populacionais em andamento no laboratório em que foi desenvolvido esse projeto.

A historia familiar é também um fator relevante para o desenvolvimento do câncer gástrico (LA VECCHIA et al., 1992; PALLI et al., 1994; LISSOWSKA et al., 1999; CREW e NEUGUT, 2006; SMITH et al., 2006). Estudos realizados a fim de identificar alterações genéticas que possam estar relacionadas a um maior risco de desenvolvimento de câncer gástrico em membros de uma mesma família apresentaram resultados promissores nos adenocarcinomas do tipo difuso quanto à mutação da E-caderina (ZHENG et al., 2004; LYNCH et al., 2005; ROVIELLO et al, 2007). Apesar do caráter hereditário não ter sido analisado em detalhes neste estudo, inclusive pela dificuldade dos pacientes saberem o tipo de câncer acometido nos indivíduos de sua família, verificou-se que a história familiar de câncer, considerando parentesco

até segundo grau, estava presente em 33,8% (34/101) dos pacientes, entretanto, Palli et al., (1994) encontraram uma freqüência de 14,6% entre pacientes com história familiar.

Alguns estudos têm demonstrado uma significativa relação entre o tabagismo e o risco de desenvolvimento de câncer gástrico tanto para fumantes ativos como passivos cujo efeito parece ser mais pronunciado (CHAO et al., 2002; GONZALES et al., 2003; KOIZUMI et al., 2004). No presente estudo, verificou-se um importante percentual de pacientes fumantes 65,5% (59/90), esses achados corroboram com os de Teixeira e Nogueira (2003), em estudo realizado no interior do Estado de São Paulo, no qual a freqüência de pacientes fumantes foi de 66,7%.

Apesar de não haver evidências conclusivas sobre o aumento do risco de câncer gástrico associado ao etilismo há indícios de que sua ação seja sinérgica a do fumo (YOU et al, 2000; KATO et al, 2004; CREW e NEUGUT, 2006). A ação do álcool se daria ao nível dos tecidos diretamente expostos, alterando o metabolismo celular, com ação imunossupressora e aumento da susceptibilidade celular aos carcinógenos (TEIXEIRA e NOGUEIRA, 2003). A freqüência verificada neste estudo quanto ao etilismo foi alta (58,2%), apesar de inferior à descrita por Teixeira e Nogueira (70,8%), indicando que este pode ser também um fator de risco relevante no desenvolvimento desta neoplasia. Dos pacientes arrolados no presente estudo, 40,6% eram tabagistas e etilistas e entres estes, 51,2% eram portadores de cepas menos patogênicas de *H. pylori*.

Quanto à localização tumoral foi verificada uma maior freqüência de casos no antro (53,5%), porção distal do estômago seguido da cárdia ou porção proximal (25,9%), os dois principais sítios do adenocarcinoma gástrico. Dados similares são relatados por Lemes et al. (2003) com 59% de casos estudados com localização distal. Figueiredo et al., (2002), em estudo de 222 casos em Portugal, verificaram 53,6% dos carcinomas gástricos localizados no antro e 17,6% na cárdia. O predomínio no terço distal do estômago também é descrito por Shang e Peña (2005), Thomazini et al., (2006) e Luo et al., (2006).

Embora haja relatos recentes, nos EUA, de uma redução nos casos de tumores distais e aumento dos proximais entre os homens, (ALBERTS et al, 2003; CREW et al, 2006), este fato não é ainda homoganeamente distribuído entre os diversos estudos mundiais. Apesar de a maioria dos casos estudados tenham sido observados no antro gástrico, o presente estudo também observou uma freqüência relativa de tumores da cárdia (25,5%), sendo que 88,5% destes eram em indivíduos do sexo masculino Assim sendo, pode-se concluir que a amostragem aqui utilizada

apresenta resultados compatíveis com os demais dados mundiais quanto aos parâmetros clínico-epidemiológicos abordados.

## 5.2. Análise Histopatológica

A análise dos subtipos de adenocarcinoma, nesse estudo, demonstrou um ligeiro aumento de frequência dos tumores de tipo intestinal (57,5%) de Låuren, esse achado corrobora com outros estudos os quais não encontraram predomínio de um dos tipos histológicos, verificando frequências entre 51% e 58,6% de tumores do tipo intestinal e de 34% a 41,3% do tipo difuso (PEREIRA et al., 2001; LEMES et al., 2003; OLUWASOLA e OGUNBIYI, 2003; LOPES et al., 2004; CREW e NEUGUT, 2006). O tipo intestinal demonstra uma maior associação com indivíduos do sexo masculino e com pessoas mais velhas, dados verificados no presente estudo, onde 75,8% dos pacientes portadores de tumores do tipo intestinal eram do sexo masculino. (CÉSAR et al., 2002; RODER et al., 2002; NARDONE et al., 2003; SHANG e PEÑA, 2005). Enquanto que os difusos são relacionados, por alguns autores (CÉSAR et al., 2002; NARDONE, 2003) com o sexo feminino, entretanto, no presente estudo, não houve diferença estatística entre os indivíduos do sexo masculino (55,8%) e do sexo feminino (44,2%) quanto ao tipo difuso. Contudo, considerando-se os tumores do tipo difuso, verificou-se que 57,5% acometiam pacientes do sexo feminino.

A alta frequência de tumores gástricos diagnosticados em estadiamentos mais avançados é relatada na literatura mundial, (CORREA, 2004). O predomínio de neoplasias mais agressivas é percebido pela distribuição dos casos quanto ao estadiamento, demonstrando um aumento gradativo de casos em função da progressão tumoral, 30,7% (31/101) dos casos estudados eram do estadiamento IV, achado este que corrobora com estudos anteriores (ALBERTS et al., 2003; CUNNINGHAM et al., 2005). A presença de tumores mais avançados (IIIA, IIIB e IV), na amostra estudada, provavelmente reflete diagnóstico tardio, principalmente por serem os pacientes de baixa renda. A correlação entre estadiamento tumoral e a faixa etária demonstrou que os adultos jovens (15 - 44 anos), apresentando neoplasias mais avançadas, sendo que 87,5% dos casos dessa faixa etária eram do tipo difuso, que de acordo com a literatura, apresentam um decurso clínico mais agressivo, podendo explicar tal achado (WERNER et al., 2001; ROBBINS e COTRAN, 2005).

Poucos estudos reportam o grau de diferenciação tumoral. Embora tenha sido verificada, neste estudo, alta frequência de tumores pouco diferenciados (40,8%), dados compatíveis com os

achados dos estudos de Lee et al., (2004) e Takano et al. (1999), contrasta com os dados dos mesmos autores em relação aos tumores bem e moderadamente diferenciados. Esses autores constataram-se uma equivalência entre os casos moderadamente e bem diferenciados (22,0% e 25,7%, respectivamente) enquanto que neste estudo os tumores moderadamente diferenciados foram os mais freqüentes (54%) e os bem diferenciados os menos freqüentes. A grande porcentagem de tumores moderadamente diferenciados em detrimento dos bem diferenciados pode refletir o avanço tumoral decorrentes de diagnósticos mais tardios e tumores na sua maior parte em estágio avançado

### **5.3. *H. pylori* e o câncer gástrico**

Dentre as amostras analisadas no presente estudo, a maioria, 93%, apresentou amplificação do gene *ureC* de *H. pylori*. A maior parte dos casos se situou no antro gástrico (53,2%), que corrobora com os relatos de que *H. pylori* é mais freqüentemente detectada em câncer gástrico distal (HANSSON et al., 1995; ANDO et al., 2006; LUO et al., 2006; THOMAZINI et al., 2006). A alta freqüência de infecção por *H. pylori* é compatível com a de diversos outros estudos, tanto na população em geral (CREW et al., 2006) como em pacientes portadores de câncer gástrico, onde a freqüência varia de 59,5% a 95% (HANSSON et al., 1995; ANDO et al., 2006; LUO et al., 2006; THOMAZINI et al., 2006).

O presente estudo verificou que a maioria dos indivíduos portadores de câncer gástrico infectados por *H.pylori* era do sexo masculino (68%), o que é semelhante ao encontrado em estudos realizados em diversos países, como na China (LUO et al., 2006), no qual 70,9% dos pacientes infectados por *H. pylori* eram do sexo masculino. Thomazini et al. (2006) em estudo realizado em Botucatu (SP), encontrou uma freqüência de 57,1%. Quanto à idade dos pacientes, relata-se o aumento da freqüência de indivíduos com câncer gástrico e infecção por *H. pylori* com o aumento da idade (HANSSON et al., 1995; LUO et al., 2006), o que se assemelha ao encontrado no presente estudo, onde a maioria dos pacientes infectados por *H. pylori* tinha mais de 55 anos de idade. É interessante observar que na distribuição dos sexos pela faixa de idade, a infecção por *H. pylori* demonstrou uma tendência a ser mais freqüente no sexo feminino nas faixas inferiores a 64 anos, invertendo essa relação na faixa  $\geq 65$  anos.

#### **5.3.1. *H. pylori* e o câncer gástrico: Análise Histopatológica**

Em relação ao tipo histológico, a literatura relata que a infecção por *H. pylori* está relacionada tanto ao intestinal como ao difuso (HANSSON et al., 1995; THOMAZINI et al.,

2006; LOCHHEAD e EL-OMAR, 2007). Esses relatos corroboram com o do presente estudo, onde as freqüências dos tipos intestinal e difuso em pacientes com infecção por *H. pylori* foram similares.

Poucos estudos relatam a relação de câncer gástrico com infecção por *H. pylori* com o estadiamento tumoral. Luo et al., (2006) verificaram maior freqüência dos tumores com infecção por *H. pylori* no estadiamento II (51,8%), dado que se assemelha aos encontrados neste estudo (49,5%), onde se verificou também uma alta freqüência dos tumores no estadiamento IV. A presença marcante de *H. pylori* no estadiamento II em ambos os estudos poderia ser indicativo de uma associação dessa bactéria com a tumorigênese gástrica, onde cepas selecionadas, juntamente com outros fatores, promoveriam a progressão tumoral. Por outro lado a alta freqüência de tumores do estadiamento IV encontrada no presente estudo seria reflexo da alta freqüência desses tumores amostrados.

Quanto à diferenciação tumoral, verificou-se, no presente estudo, maior freqüência entre os moderadamente e pouco diferenciados, enquanto Luo et al., (2006) encontrou maior freqüência de tumores pouco diferenciados (68,8%). Esses dados sugerem que a presença de *H. pylori* deva estar relacionada com tumores moderadamente ou pouco diferenciados.

Apesar da alta incidência de infecção por *H. pylori* na população mundial, apenas uma pequena parcela desse grupo desenvolve câncer gástrico (KONTUREK et al, 2003; VIETH e STOLE, 2006). A interação da bactéria com o hospedeiro que determina o aparecimento da doença ainda é alvo de numerosas pesquisas. A associação de fatores genéticos do hospedeiro, ambientais e a presença de genes associados à virulência da bactéria, provavelmente determinam as condições para o desenvolvimento de doenças, inclusive do câncer de estômago.

#### **5.4. Genótipos de *H. pylori***

A *H. pylori* é uma das bactérias mais diversificadas geneticamente. Acredita-se que essa variabilidade seja a causa de tantas doenças relacionadas à infecção por esse microrganismo. Dentre os fatores bacterianos, podemos destacar a presença da ilha de patogenicidade, *cag-PAI*, e o gene *vacA*

O gene *vacA* é um importante fator de virulência que está presente em todas as cepas de *H. pylori*, codifica a proteína VacA, que induz a formação de vacúolos em células eucarióticas e estimula a apoptose das células epiteliais. O gene *vacA* apresenta duas regiões variáveis: a região *s*, que codifica o peptídeo sinal, está localizada no final da cadeia 5' e possui dois alelos, *s1* ou *s2*,

sendo que para o alelo *s1* existem três subtipos: *s1a*, *s1b* e *s1c*, entretanto, a maioria dos estudos se restringe a estudar os alelos *s1* e *s2*. A região média (**m**) possui os alelos *m1* ou *m2* (ATHERTON, 1995). A combinação em mosaico dos alelos da região *s* com os alelos da região *m* determina a produção da citotoxina, responsável pelo grau de virulência da bactéria. As cepas portadoras do genótipo *vacA s1m1* produzem grande quantidade de citotoxina, enquanto as cepas *s1m2* produzem quantidade moderada e as cepas *s2m2*, pouca ou nenhuma citotoxina (ATHERTON, 1995; OLIVARES e GISBERT, 2006). No presente estudo, verificou-se, quanto aos alelos de *vacA*, *s1* (89,3%) e *m1* (79,7%), estando associados (*vacAs1m1*) em 75,5%(71/94) dos casos, 18%(17/94) apresentaram os subtipos *vacAs1m2* e *vacAs2m1* e 6,5% (6/94) apresentaram o subtipo *vacAs2m2*. Esses achados corroboram com estudos anteriores, onde *vacAs1m1* está mais relacionado com doenças gastrointestinais mais graves, inclusive com câncer gástrico (BASSO et al., 1998; VAN DOORN et al, 1998; ASHOUR et al., 2002).

Outro importante fator de virulência da *H. pylori* relacionado ao desenvolvimento de doenças gástricas é a *cag*-PAI. Além da presença, a integridade de *cag*-PAI parece ser um fator crítico para a interação entre a bactéria e o hospedeiro e, conseqüentemente, com a gravidade das doenças relacionadas à infecção (JENKS et al., 1998; MAEDA et al., 1999; IKENOUE et al., 2001; KIDD et al., 2001; NILSSON et al., 2003; SOZZI et al., 2005). O gene mais estudado de *cag*-PAI é o *cagA*, que codifica proteína de mesmo nome, esta, por sua vez, é injetada na célula hospedeira via sistema de secreção do tipo IV e induz diversas alterações, além de ser utilizado como marcador de integridade de ilha de patogenicidade. A *cag*-PAI contém genes que codificam o sistema de secreção do tipo IV, este funciona como uma “seringa” utilizada pela bactéria para injetar proteínas na célula hospedeira, dentre esses genes destaca-se o *virB11* devido a sua função e posição crítica no aparato secretório. Além desses genes, a ilha possui outros genes, como o *cagE*, o qual possui sua importância por seu provável envolvimento na indução da secreção de IL-8 pelas células do hospedeiro e também é muito utilizado como marcador de integridade de *cag*-PAI (BLASER et al., 1995; VAN DOORN et al., 1998; KRAUSE, 2000; AUDIBERT, 2001; IKENOUE et al., 2001; SOZZI et al., 2005).

Neste estudo, o gene *cagA* foi detectado em 64,9% dos casos com infecção por *H. pylori*. Em outros estudos verificam-se frequências diversas, principalmente considerando-se a variabilidade regional e de doença associadas. Chomvarin et al., (2008) estudando pacientes da Tailândia com diversas doenças gastrointestinais encontraram uma frequência de 88,4% de *H. pylori cagA*(+). Outros autores estudando várias doenças gastrointestinais verificaram as

seguintes frequências de *cagA*: 66,8% em pacientes espanhóis, 88,9% em Hong Kong, 60,4% nos pacientes portugueses, 90,4% dos colombianos e 26,4% em jordanianos (ALARCÓN et al., 1999; NOGUEIRA et al., 2001; YU et al., 2001; NIMRI et al., 2006). Em relação à frequência de *cagA* em gastrite, Brito et al., (2003) em estudo no estado de Pernambuco verificou *cagA* em 60% dos pacientes, na Costa Rica, Con et al., (2007) verificaram 75,3% de cepas *H. pylori cagA*(+). Em relação ao câncer gástrico, Lin et al., (2004) verificaram que 75,7% dos casos eram *cagA* (+). Em estudos brasileiros, verificou-se uma variação de 54,7% a 100% (EVANS et al., 1998; THOMAZINI et al., 2006), que concordam com os dados do presente estudo.

Nos últimos anos a combinação dos genes *vacA* e *cagA* tem sido bastante estudada e relacionada à diversidade das doenças gastrointestinais, onde a combinação *cagA*, *vacAs1m1* foi associada a doenças mais graves. Ashour et al. (2002) em estudo no Brasil, envolvendo crianças com úlcera duodenal, verificaram uma frequência semelhante ao do presente estudo para o gene *cagA* (69,1%). Em todos os casos de úlcera duodenal estavam presentes os alelos *s1* (100%) e *m1* (84,2%), enquanto o alelo *s2* foi encontrado somente em pacientes que não apresentavam úlcera. Neste estudo, uma associação entre a presença de *cagA* e os alelos *vacAs1m1* foi encontrada para úlcera duodenal. Martins et al (2005), em estudo de pacientes portadores de úlcera péptica na região norte do Brasil, observaram frequência de 78% do gene *cagA* com o subtipo *vacAs1m1*, os quais estiveram significativamente associados. Brito et al (2003), em estudo no estado de Pernambuco, verificaram uma alta prevalência do gene *cagA* associado a úlcera duodenal e gastrite, mas não para *vacAs1*.

No presente estudo, verificou-se uma relação significativa entre a presença do gene *cagA* e o subtipo *vacAs1m1*. A alta frequência desses genes verificada nesse estudo é semelhante à relatada por outros trabalhos. Figueiredo et al (2002) verificaram que cepas com os alelos *s1*, *m1* e *cagA* eram mais prevalentes em pacientes com carcinoma gástrico. Thomazini et al (2006), em estudo conduzido em 42 pacientes com adenocarcinoma gástrico no estado de São Paulo, verificaram frequência bacteriana semelhante à do presente estudo, entretanto, a frequência dos genes *cagA*, *s1*, *m1*, bem como a associação *s1m1* se mostraram inferiores. O gene *cagA* foi detectado em 54,7% dos pacientes, os alelos *s1* e *m1* em 57,1% e 61,9% respectivamente. A associação *s1m1* foi observada em 57,1% dos casos. Menores frequências do genótipo *vacAs1m1* são também relatadas em outras regiões do Brasil, para diferentes desordens gástricas inclusive o câncer, as quais variam de 35% em Belo Horizonte (ASHOUR et al, 2002) a 59% no interior de São Paulo (RIBEIRO et al, 2003; GATTI et al, 2005).

A resposta individual a esses genes é bastante variável dentro de diferentes populações, apesar do real motivo não estar ainda plenamente esclarecido. Acredita-se que características do hospedeiro associadas à virulência da cepa infectante sejam os principais fatores envolvidos na diversidade de doenças causadas por *H. pylori*. Apesar da maior patogenicidade das cepas com o genótipo *cagA*(+) e *vacAs1m1*, a relação entre esses genótipos é ainda desconhecida. Sabe-se que não há uma ligação física entre ambos no cromossomo de *H. pylori* (ASHOUR et al, 2001), entretanto, é possível que ocorra uma ação sinérgica entre esses genes, ou entre seus produtos. Sendo que os diferentes fenótipos, talvez induzidos por fatores do hospedeiro, resultem em resposta inflamatória com diferentes proporções. Confirmando essa sugestão, foi observada no presente estudo uma alta frequência de *cagA* e *vacAs1m1* em tumores histologicamente avançados e clinicamente agressivos.

Quanto a presença do gene *cagE*, verificou-se que 53,2% (50/94) dos caso estudados portavam esse gene. Erzin et al. (2006), em estudo realizado na Turquia, verificaram uma frequência de 59,3% de *cagE* em diversas desordens gástricas e frequência de 81,8%, considerando-se apenas os casos de câncer de estômago, verificando, inclusive, associação da presença desse gene com o desenvolvimento de úlcera duodenal e de câncer gástrico. Apesar de existir na literatura estudos com o gene *cagE*, a grande maioria não inclui o câncer gástrico ou este é agrupado em um número pequeno, junto a outras doenças gástricas. Lehours et al. (2004), verificaram que o gene *cagE* estava presente em 48,8% dos casos de MALT e em 56,4% dos casos de gastrite. Chomvarin et al. (2008), estudando paciente com dispepsia, demonstraram uma frequência de *cagE* de 88,4%. Audibert et al. (2001), analisando a estrutura de *cag*-PAI em pacientes com diversas doenças do trato gastrointestinal, verificaram uma frequência de 53,8% de *cagE* em casos em que *cag*-PAI estava intacta, mostrando, inclusive sua importância nessa função. Kauser et al. (2004) analisando cepas de pacientes de oito países, a fim de verificar a integridade de *cag*-PAI, observaram as seguintes frequências de *cagE*: 100%, nas cepas japonesas e da Espanha, 95,3% nas cepas peruanas, 94,7% nas cepas africanas, 80,9% nas cepas indianas, 80% nas cepas de Costa Rica, 71,2% nas cepas provenientes da Inglaterra e 68,4% nas cepas irlandesas. Em estudo apenas com pacientes ingleses com úlcera, Kauser et al. (2005) encontraram *cagE* em 71,2% das cepas estudadas, Módena et al. (2007) em estudo realizado em Ribeirão Preto, interior do estado de São Paulo, com pacientes portadores de diversas desordens gastrointestinais, verificaram a presença de *cagE* em 86,2% dos pacientes com gastrite e 97,8% dos pacientes com úlcera. Esse achado é superior ao do presente estudo, contudo, essa diferença

pode estar relacionada com a doença estudada. Como se pode observar são poucos os estudos que incluem o câncer gástrico, mas as diferentes freqüências de *cagE* caracterizam a diversidade encontrada nas diferentes cepas circulantes de *H. pylori*.

Embora seja um importante componente do sistema de secreção do tipo IV de *H. pylori*, o gene *virB11* ainda é pouco estudado, principalmente em relação ao câncer gástrico. No presente estudo, o primeiro realizado com esse gene no Brasil, a freqüência de *virB11* foi 60,6% (57/94). Tomasini et al. (2003) encontraram *virB11* em 90% dos casos de pacientes com dispepsia, enquanto que Sozzi et al. (2005), verificaram sua presença em 94,7% dos pacientes com diversas doenças gastrointestinais, ambos os grupos estudaram pacientes italianos. Novamente o encontro de uma maior freqüência em relação aos dados aqui apresentados pode ser relacionados a diferença na patogenia estudada, além de uma possível variabilidade da cepa.

Trabalhos sobre a relação da integridade de *cag*-PAI associada à doença ainda são controversos. Existem diversos genes que são utilizados como marcadores de integridade de *cag*-PAI, mas os estudos variam quanto à escolha desses genes (IKENOUE et al., 2001; OWEN et al., 2001; KAUSER et al., 2004; SOZZI et al., 2005). A importância da integridade deve-se, provavelmente, ao funcionamento do sistema de secreção do tipo IV, pois se alguma das proteínas que o compõe estiver ausente este se torna incapaz de transportar proteínas da bactéria para a célula hospedeira. Como genes marcadores da integridade de *cag*-PAI, utilizam-se os genes *cag*, principalmente o gene *cagA*, contudo, alguns estudos sugerem que o gene *cagE* é melhor marcador (OWEN et al., 2001; SOZZI et al., 2005). Considerando-se a função dos genes e sua utilização como marcadores de integridade, no presente estudo, utilizou-se os genes *cagA* e *cagE*, como marcadores do lado direito da ilha e o gene *virB11*, como marcador do lado esquerdo de *cag*-PAI. Verificou-se, no presente estudo, que 38,3% (36/94) dos casos de adenocarcinoma com infecção por *H. pylori* apresentavam *cag*-PAI íntegra, ou seja, continham os três genes estudados. Entretanto, considerando-se a presença de, pelo menos um marcador do lado direito e o marcador do lado esquerdo, verificou-se uma freqüência de 56,4% (53/94).

Os estudos que consideram a integridade da ilha indicam a existência de uma variação populacional podendo ou não estar associada à gravidade das doenças. Ikenoue et al. (2001) estudaram pacientes portadores de úlcera péptica, câncer gástrico e gastrite crônica, cujas freqüências de *cag*-PAI íntegra encontradas foram 100%, 100% e 92,7%, respectivamente. Vale ressaltar que Ikenoue et al. (2001) estudaram pacientes do Japão, onde a incidência de câncer gástrico é uma das mais altas do mundo (PARKIN et al., 2005). Por outro lado, Kauser et al.

(2004), analisando pacientes de vários países verificaram uma importante variação da integridade de *cag*-PAI entre as populações. Entre as cepas japonesas, 57,1% apresentaram *cag*-PAI intacta, verificando os isolados da Costa Rica, nenhum apresentou ilha íntegra. A frequência dos demais países foram as seguintes: 18,6% nos isolados do Peru, 15,8% nas cepas da Irlanda, 13,3% dos isolados espanhóis, 12% das amostras da Índia, 11,1% dos isolados africanos e 3,03% dos isolados da Inglaterra. Quando esse autor relacionou a integridade da ilha com a severidade das doenças e a integridade de *cag*-PAI não encontrou associação. Entretanto deve se ponderar que neste estudo foram agrupadas cepas de diferentes países e com diversas doenças gastrointestinais e o câncer gástrico não foi agrupado separadamente. Audibert et al. (2001), estudando pacientes com diversas doenças gastrointestinais, sem incluir câncer gástrico, verificaram integridade da ilha em 54,3% das amostras. Tomasini et al. (2003) estudando pacientes italianos com dispepsia, verificaram uma frequência de 75,3% de integridade de *cag*-PAI, enquanto Sozzi et al. (2005), encontraram apenas 57,9%, também em pacientes italianos, contudo eram portadores de gastrite atrófica, gastrite não atrófica e úlcera duodenal. Essas variações podem ser devido a diferentes marcadores utilizados e apontam a necessidade de uma padronização para a escolha de marcadores de integridade os quais devem não considerar apenas a posição dentro da ilha, mas também o potencial de virulência do gene.

Dentre os genes utilizados por diversos estudos, destacam-se os genes *cagA* e *cagE*. O gene *cagA* foi descrito como melhor marcador de *cag*-PAI (JENKS et al., 1998; MAEDA et al., 1999), entretanto, em estudos mais recentes, o gene *cagE* tem sido citado como melhor marcador da integridade da *cag*-PAI que o gene *cagA* (AUDIBERT et al., 2001; IKENOUE et al., 2001; KAUSER et al., 2004; SOZZI et al., 2005). No presente estudo, verificou-se que, em geral, *cagA* foi mais frequentemente detectado que *cagE*, contudo em alguns casos a detecção desses genes não foi sobreposta, mas sim complementares, o que sugere que os dois genes utilizados em conjunto sejam melhores marcadores do lado direito de *cag*-PAI. Com relação à extremidade esquerda de *cag*-PAI, seria necessário outro gene para possibilitar comparações, entretanto este gene teve frequência semelhante à de *cagA* e superior a *cagE*.

A fim de verificar um genótipo predominante em câncer gástrico e a influência deste na severidade da neoplasia, agrupou-se os genes estudados com relação aos subtipos de *vacA* e a integridade de *cag*-PAI. A partir desta distribuição, verificou-se que o genótipo de *H. pylori* mais frequente foi *cag*-PAI intacta e *vacAs1m1* (36,2%), que representa o genótipo de *H. pylori* mais virulento em relação aos padrões considerados no presente estudo. A alta frequência do genótipo

mais virulento nos cânceres gástricos estudados corrobora com a hipótese na qual o desenvolvimento do câncer gástrico estaria associado a cepas mais virulentas. Considerando-se os grupos, verificaram-se vários padrões dependentes da virulência da cepa. Considerando a análise epidemiológica, parece existir uma variação de predominância das cepas de acordo com o sexo, pois apesar das cepas mais virulentas (grupo A1 e A2) serem predominantes em ambos os sexos, nas mulheres estas cepas foram mais frequentes. Por outro lado, no grupo B, onde a associação alélica s1m2 ou s2m1 foi considerada moderadamente virulenta, observa-se o oposto, pois ambos os sexos foram mais frequentes nas cepas menos patogênicas, sendo que os homens foram os únicos representantes do grupo B1, apesar de serem apenas dois casos. Fato interessante é que os homens foram mais frequentes nas cepas sem a presença de marcadores da ilha, independente de *vacA* (A4 e B4). Essa variação, no entanto, pode ser reflexo de fatores de risco associados. Quanto aos aspectos clínico - patológicos, considerando-se apenas a integridade de *cag-PAI*, no grupo A, verifica-se que o antro foi o sítio predominante em indivíduos infectados com as cepas mais patogênicas, enquanto no grupo B, o antro foi o sítio predominante nos pacientes infectados com cepas menos patogênicas (grupo B3). Este fato pode ser relacionado à presença de fatores de risco associados, como o etilismo e o tabagismo nos pacientes infectados com cepas menos virulentas. De fato, 53,8% dos pacientes com cepas menos virulentas eram de pacientes etilistas e tabagistas. Em relação aos tipos histológicos, verifica-se que em todos os grupos genotípicos os tipos intestinal e difuso estavam presentes em variadas frequências, indicando a participação da *H. pylori*, independente da virulência, na etiologia desses tumores. Na verdade, há atualmente um consenso de que os tumores do tipo difuso possuem vias distintas dos tumores do tipo intestinal onde a *H. pylori*, poderia atuar de forma diversa. Ao se analisar a diferenciação tumoral nos grupos estudados, verifica-se a associação da infecção por *H. pylori* com tumores moderadamente e pouco diferenciados, como relatado por Luo et al., (2006), que encontraram maior frequência de tumores pouco diferenciados nos casos de câncer gástrico infectados por *H. pylori*. No presente estudo essa associação manteve-se independente da classificação das cepas em subgrupos. Fatores adicionais, não analisados, tais como outros genes bacterianos, devem concorrer para o aparecimento do predomínio dos tumores pouco diferenciados no grupo B3.

Finalizando, a associação entre as cepas mais virulentas de *H. pylori* com o câncer gástrico e a severidade da doença é melhor visualizada quando se distribui os genótipos dentro dos estadiamentos. A presença das cepas mais patogênicas em todos os estadiamentos,

predominante nos estadiamentos IB, II e IV indica sua importância não só na carcinogênese como na evolução do câncer gástrico.

A partir das análises realizadas, verifica-se que os marcadores utilizados foram adequados já que permitiram obter inferências quanto à relação do genótipo com os diversos aspectos da patogênese gástrica. Por estas análises observou-se a importância da integridade de *cag*-PAI e da associação com a variação alélica *vacAs1m1*. Entretanto, constata-se a necessidade de estudos adicionais envolvendo outros genes potencialmente virulentos da *H. pylori*, os quais poderiam explicar a presença de cepas menos patogênicas associadas ao câncer gástrico. Além disso, deve-se salientar a complexidade da carcinogênese gástrica, que envolve além da infecção por *H. pylori*, fatores ambientais e do hospedeiro.

## 6. Conclusões

- A frequência de *H. pylori* (93%) nos casos de câncer gástrico estudados foi elevada, semelhantes à de estudos realizados em São Paulo e superiores a estudos chineses e suecos;
- A presença de cepas *H. pylori cagA(+)* (64,9%) foi intermediária a estudos realizados no Brasil e semelhante a de estudos chineses;
- O subtipo *vacAs1m1* (75,5%) foi o mais frequente, corroborando os estudos em diversas partes do mundo, os quais relacionam esse genótipo a doenças gastrointestinais mais graves, como o câncer gástrico;
- A frequência do gene *cagE* (53,2%) foi inferior ao único estudo em pacientes com câncer gástrico realizado na Turquia;
- O gene *virB11* foi encontrado em 60,6% dos casos, frequência inferior a de estudos italianos, contudo, estes analisavam pacientes com diversas desordens gastrointestinais;
- O genótipo de *H. pylori* mais frequente foi *vacAs1m1cagA(+cagE(+virB11(+)*, que foi considerado o mais patogênico a partir dos parâmetros utilizados, corroborando com a hipótese na qual cepas mais patogênicas estão associadas ao câncer gástrico;
- A integridade de *cag*-PAI, considerando-se, os três genes (*cagA*, *cagE* e *virB11*) foi observada em 38,3% dos casos e considerando-se pelo menos um marcador do lado direito e o do lado esquerdo da ilha foi de 56,4%, sendo esse genótipo associados ao câncer gástrico.
- Verificou-se que *cagA* e *cagE*, utilizados juntos, são melhores marcadores de integridade de *cag*-PAI que quando utilizados individualmente;
- A distribuição dos genótipos de *H. pylori* em grupos demonstrou:
  - ✓ Maior frequência das cepas consideradas mais patogênicas em tumores do antro gástrico;
  - ✓ Não houve predileção das cepas mais patogênicas por nenhum dos tipos histológicos;
  - ✓ Alta frequência das cepas mais patogênicas nos estadiamentos II e IV, demonstrando a participação de *H. pylori* na carcinogênese gástrica.

## 7. Referências Bibliográficas

AHMED, K.S.; KHAN, A.A.; AHMED, I.; TIWARI, S.K.; HABEEB, M.A.; ALI, S.M.; AHI, J.D.; ABID, Z.; ALVI, A.; HUSSAIN, M.A.; AHMED, N.; HABIBULLAH, C.M. Prevalence study to elucidate the transmission pathways of *Helicobacter pylori* at oral and gastroduodenal sites of a South Indian population. **Singapore Med J.** v. 47, p. 291-296, 2006.

AJCC – American Joint Committee on Cancer. **Cancer Staging Handbook. From the AJCC Cancer Staging Manual.** 6 ed. Springer, 2002.

ALARCÓN, T.; DOMINGO, D.; MARTINEZ, M.J.; LÓPEZ-BREA, M. *cagA* gene and *vacA* alleles in Spanish *Helicobacter pylori* clinical isolates from patients of different ages. **FEMS Immunol Med Microbiol.** v. 24, p. 215-219, 1999.

ALBERTS, S.R.; CERVANTES, A.; VAN DE VELDE, C.J. Gastric cancer: epidemiology, pathology and treatment. **Ann Oncol.** v. 14, p. 31-36, 2003.

ALI, M.; KHAN, A.A.; TIWARI, S.K.; AHMED, N.; RAO, L.V.; HABIBULLAH, C.M. Association between *cag*-pathogenicity island in *Helicobacter pylori* isolates from peptic ulcer, gastric carcinoma, and non-ulcer dyspepsia subjects with histological changes. **World J Gastroenterol.** v.11, p. 6815-6822, 2005.

ALLAKER, R.P.; YOUNG, K.A.; HARDIE, J.M.; DOMIZIO, P.; MEADOWS, N.J. Prevalence of *Helicobacter pylori* at oral and gastrointestinal sites in children: evidence for possible oral-to-oral transmission. **J Med Microbiol.** v. 51, p. 312-317, 2002.

ANDO, T.; GOTO, Y.; MAEDA, O.; WATANABE, O.; ISHIGURO, K.; GOTO, H. Causal role of *Helicobacter pylori* infection in gastric cancer. **World J Gastroenterol.** v. 12, p. 181-186, 2006.

ARAÚJO-FILHO, I.; BRANDÃO-NETO, J.; PINHEIRO, L.A.; AZEVEDO, I.M.; FREIRE, F.H.; MEDEIROS, A.C. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in advanced gastric carcinoma. **Arq Gastroenterol.** v. 43, p. 288-292, 2006.

ASAHI, M.; AZUMA, T.; ITO, S.; ITO, Y.; SUTO, H.; NAGAI, Y.; TSUBOKAWA, M.; TOHYAMA, Y.; MAEDA, S.; OMATA, M.; SUZUKI, T.; SASAKAWA, C. *Helicobacter pylori* CagA protein can be tyrosine phosphorylated in gastric epithelial cells. **J Exp Med.** v. 191, p. 593-602, 2000.

ASHOUR, A.A.; COLLARES, G.B.; MENDES, E.N.; DE GUSMÃO, V.R.; QUEIROZ, D.M.; MAGALHÃES, P.P.; DE CARVALHO, A.S.; DE OLIVEIRA, C.A.; NOGUEIRA, A.M.; ROCHA, G.A.; ROCHA, A.M. *iceA* genotypes of *Helicobacter pylori* strains isolated from Brazilian children and adults. **J Clin Microbiol.** v. 39, p. 1746-1750, 2001.

ASHOUR, A.A.; MAGALHÃES, P.P.; MENDES, E.N.; COLLARES, G.B.; DE GUSMÃO, V.R.; QUEIROZ, D.M.; NOGUEIRA, A.M.; ROCHA, G.A.; DE OLIVEIRA, C.A.

- Distribution of *vacA* genotypes in *Helicobacter pylori* strains isolated from Brazilian adult patients with gastritis, duodenal ulcer or gastric carcinoma. **FEMS Immunol Med Microbiol.** v. 33, p. 173-178, 2002.
- ATHERTON, J.C. CagA: a role at last. **Gut.** v.47, p. 330-331, 2000.
- ATHERTON, J.C.; CAO, P.; PEEK, R.M. JR.; TUMMURU, M.K.; BLASER, M.J.; COVER, T.L. Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of *Helicobacter pylori*. Association of specific *vacA* types with cytotoxin production and peptic ulceration. **J Biol Chem.** v. 270, p. 17771-17777, 1995.
- ATHERTON, J.C.; SHARP, P.M.; COVER, T.L.; GONZALEZ-VALENCIA, G.; PEEK, R.M. JR.; THOMPSON, S.A.; HAWKEY, C.J.; BLASER, M.J. Vacuolating cytotoxin (*vacA*) alleles of *Helicobacter pylori* comprise two geographically widespread types, m1 and m2, and have evolved through limited recombination. **Curr Microbiol.** v. 39, p. 211-218, 1999.
- AUDIBERT, C.; BURUCOA, C.; JANVIER, B.; FAUCHERE, J.L. Implication of the structure of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island in induction of interleukin-8 secretion. **Infect Immun.** v. 69, p. 1625-1629, 2001.
- BACKERT, S.; MÜLLER, E.C.; JUNGBLUT, P.R.; MEYER, T.F. Tyrosine phosphorylation patterns and size modification of the *Helicobacter pylori* CagA protein after translocation into gastric epithelial cells. **Proteomics.** v. 1, p. 608-617, 2001.
- BASSO D, NAVAGLIA F, BRIGATO L, PIVA MG, TOMA A, GRECO E, DI MARIO F, GALEOTTI F, ROVERONI G, CORSINI A, PLEBANI M. Analysis of *Helicobacter pylori vacA* and *cagA* genotypes and serum antibody profile in benign and malignant gastroduodenal diseases. **Gut.** v. 43, p. 182-186, 1998.
- BLASER, M.J. The biology of cag in the *Helicobacter pylori*-human interaction. **Gastroenterology.** v. 128, p. 1512-1515, 2005.
- BLASER, M.J., BERG, D.E. *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. **J Clin Invest.** v. 107, p. 767-773, 2001.
- BLASER, M.J.; PEREZ-PEREZ, G.I.; KLEANTHOUS, H.; COVER, T.L.; PEEK, R.M.; CHYOU, P.H.; STEMMERMANN, G.N.; NOMURA, A. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. **Cancer Res.** v. 55, p. 2111-2115, 1995.
- BLECKER, U.; LANCIERS, S.; KEPPENS, E.; VANDENPLAS, Y. Evolution of *Helicobacter pylori* positivity in infants born from positive mothers. **J Pediatric Gastroenterol Nutr.** v.19, p. 87-90, 1994.
- BORÉN, T.; FALK, P.; ROTH, K.A.; LARSON, G.; NORMARK, S. Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. **Science.** v. 262, p. 1892-1895, 1993.

BORRMANN, R. Geschwulste des Margens und Duodenums. In: Henk, F.; Lubarch, O.(ed) **Handbuch der speziellen pathologischen Anatomic and Histologic**.Springer: Berlin Heidelberg New Your, p. 865-879, 1926.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Cancer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil**, Rio de Janeiro: INCA, 2007. Disponível em:<<http://www.inca.gov.br>> Acesso em: 18 dez. 2007.

BRESCIANI, C.; PEREZ, R.O., GAMA-RODRIGUES, J. Familial gastric cancer. **Arq Gastroenterol.** v. 40 p. 114-117, 2003.

BRITO, G.A.; SOUZA, M.H.; MELO-FILHO, A.A.; HEWLETT, E.L.; LIMA, A.A.; FLORES, C.A.; RIBEIRO, R.A. Role of pertussis toxin A subunit in neutrophil migration and vascular permeability. **Infect Immun.** v. 65, p. 1114-1118, 1997.

BRITO CA, SILVA LM, JUCÁ N, LEAL NC, DE SOUZA W, QUEIROZ D, CORDEIRO F, SILVA NL Prevalence of cagA and vacA genes in isolates from patients with Helicobacter pylori-associated gastroduodenal diseases in Recife, Pernambuco, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 98, p. 817-821, 2003.

BROWN, L.M., Helicobacter pylori: epidemiology and routes of transmission. **Epidemiol Rev.** v. 22, p. 283-297, 2000.

BURUK, F.; BERBEROGLU, U.; PAK, I.; AKSAZ, E.; CELEN, O. Gastric cancer and Helicobacter pylori infection. **Br J Surg.** v. 80, p. 378-379, 1993.

CALDAS, C.; CARNEIRO, F.; LYNCH, H.T.; YOKOTA, J.; WIESNER, G.L.; POWELL, S.M.; LEWIS, F.R.; HUNTSMAN, D.G.; PHAROAH, P.D.; JANKOWSKI, J.A.; MACLEOD, P.; VOGELSANG, H.; KELLER, G.; PARK, K.G.; RICHARDS, F.M.; MAHER, E.R.; GAYTHER, S.A.; OLIVEIRA, C.; GREHAN, N.; WIGHT, D.; SERUCA, R.; ROVIELLO, F.; PONDER, B.A.; JACKSON, C.E. Familial gastric cancer: overview and guidelines for management. **J Med Genet.** v. 36, p. 873-880, 1999.

CANER, V.; YILMAZ, M.; YONETCI, N.; ZENCIR, S.; KARAGENC, N.; KALELI, I.; BAGCI, H. H pylori iceA alleles are disease-specific virulence factors. **World J Gastroenterol.** v. 13, p. 2581-2585, 2007.

CENSINI, S.; LANGE, C.; XIANG, Z.; CRABTREE, J.E.; GHIARA, P.; BORODOVSKY, M.; RAPPUOLI, R.; COVACCI, A. cag, a pathogenicity island of Helicobacter pylori, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 93, p. 14648-14653, 1996.

CÉSAR, A. C. G.; SILVA, A. E., TAJARA, E. H. Fatores Genéticos e Ambientais Envolvidos na Carcinogênese Gástrica. **Arq Gastroenterol.**, v. 39, n. 4, p. 253-259, 2002.

CIPRIANI, F.; BUIATTI, E.; PALLI, D. Gastric cancer in Italy. **Ital J Gastroenterol.** v. 23, p. 429-435, 1991.

- CHAN, A.O.; E-cadherin in gastric cancer. **World J Gastroenterol.** v. 12, p. 199-203, 2006.
- CHAO A, THUN MJ, HENLEY SJ, JACOBS EJ, MCCULLOUGH ML, CALLE EE. Cigarette smoking, use of other tobacco products and stomach cancer mortality in US adults: The Cancer Prevention Study II. **Int J Cancer.** v. 101, p. 380-389, 2002.
- CHOI, H.S.; PARK, D.I.; HWANG, S.J.; PARK, J.S.; KIM, H.J.; CHO, Y.K.; SOHN, C.I.; JEON, W.K.; KIM, B.I. Double-dose, new-generation proton pump inhibitors do not improve *Helicobacter pylori* eradication rate. **Helicobacter.** v.12, p. 638-642, 2007.
- CHOMVARIN C, NAMWAT W, CHAICUMPAR K, MAIRIANG P, SANGCHAN A, SRIPA B, TOR-UDOM S, VILAICHONE RK. Prevalence of *Helicobacter pylori* vacA, cagA, cagE, iceA and babA2 genotypes in Thai dyspeptic patients. **Int J Infect Dis.** v.12, p.30-6, 2008.
- CHRISTIE, P.J., VOGEL, J.P. Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. **Trends Microbiol.** v. 8, p. 354-360, 2000.
- CHU, K.M.; POON, R.; TUEN, H.H.; LAW, S.Y.; BRANICKI, F.J.; WONG, J. A prospective comparison of locally made rapid urease test and histology for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. **Gastrointest Endosc.** v. 46, p. 503, 1997.
- CON SA, TAKEUCHI H, VALERÍN AL, CON-WONG R, CON-CHIN GR, CON-CHIN VG, NISHIOKA M, MENA F, BRENES F, YASUDA N, ARAKI K, SUGIURA T. Diversity of *Helicobacter pylori* cagA and vacA genes in Costa Rica: its relationship with atrophic gastritis and gastric cancer. **Helicobacter.** v. 12, p. 547-552, 2007.
- CORREA, P. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** v.12, p. 238-241, 2003.
- CORREA P. Is gastric cancer preventable? **Gut.** v.53, p.1217-1219, 2004.
- COVACCI, A.; RAPPUOLI R. *Helicobacter pylori*: after the genomes, back to biology. **J Exp Med.** v. 197, p. 807-811, 2003
- COVACCI, A., RAPPUOLI, R. Tyrosine-phosphorylated bacterial proteins: Trojan horses for the host cell. **J Exp Med.** v. 191, p. 587-592, 2000.
- COVACCI, A.; TELFORD, J.L.; DEL GIUDICE, G.; PARSONNET, J.; RAPPUOLI, R. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. **Science.** v. 284, p. 1328-1333, 1999.
- CRABTREE, J.E.; KERSULYTE, D.; LI, S.D.; LINDLEY, I.J.; BERG, D.E. Modulation of *Helicobacter pylori* induced interleukin-8 synthesis in gastric epithelial cells mediated by cag PAI encoded VirD4 homologue. **J Clin Pathol.** v. 52, p. 653-657, 1999.
- CREW, K. D., NEUGUT, A.I. Epidemiology of gastric cancer. **World J Gastroenterol.** v. 12, p. 354-362, 2006.
- CUNNINGHAM SC, KAMANGAR F, KIM MP, HAMMOUD S, HAQUE R, MAITRA A, MONTGOMERY E, HEITMILLER RE, CHOTI MA, LILLEMoe KD, CAMERON JL, YEO

- CJ, SCHULICK RD. Survival after gastric adenocarcinoma resection: eighteen-year experience at a single institution. **J Gastrointest Surg.** v. 9, p. 718-725, 2005.
- DE JONGE, R.; POT, R.G.; LOFFELD, R.J.; VAN VLIET, A.H.; KUIPERS, E.J.; KUSTERS, J.G. The functional status of the *Helicobacter pylori* sabB adhesin gene as a putative marker for disease outcome. **Helicobacter.** v. 9, p. 158-164, 2004.
- DE STEFANI, E; CORREA, P.; FIERRO, L.; CARZOGLIO, J.; DENEEO-PELLEGRINI, H.; ZAVALA, D Alcohol drinking and tobacco smoking in gastric cancer. A case-control study. **Rev Epidemiol Sante Publique.** 1990;38(4):297-307.
- DIXON, M.F.; MAPSTONE, N.P.; NEVILLE, P.M.; MOAYYEDI, P.; AXON, A.T. Bile reflux gastritis and intestinal metaplasia at the cardia. **Gut.** v. 51, p. 351-355, 2002.
- ERZIN, Y.; KOKSAL, V.; ALTUN, S.; DOBRUCALI, A.; ASLAN, M.; ERDAMAR, S.; DIRICAN, A.; KOCAZEYBEK, B. Prevalence of *Helicobacter pylori* vacA, cagA, cagE, iceA, babA2 genotypes and correlation with clinical outcome in Turkish patients with dyspepsia. **Helicobacter.**v. 11, p. 574-580, 2006.
- ESCOBAR, M.L., KAWAKAMI, E. Evidence of mother-child transmission of *Helicobacter pylori* infection. **Arq Gastroenterol.** v. 41, p. 239-244, 2004.
- ESPEJO, E.; NAVARRETE, S. J. Classification of stomach adenocarcinomas. **Rev. Grastroenterol. Peru,** v. 23, n. 3,p. 199-212, 2003.
- EVANS DG, QUEIROZ DM, MENDES EN, EVANS DJ JR. *Helicobacter pylori* cagA status and s and m alleles of vacA in isolates from individuals with a variety of H. pylori-associated gastric diseases. **J Clin Microbiol.** v. 36, p. 3235-3437, 1998.
- EVANS, D.J. JR.; EVANS, D.G. *Helicobacter pylori* CagA: analysis of sequence diversity in relation to phosphorylation motifs and implications for the role of CagA as a virulence factor. **Helicobacter.** v. 6, p. 187-198, 2001.
- FABRE, R.; SOBHANI I.; LAURENT-PUIG, P.; HEDEF, N., YAZIGI, N., VISSUZAINNE, C.; RODDE, I.; POTET, F.; MIGNON, M.; ETIENNE, J. P.; BRAQUET, M. Polymerase chain reaction assay for the detection of *Helicobacter pylori* in gastric biopsy specimens: comparison with culture, rapid urease test, and histopathological tests. **Gut.** v.35, p. 905–908, 1994.
- FALK, P.; ROTH, K.A.; BORÉN, T.; WESTBLOM, T.U.; GORDON, J.I.; NORMARK, S. An in vitro adherence assay reveals that *Helicobacter pylori* exhibits cell lineage-specific tropism in the human gastric epithelium. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 90, p. 2035-2039, 1993.
- FELDMAN, R.A., EVANS, S.J.W. Accuracy of diagnostic methods used for epidemiological studies of *Helicobacter pylori*. **Aliment Pharmacol Ther.** v. 9, p.21, 1995.
- FIGUEIREDO C, MACHADO JC, PHAROAH P, SERUCA R, SOUSA S, CARVALHO R, CAPELINHA AF, QUINT W, CALDAS C, VAN DOORN LJ, CARNEIRO F, SOBRINHO-SIMÕES M. *Helicobacter pylori* and interleukin 1 genotyping: an opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. **J Natl Cancer Inst.** v. 94, p. 1680-1687, 2002.

FISCHER, W.; PÜLS, J.; BUHRDORF, R.; GEBERT, B.; ODENBREIT, S.; HAAS, R. Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8. **Mol Microbiol.** v. 42, p. 1337-1348, 2001.

GATTI LL, FAGUNDES E SOUZA EK, LEITE KR, BASTOS EL, VICENTINI LR, SILVA LC, SMITH MDE A, PAYÃO SL. cagA vacA alleles and babA2 genotypes of *Helicobacter pylori* associated with gastric disease in Brazilian adult patients. **Diagn Microbiol Infect Dis.** v. 51, p. 231-235, 2005.

GATTI, L.L.; MÓDENA, J.L.; PAYÃO, S.L.; SMITH, M.D.E. A, FUKUHARA, Y.; MÓDENA, J.L.; DE OLIVEIRA, R.B.; BROCCHI, M. Prevalence of *Helicobacter pylori* cagA, iceA and babA2 alleles in Brazilian patients with upper gastrointestinal diseases. **Acta Trop.** v. 100, p. 232-240, 2006.

GERHARD, M.; LEHN, N.; NEUMAYER, N.; BORÉN, T.; RAD, R.; SCHEPP, W.; MIEHLKE, S.; CLASSEN, M.; PRINZ, C. Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen-binding adhesin. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 96, p. 12778-12783, 1999.

GODOY, A.P.O.; RIBEIRO, M.L. Disponível em [http://www.helico.com/diag\\_breath.html](http://www.helico.com/diag_breath.html)  
Acesso em: 18 dez. 2007.

GOMES-CARNEIRO, M.R., RIBEIRO-PINTO, L.F., PAUMGARTTEN F.J. Environmental risk factors for gastric cancer: the toxicologist's standpoint. **Cad Saude Publica.** v. 13, p. 27-38, 1997.

GONZALES GR, TUTTLE SL, THALER HT, MANFREDI PL. Central pain in cancer patients. **J Pain.**, v. 4, p. 351-354, 2003.

GURUGE, J.L.; FALK, P.G.; LORENZ, R.G.; DANS, M.; WIRTH, H.P.; BLASER, M.J.; BERG, D.E.; GORDON, J.I. Epithelial attachment alters the outcome of *Helicobacter pylori* infection. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 95, p. 3925-3930, 1998.

HANSSON, L.E.; ENGSTRAND, L.; NYRÉN, O.; EVANS, D.J. JR.; LINDGREN, A.; BERGSTRÖM, R.; ANDERSSON, B.; ATHLIN, L.; BENDTSEN, O.; TRACZ, P. *Helicobacter pylori* infection: independent risk indicator of gastric adenocarcinoma. **Gastroenterology.** v. 105, p. 1098-1103, 1993.

HANSSON, L.R.; ENGSTRAND, L.; NYRÉN, O.; LINDGREN, A. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in subtypes of gastric cancer. **Gastroenterology.** v. 109, p. 855-888, 1995.

HIGASHI, H.; TSUTSUMI, R.; FUJITA, A.; YAMAZAKI, S.; ASAKA, M.; AZUMA, T.; HATAKEYAMA, M. Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 99, p. 14428-14433, 2002.

IARC – International Agency of Research on Cancer. Global Cancer 2002.

IKENOUE, T.; MAEDA, S.; OGURA, K.; AKANUMA, M.; MITSUNO, Y.; IMAI, Y.; YOSHIDA, H.; SHIRATORI, Y.; OMATA, M. Determination of *Helicobacter pylori* virulence by simple gene analysis of the *cag* pathogenicity island. **Clin Diagn Lab Immunol.** v. 8, p. 181-186, 2001.

ILVER, D.; ARNQVIST, A.; OGREN, J.; FRICK, I.M.; KERSULYTE, D.; INCECIK, E.T.; BERG, D.E.; COVACCI, A.; ENGSTRAND, L.; BOREN, T. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. **Science.** v. 279, p. 373-377, 1998.

JENKS, P.J., MÉGRAUD, F., LABIGNE, A. Clinical outcome after infection with *Helicobacter pylori* does not appear to be reliably predicted by the presence of any of the genes of the *cag* pathogenicity island. **Gut.** v.43, p. 752-758, 1998.

JOSENHANS, C., LABIGNE, A., SUERBAUM, S. Comparative ultrastructural and functional studies of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flagellin mutants: both flagellin subunits, FlaA and FlaB, are necessary for full motility in *Helicobacter* species. **J Bacteriol.** v. 177, p. 3010-3020, 1995.

KAMALI-SARVESTANI, E.; BAZARGANI, A.; MASOUDIAN, M.; LANKARANI, K.; TAGHAVI, A.R.; SABERIFIROOZI, M. Association of *H. pylori* *cagA* and *vacA* genotypes and IL-8 gene polymorphisms with clinical outcome of infection in Iranian patients with gastrointestinal diseases. **World J Gastroenterol.** v. 12, p. 5205-5210, 2006.

KANWAR, S.; JOHNSTON, B.; KUBES, P. Leukotriene C4/D4 induces P-selectin and sialyl Lewis(x)-dependent alterations in leukocyte kinetics in vivo. **Circ Res.** v. 77, p. 879-887, 1995.

KATO, A.; BANDO, E.; SHINOZAKI, S.; YONEMURA, Y.; AIBA, M.; FUKUDA, I.; HIZUKA, N.; KAMEYA, T. Severe hypoglycemia and hypokalemia in association with liver metastases of gastric cancer. **Intern Med.** v. 43(9), p. 824-828, 2004.

KAUSER F, HUSSAIN MA, AHMED I, SRINIVAS S, DEVI SM, MAJEED AA, RAO KR, KHAN AA, SECHI LA, AHMED N. Comparative genomics of *Helicobacter pylori* isolates recovered from ulcer disease patients in England. **BMC Microbiol.** v. 5, p. 2005.

KAUSER F, KHAN AA, HUSSAIN MA, CARROLL IM, AHMAD N, TIWARI S, SHOUCHE Y, DAS B, ALAM M, ALI SM, HABIBULLAH CM, SIERRA R, MEGRAUD F, SECHI LA, AHMED N. The *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* is disrupted in the majority of patient isolates from different human populations. **J Clin Microbiol.** v. 42, p. 5302-5308, 2004.

KHANNA B, CUTLER A, ISRAEL NE, PERRY M, LASTOVICA A, FIELDS PI, GOLD BD. Use caution with serologic testing for *Helicobacter pylori* infection in children. **J Infect Dis.** v.178, p. 460-465, 1998.

KIDD M, PEEK RM, LASTOVICA AJ, ISRAEL DA, KUMMER AF, LOUW JA. Analysis of *iceA* genotypes in South African *Helicobacter pylori* strains and relationship to clinically significant disease. **Gut.** v. 49, p. 629-635, 2001.

KIM, N.; LIM, S.H.; LEE, K.H.; CHOI, S.E.; JUNG, H.C.; SONG, I.S.; KIM, C.Y. Long-term effects of *Helicobacter pylori* eradication on intestinal metaplasia in patients with duodenal and benign gastric ulcers. **Dig Dis Sci.** v. 45, p. 1754-1762, 2000.

KOIZUMI Y, TSUBONO Y, NAKAYA N, KURIYAMA S, SHIBUYA D, MATSUOKA H, TSUJI I. Cigarette smoking and the risk of gastric cancer: a pooled analysis of two prospective studies in Japan. **Int J Cancer.** v.112, p.1049-1055, 2004 .

KONTUREK, S.J.; KONTUREK, P.C.; BIELANSKI, W.; KARCZEWSKA, E.; ZUCHOWICZ, M.; HARTWICH, A.; REHFELD, J.F.; GOETZE, J.P.; HAHN, E.G. Serum progastrin and its products, gastric acid secretion and serum pepsinogen I in gastric cancer. **Digestion.** v. 68, p. 169-177, 2003.

KOSTRZYNSKA, M.; BETTS, J.D.; AUSTIN, J.W.; TRUST, T.J. Identification, characterization, and spatial localization of two flagellin species in *Helicobacter pylori* flagella. **J Bacteriol.** v. 173, p. 937-946, 1991.

KRAUSE, S.; PANSEGRAU, W.; LURZ, R.; DE LA CRUZ, F.; LANKA, E. Enzymology of type IV macromolecule secretion systems: the conjugative transfer regions of plasmids RP4 and R388 and the *cag* pathogenicity island of *Helicobacter pylori* encode structurally and functionally related nucleoside triphosphate hydrolases. **J Bacteriol.** v. 182, p. 2761-2770, 2000.

LADEIRA, M.S.; RODRIGUES, M.A.; SALVADORI, D.M.; NETO, P.P.; ACHILLES, P.; LERCO, M.M.; RODRIGUES, P.A.; GONÇALVES, I. JR.; QUEIROZ, D.M.; FREIRE-MAIA, D.V. Relationships between *cagA*, *vacA*, and *iceA* genotypes of *Helicobacter pylori* and DNA damage in the gastric mucosa. **Environ Mol Mutagen.** v. 44, p. 91-98, 2004.

LAGE, A. P., GODFROID, E., FAUCONNIER, A., BURETTE, A., BUTZLER, J. P., BOLLEN, A., GLUPCZYNSKI, Y. Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection by PCR: Comparison with Other Invasive Techniques and Detection of *cagA* Gene in Gastric Biopsy Specimens. **J. Clin. Microbiol.** v. 33, p. 2752–2756, 1995.

LAMARQUE, D.; M PEEK R JR. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. **Helicobacter.** v. 8, p.21-30, 2003.

LAURÈN, P. Two Histological main types of Gastric Carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. **Acta Path. Microbiol. Scand.**, v.64, p. 31-49, 1965.

LA VECCHIA C, NEGRI E, FRANCESCHI S, GENTILE A. Family history and the risk of stomach and colorectal cancer. **Cancer.** v.70, p. 50-55, 1992.

LEE HC, YANG MT, LIN KY, TU HY, ZHANG TA, CHEN PH. Metastases from gastric carcinoma to colon in the form of multiple flat elevated lesions: a case report. **Kaohsiung J Med Sci.** v.20, p.552-7, 2004.

LEHOURS, P. ; RUSKONE-FOURMESTRAUX, A. ; LAVERGNE, A. ; CANTET, F. ; MEGRAUD, F. ; GROUPE D'ETUDE DES LYMPHOMES DIGESTIFS (GELD) FOR THE FEDERATION FRANÇAISE DE CANCEROLOGIE DIGESTIVE (FFCD). Which test to use

to detect *Helicobacter pylori* infection in patients with low-grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma? **Am J Gastroenterol.** v.98, p. 291-295, 2003.

LEHOURS, P.; MÉNARD, A.; DUPOUY, S.; BERGEY, B.; RICHY, F.; ZERBIB, F.; RUSKONÉ-FOURMESTRAUX, A.; DELCHIER, J.C.; MÉGRAUD, F. Evaluation of the association of nine *Helicobacter pylori* virulence factors with strains involved in low-grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. **Infect Immun.** v. 72, p. 880-888, 2004.

LIMA, M. A. P.; RABENHORST, S. H. B. Association of Epstein-Barr virus (EBV) with Solid Tumors. **Revista Brasileira de Cancerologia.** v. 52, p. 87-96, 2006.

LIMA, V.P.; DE LIMA, M.A.P.; ANDRÉ, A.R.; FERREIRA, M.V.P.; BARROS, M.A.P.; RABENHORST, S.H.B. *H pylori* (CagA) and Epstein-Barr virus infection in gastric carcinomas: Correlation with p53 mutation and c-Myc, Bcl-2 and Bax expression. **World J Gastroenterol.** v.14, p. 884-891, 2008.

LIN HJ, PERNG CL, LO WC, WU CW, TSENG GY, LI AF, SUN IC, OU YH. *Helicobacter pylori* cagA, iceA and vacA genotypes in patients with gastric cancer in Taiwan. **World J Gastroenterol.** v.10, p.2493-2497, 2004 .

LISSOWSKA J, GROVES FD, SOBIN LH, FRAUMENI JF JR, NASIEROWSKA-GUTTMEJER A, RADZISZEWSKI J, REGULA J, HSING AW, ZATONSKI W, BLOT WJ, CHOW WH. Family history and risk of stomach cancer in Warsaw, Poland. **Eur J Cancer Prev.** v. 8, p. 223-227, 1999.

LOPES LF, BACCHI MM, ELGUI-DE-OLIVEIRA D, ZANATI SG, ALVARENGA M, BACCHI CE. Epstein-Barr virus infection and gastric carcinoma in São Paulo State, Brazil. **Braz J Med Biol Res.** v. 37, p. 1707-1712, 2004.

LOCHHEAD P, EL-OMAR EM *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. **Best Pract Res Clin Gastroenterol.** v.21, p.281-97, 2007.

LUO, B.; WANG, Y.; WANG, X.F.; GAO, Y.; HUANG, B.H.; ZHAO, P. Correlation of Epstein-Barr virus and its encoded proteins with *Helicobacter pylori* and expression of c-met and c-myc in gastric carcinoma. **World J Gastroenterol.** v. 12, p. 1842-1848, 2006.

LYNCH, H.T.; GRADY, W.; SURIANO, G.; HUNTSMAN, D. Gastric cancer: new genetic developments. **J Surg Oncol.** v. 90, p. 114-133, 2005.

MAEDA, S., MENTIS, A.F. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. **Helicobacter.** v. 12, p. 10-14, 2007.

MAEDA S, YOSHIDA H, IKENOUE T, OGURA K, KANAI F, KATO N, SHIRATORI Y, OMATA M. Structure of cag pathogenicity island in Japanese *Helicobacter pylori* isolates. **Gut.** v.44, p. 336-341,1999.

MAEDA, S.; OGURA, K.; YOSHIDA, H.; KANAI, F.; IKENOUE, T.; KATO, N.; SHIRATORI, Y.; OMATA, M. Major virulence factors, VacA and CagA, are commonly positive in *Helicobacter pylori* isolates in Japan. **Gut**. v. 42, p. 338-343, 1998.

MAHDAVI, J.; SONDÉN, B.; HURTIG, M.; OLFAT, F.O.; FORSBERG, L.; ROCHE, N.; ANGSTROM, J.; LARSSON, T.; TENEBERG, S.; KARLSSON, K.A.; ALTRAJA, S.; WADSTRÖM, T.; KERSULYTE, D.; BERG, D.E.; DUBOIS, A.; PETERSSON, C.; MAGNUSSON, K.E.; NORBERG, T.; LINDH, F.; LUNDSKOG, B.B.; ARNQVIST, A.; HAMMARSTRÖM, L.; BORÉN, T. *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. **Science**. v. 297, p. 573-578, 2002.

MALFERTHEINER, P.; MÉGRAUD, F.; O'MORAIN, C.; HUNGIN, A.P.; JONES, R.; AXON, A.; GRAHAM, D.Y.; TYTGAT, G. EUROPEAN HELICOBACTER PYLORI STUDY GROUP (EHPSG). Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection – the Maastricht 2–2000 consensus report. **Aliment Pharmacol Ther**. v. 16, p. 167-180, 2002.

MARAIS, A., MONTEIRO, L., MÉGRAUD, F. Microbiology of *Helicobacter pylori*. **Curr Top Microbiol Immunol**. v. 241, p. 103-122, 1999.

MARSHALL, B. *Helicobacter pylori*: 20 years on. **Clin Med**. v. 2, p. 147-152, 2002.

MARTINS LC, CORVELO TC, DEMACHKI S, ARAUJO MT, ASSUMPÇÃO MB, VILAR SC, FREITAS FB, BARBOSA HP, FECURY AA, DO AMARAL RK, DOS SANTOS SE. Clinical and pathological importance of vacA allele heterogeneity and cagA status in peptic ulcer disease in patients from North Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 100, p. 875-881, 2005.

MATTAR, R.; DOS SANTOS, A.F.; EISIG, J.N.; RODRIGUES, T.N.; SILVA, F.M.; LUPINACCI, R.M.; IRIYA, K.; CARRILHO, F.J. No correlation of babA2 with vacA and cagA genotypes of *Helicobacter pylori* and grading of gastritis from peptic ulcer disease patients in Brazil. **Helicobacter**. v. 10, p. 601-608, 2005.

MÉGRAUD, F.; LEHN, N.; LIND, T.; BAYERDÖRFFER, E.; O'MORAIN, C.; SPILLER, R.; UNGE, P.; VAN ZANTEN, S.V.; WRANGSTADH, M.; BURMAN, C.F. Antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori* in a large multicenter trial: the MACH 2 study. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 43, p. 2747-2752, 1999.

MIZUSHIMA, T.; SUGIYAMA, T.; KOBAYASHI, T.; KOMATSU, Y.; ISHIZUKA, J.; KATO, M.; ASAKA, M. Decreased adherence of cagG-deleted *Helicobacter pylori* to gastric epithelial cells in Japanese clinical isolates. **Helicobacter**. v. 7, p. 22-29, 2002.

MÓDENA, J.L.; ACRANI, G.O.; MICAS, A.F.; CASTRO, M.; SILVEIRA, W.D.; MÓDENA, J.L.; OLIVEIRA, R.B.; BROCCHI, M. Correlation between *Helicobacter pylori* infection, gastric diseases and life habits among patients treated at a university hospital in Southeast Brazil. **Braz J Infect Dis**. v. 11, p. 89-95, 2007.

MUNRO, J.M.; LO, S.K.; CORLESS, C.; ROBERTSON, M.J.; LEE, N.C.; BARNHILL, R.L.; WEINBERG, D.S.; BEVILACQUA, M.P. Expression of sialyl-Lewis X, an E-selectin ligand, in

inflammation, immune processes, and lymphoid tissues. **Am J Pathol.** v. 141, p. 1397-1408, 1992.

NARDONE G, MORGNER A. Helicobacter pylori and gastric malignancies. **Helicobacter.** v. 8, p. 44-52, 2003.

NGUYEN, A.M.; ENGSTRAND, L.; GENTA, R.M.; GRAHAM, D.Y.; EL-ZAATARI FA. Detection of Helicobacter pylori in dental plaque by reverse transcription-polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol.** v. 31, p. 783-787, 1993.

NILSSON C, SILLÉN A, ERIKSSON L, STRAND ML, ENROTH H, NORMARK S, FALK P, ENGSTRAND L. Correlation between cag pathogenicity island composition and Helicobacter pylori-associated gastroduodenal disease. **Infect Immun.** v.71, p.6573-81, 2003.

NIMRI LF, MATAKA I, BANI HANI K, IBRAHIM M Helicobacter pylori genotypes identified in gastric biopsy specimens from Jordanian patients. **BMC Gastroenterol.** v. 4,2006.

NISHIMOTO, I.N.; HAMADA, G.S.; KOWALSKI, L.P.; RODRIGUES, J.G.; IRIYA, K.; SASAZUKI, S.; HANAOKA, T.; TSUGANE, S; SÃO PAULO--JAPAN CANCER PROJECT GASTRIC CANCER STUDY GROUP. Risk factors for stomach cancer in Brazil (I): a case-control study among non-Japanese Brazilians in São Paulo. **Jpn J Clin Oncol.** v. 32, p. 277-283, 2002.

NOGUEIRA C, FIGUEIREDO C, CARNEIRO F, GOMES AT, BARREIRA R, FIGUEIRA P, SALGADO C, BELO L, PEIXOTO A, BRAVO JC, BRAVO LE, REALPE JL, PLAISIER AP, QUINT WG, RUIZ B, CORREA P, VAN DOORN LJ. Helicobacter pylori genotypes may determine gastric histopathology. **Am J Pathol.** v. 158, p. 647-654, 2001.

ODENBREIT, S.; PÜLS, J.; SEDLMAIER, B.; GERLAND, E.; FISCHER, W.; HAAS, R. Translocation of Helicobacter pylori CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion. **Science.** v. 287, p. 1497-1500, 2000.

OHYAUCHI, M.; IMATANI, A.; YONECHI, M.; ASANO, N.; MIURA, A.; IIJIMA, K.; KOIKE, T.; SEKINE, H.; OHARA, S.; SHIMOSEGAWA, T. The polymorphism interleukin 8 - 251 A/T influences the susceptibility of Helicobacter pylori related gastric diseases in the Japanese population. **Gut.** v. 54, p. 330-335, 2005.

OLIVARES D, GISBERT JP. Factors involved in the pathogenesis of Helicobacter pylori infection. **Rev Esp Enferm Dig.** v. 98, p. 374-386, 2006.

OLIVEIRA, A.G.; SANTOS, A.; GUERRA, J.B.; ROCHA, G.A.; ROCHA, A.M.; OLIVEIRA, C.A.; CABRAL, M.M.; NOGUEIRA, A.M.; QUEIROZ, D.M. babA2- and cagA-positive Helicobacter pylori strains are associated with duodenal ulcer and gastric carcinoma in Brazil. **J Clin Microbiol.** v.41, p. 3964-6, 2003.

OLUWASOLA AO, OGUNBIYI JO. Gastric cancer: aetiological, clinicopathological and management patterns in Nigeria. **Niger J Med.** v. 12, p. 177-186, 2003.

OPLUSTIL CP, ZOCCOLI CM, TOBOUTI NR, SINTO SI. **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica**. São Paulo: Savier, 136p.,2001.

ORNELLAS, L.C.; CURY, M.S.; DE LIMA, V.M. ; FERRARI, A.P. JR. Avaliação do teste rápido da urease conservado em geladeira. **Arq Gastroenterol**. v.37, p.1555-1557, 2000.

OTA, H.; NAKAYAMA, J.; MOMOSE, M.; HAYAMA, M.; AKAMATSU, T.; KATSUYAMA, T.; GRAHAM, D.Y.; GENTA, R.M. Helicobacter pylori infection produces reversible glycosylation changes to gastric mucins. **Virchows Arch**. v. 433, p. 419-426,1998.

OWEN RJ, PETERS TM, VAREA R, TEARE EL, SAVERYMUTTU S. Molecular epidemiology of Helicobacter pylori in England: prevalence of cag pathogenicity island markers and IS605 presence in relation to patient age and severity of gastric disease. **FEMS Immunol Med Microbiol**. v.30, p.65-71, 2001.

PALLI D, GALLI M, CAPORASO NE, CIPRIANI F, DECARLI A, SAIIEVA C, FRAUMENI JF JR, BUIATTI E. Family history and risk of stomach cancer in Italy. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. v. 3, p. 15-18, 1994.

PARK, S.M.; PARK, J.; KIM, J.G.; CHO, H.D.; CHO, J.H.; LEE, D.H.; CHA, Y.J. Infection with Helicobacter pylori expressing the cagA gene is not associated with an increased risk of developing peptic ulcer diseases in Korean patients. **Scand J Gastroenterol**. v. 33, p. 923-927, 1998.

PARK, W.S.; OH, R.R.; KIM, Y.S.; PARK, J.Y.; SHIN, M.S.; LEE, H.K.; LEE, S.H.; YOO, N.J.; LEE, J.Y. Absence of mutations in the kinase domain of the Met gene and frequent expression of Met and HGF/SF protein in primary gastric carcinomas. **APMIS**. v. 108, p. 195-200, 2000.

PARKIN, D. M.; BRAY, F.; FERLAY, J.; PISANI, P. Global Cancer Statistics, 2002. **CA Cancer J. Clin.**, v.55, p. 74-108, 2005.

PARSONNET, J. ; BLASER, M.J.; PEREZ-PEREZ, G.I.; HARGRETT-BEAN, N.; TAUXE, R.V. Symptoms and risk factors of Helicobacter pylori infection in a cohort of epidemiologists. **Gastroenterology**. v. 102, p 41-46, 1992.

PARSONNET, J.; REPLOGLE, M.; YANG, S.; HIATT, R. Seroprevalence of CagA-positive strains among Helicobacter pylori-infected, healthy young adults. **J Infect Dis**. v. 175, p. 1240-1242, 1997.

PARSONNET, J.; VANDERSTEEN, D.; GOATES, J.; SIBLEY, R.K.; PRITIKIN, J.; CHANG, Y. Helicobacter pylori infection in intestinal- and diffuse-type gastric adenocarcinomas. **J Natl Cancer Inst**. v. 83, p. 640-643, 1991.

PASSARO, D.J., CHOSY, E.J., PARSONNET, J. Helicobacter pylori: consensus and controversy. **Clin Infect Dis**. v. 35, p. 298-304, 2002.

PEEK, R.M. JR.; BLASER, M.J.; MAYS, D.J.; FORSYTH, M.H.; COVER, T.L.; SONG, S.Y.; KRISHNA, U.; PIETENPOL, J.A. Helicobacter pylori strain-specific genotypes and modulation of the gastric epithelial cell cycle. **Cancer Res.**v. 59, p. 6124-6131, 1999.

PEREIRA, L.P.; WAISBERG, J.; ANDRÉ, E.A.; ZANOTO, A.; MENDES JÚNIOR, J.P.; SOARES, H.P. Detection of Helicobacter pylori in gastric cancer. **Arq Gastroenterol.** v. 38, p. 240-246, 2001.

PERMIN, H.; ANDERSEN, L. P. Inflammation, immunity, and vaccines for Helicobacter infection. **Helicobacter.** v. 10, p. 21-25, 2005.

PLUMMER, M., FRANCESCHI, S., MUÑOZ, N. Epidemiology of gastric cancer. **IARC Sci Publ.** v. 157, p. 311-326, 2004

PORTORREAL A, KAWAKAMI E. Avaliação do método imunoenzimático (ELISA) para diagnóstico da infecção por Helicobacter pylori em crianças e adolescentes. **Arq Gastroenterol.** v. 39, p.198-203, 2002.

PRINZ, C.; SCHÖNIGER, M.; RAD, R.; BECKER, I.; KEIDITSCH, E.; WAGENPFEIL, S.; CLASSEN, M.; RÖSCH, T.; SCHEPP, W.; GERHARD, M. Key importance of the Helicobacter pylori adherence factor blood group antigen binding adhesin during chronic gastric inflammation. **Cancer Res.** v. 61,p. 1903-1909, 2001.

PRINZ, C.; SCHWENDY, S.; VOLAND, P. H pylori and gastric cancer: shifting the global burden. **World J Gastroenterol.** v. 12, p.5458-5468, 2006.

QIU, J.L.; CHEN, K.; ZHENG, J.N.; WANG, J.Y.; ZHANG, L.J.; SUI, L.M. Nutritional factors and gastric cancer in Zhoushan Islands, China. **World J Gastroenterol.** v. 11, p. 4311-4316, 2005.

RAJ, D.S.; VINCENT, B.; SIMPSON, K.; SATO, E.; JONES, K.L; WELBOURNE, T.C.; LEVI, M.; SHAH, V.; BLANDON, P.; ZAGER, P.; ROBBINS, R.A. Hemodynamic changes during hemodialysis: role of nitric oxide and endothelin. **Kidney Int.** v. 61, p. 697-704, 2002.

RAMELAH, M.; AMINUDDIN, A.; ALFIZAH, H.; ISA, M.R.; JASMI, A.Y.; TAN, H.J.; RAHMAN, A.J.; RIZAL, A.M.; MAZLAM, M.Z. cagA gene variants in Malaysian Helicobacter pylori strains isolated from patients of different ethnic groups. **FEMS Immunol Med Microbiol.** v. 44, p. 239-242, 2005.

RIBEIRO ML, GODOY AP, BENVENGO YH, MENDONÇA S, PEDRAZZOLI J JR. Clinical relevance of the cagA, vacA and iceA genotypes of Helicobacter pylori in Brazilian clinical isolates. **FEMS Immunol Med Microbiol.** v. 36, p. 181-185, 2003.

ROBBINS & COTRAN (Eds.) **Patologia: Bases Patológicas das Doenças.** 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ROCHA, A.F.G. Helicobacter pylori – Diagnóstico pelo teste Respiratório. **A C. Gastroenterol.** v.12, p.4-13, 1996.

RODER, D.M The epidemiology of gastric cancer. **Gastric Cancer**. v. 5, p. 5-11. 2002.

ROTA, C.A.; PEREIRA-LIMA, J.C.; BLAYA, C.; NARDI, N.B. Consensus and variable region PCR analysis of *Helicobacter pylori* 3' region of *cagA* gene in isolates from individuals with or without peptic ulcer. *J Clin Microbiol*. 2001, 39(2):606-12.

ROVIELLO F, CORSO G, PEDRAZZANI C, MARRELLI D, DE FALCO G, SURIANO G, VINDIGNI C, BERARDI A, GAROSI L, DE STEFANO A, LEONCINI L, SERUCA R, PINTO E. High incidence of familial gastric cancer in Tuscany, a region in Italy. **Oncology**. v. 72, p. 243-247, 2007.

RUDI, J.; KOLB, C.; MAIWALD, M.; KUCK, D.; SIEG, A.; GALLE, P.R.; STREMMEL, W. Diversity of *Helicobacter pylori* *vacA* and *cagA* genes and relationship to *VacA* and *CagA* protein expression, cytotoxin production, and associated diseases. **J Clin Microbiol**. v. 36, p. 944-948, 1998.

SALIH, B.A., ABASIYANIK, M.F., AHMED, N. A preliminary study on the genetic profile of *cag* pathogenicity-island and other virulent gene loci of *Helicobacter pylori* strains from Turkey. **Infect Genet Evol**. v. 7, p. 509-512, 2007.

SEGAL, E.D.; CHA, J.; LO, J.; FALKOW, S.; TOMPKINS, L.S. Altered states: involvement of phosphorylated *CagA* in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 96, p. 14559-14564, 1999.

SELBACH, M.; MOESE, S.; MEYER, T.F.; BACKERT, S. Functional analysis of the *Helicobacter pylori* *cag* pathogenicity island reveals both *VirD4-CagA*-dependent and *VirD4-CagA*-independent mechanisms. **Infect Immun**. v. 70, p.665-671, 2002.

SHANG J, PENA AS. Multidisciplinary approach to understand the pathogenesis of gastric cancer. *World J Gastroenterol*. v. 11, p. 4131-4139, 2005 .

SIPPONEN, P.; CORREA, P. Delayed rise in incidence of gastric cancer in females results in unique sex ratio (M/F) pattern: etiologic hypothesis. **Gastric Cancer**. v. 5, p. 213-219, 2002.

SIPPONEN, P., MARSHALL, B.J. Gastritis and gastric cancer. Western countries. **Gastroenterol Clin North Am**. v. 29, p. 579-592, 2000.

SIQUEIRA, J. S.; LIMA, P.S.S.; BARRETO, A.S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. General aspects of *Helicobacter pylori* infections – Review. **RBAC**, v. 39, p. 9-13, 2007.

SMITH MG, HOLD GL, TAHARA E, EL-OMAR EM. Cellular and molecular aspects of gastric cancer. **World J Gastroenterol**. v.12, p. 2079-2090, 2006.

SOZZI, M.; TOMASINI, M.L.; VINDIGNI, C.; ZANUSSI, S.; TEDESCHI, R.; BASAGLIA, G.; FIGURA, N.; DE PAOLI, P. Heterogeneity of *cag* genotypes and clinical outcome of *Helicobacter pylori* infection. **J Lab Clin Med**. v. 146, p. 262-270, 2005.

- STADTLANDER, C. T. K-H.; WATERBOR, J. W. Molecular Epidemiology, Pathogenesis and Prevention of Gastric Cancer. **Carcinogenesis**, v. 20, n. 12, p. 2195-2207, 1999.
- STEIN, M., RAPPUOLI, R., COVACCI, A. Tyrosine phosphorylation of the Helicobacter pylori CagA antigen after cag-driven host cell translocation. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 97, p. 1263-1268, 2000.
- SUGIYAMA, T. Development of gastric cancer associated with Helicobacter pylori infection. **Cancer Chemother Pharmacol**. v. 54, p. 12-20, 2004.
- TAKANO Y, KATO Y, SAEGUSA M, MORI S, SHIOTA M, MASUDA M, MIKAMI T, OKAYASU I. The role of the Epstein-Barr virus in the oncogenesis of EBV(+) gastric carcinomas. **Virchows Arch**. v.434, p. 17-22, 1999.
- TAMURA, G.; Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer. **World J Gastroenterol**. v. 12, p. 192-198, 2006.
- TEIXEIRA, J.B., NOGUEIRA, M.S. Gastric cancer: risk factors in patients treated in tertiary care services of a municipality in the interior of the state of São Paulo. **Rev Lat Am Enfermagem**. v. 11, p. 43-48, 2003.
- THOMAZINI, C.M.; PINHEIRO, N. A.; PARDINI, M.I.; NARESSE, L.E.; RODRIGUES, M. A. M. Helicobacter pylori and gastric cancer: distribution of cagA and vacA genotypes in patients with gastric carcinoma. **J. Bras Patol Med Lab**, v. 42, p. 25-30, 2006.
- TOMASINI, M.L.; ZANUSSI, S.; SOZZI, M.; TEDESCHI, R.; BASAGLIA, G.; DE PAOLI, P. Heterogeneity of cag genotypes in Helicobacter pylori isolates from human biopsy specimens. **J Clin Microbiol**. v. 41, p. 976-980, 2003.
- TOMB, J.F.; WHITE, O.; KERLAVAGE, A.R.; CLAYTON, R.A.; SUTTON, G.G.; FLEISCHMANN, R.D.; KETCHUM, K.A.; KLENK, H.P.; GILL, S.; DOUGHERTY, B.A.; NELSON, K.; QUACKENBUSH, J.; ZHOU, L.; KIRKNESS, E.F.; PETERSON, S.; LOFTUS, B.; RICHARDSON, D.; DODSON, R.; KHALAK, H.G.; GLODEK, A.; MCKENNEY, K.; FITZGERALD, L.M.; LEE, N.; ADAMS, M.D.; HICKEY, E.K.; BERG, D.E.; GOCAYNE, J.D.; UTTERBACK, T.R.; PETERSON, J.D.; KELLEY, J.M.; COTTON, M.D.; WEIDMAN, J.M.; FUJII, C.; BOWMAN, C.; WATTHEY, L.; WALLIN, E.; HAYES, W.S.; BORODOVSKY, M.; KARP, P.D.; SMITH, H.O.; FRASER, C.M.; VENTER, J.C. The complete genome sequence of the gastric pathogen Helicobacter pylori. **Nature**. v.388, p. 539-547, 1997 .Erratum in: **Nature** v. 389, p. 412, 1997.
- TONELLI, E., FREIRE, L.M.S. **Doenças Infeciosas na Infância e Adolescência**. São Paulo: Medsi, 2000
- TSUCHIA, S. Diagnosis of Epstein-Barr virus-associated diseases. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 44, p. 227-238, 2002.
- UEMURA, N.; OKAMOTO, S.; YAMAMOTO, S.; MATSUMURA, N.; YAMAGUCHI, S.; YAMAKIDO, M.; TANIYAMA, K.; SASAKI, N.; SCHLEMPER, R.J. Helicobacter pylori infection and the development of gastric cancer. **N Engl J Med**. v. 345, p. 784-789, 2001.

VAN DOORN L.J.; FIGUEIREDO, C.; SANNA, R.; PENA, S.; MIDOLO, P.; NG, E.K.; ATHERTON, J.C.; BLASER, M.J.; QUINT, W.G.. Expanding allelic diversity of *Helicobacter pylori* vacA. **J Clin Microbiol.** v. 36, p. 2597-2603, 1998 .

VAUHKONEN, M.; VAUHKONEN, H.; SIPPONEM P. Pathology and molecular biology of gastric cancer. **Best Pract Res Clin Gastroenterol.**;v. 20, p. 651-674, 2006.

VIETH M, STOLTE M. Elevated risk for gastric adenocarcinoma can be predicted from histomorphology. **World J Gastroenterol.** v. 12, p. 6109-6114, 2006.

WATANABE, Y.; KURATA, J.H.; MIZUNO, S.; MUKAI, M.; INOKUCHI, H.; MIKI, K.; OZASA, K.; KAWAI, K. *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. A nested case-control study in a rural area of Japan. **Dig. Dis. Sci.** v. 42, p. 1383–1387, 1997  
WEISS, J.; MECCA, J.; DA SILVA, E.; GASSNER, D. Comparison of PCR and other diagnostic techniques for detection of *Helicobacter pylori* infection in dyspeptic patients. **J. Clin. Microbiol.** v.32, p.1663–1668, 1994.

WERNER, M.; BECKER, K.F.; KELLER, G.; HÖFLER, H. Gastric Adenocarcinoma: Pathomorphology and Molecular Pathology. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 127, p. 207-216, 2001.

WISNIEWSKI, R.M., PEURA, D.A. *Helicobacter pylori*: beyond peptic ulcer disease. **Gastroenterologist.** v. 5, p. 295-305, 1997.

XU, C.; LI, Z.S.; TU, Z.X.; XU, G.M.; GONG, Y.F.; MAN, X.H. Distribution of *cagG* gene in *Helicobacter pylori* isolates from Chinese patients with different gastroduodenal diseases and its clinical and pathological significance. **World J Gastroenterol.** v. 9, p. 2258-2260, 2003.

YAMAOKA, Y., KWON, D.H., GRAHAM, D.Y. A M(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein (*oipA*) of *Helicobacter pylori*. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 97, p. 7533-7538, 2000.

YAMAOKA, Y.; KODAMA, T.; KASHIMA, K.; GRAHAM, D.Y. Antibody against *Helicobacter pylori* CagA and VacA and the risk for gastric cancer. **J Clin Pathol.** v. 52, p. 215-218, 1999.

YAMAOKA, Y.; KODAMA, T.; KASHIMA, K.; GRAHAM, D.Y.; SEPULVEDA, A.R. Variants of the 3' region of the *cagA* gene in *Helicobacter pylori* isolates from patients with different *H. pylori*-associated diseases. **J Clin Microbiol.** v. 36, p. 2258-2263, 1998.

YANAI, A.; MAEDA, S.; HIKIBA, Y.; SHIBATA, W.; OHMAE, T.; HIRATA, Y.; OGURA, K.; YOSHIDA, H.; OMATA, M. Clinical relevance of *Helicobacter pylori* *sabA* genotype in Japanese clinical isolates. **J Gastroenterol Hepatol.** v. 22, p. 2228-2232, 2007.

YOU, W.C.; ZHANG, L.; GAIL, M.H.; CHANG, Y.S.; LIU, W.D.; MA, J.L.; LI, J.Y.; JIN, M.L.; HU, Y.R.; YANG, C.S.; BLASER, M.J.; CORREA, P.; BLOT, W.J.; FRAUMENI, J.F.

JR.; XU, G.W. Gastric dysplasia and gastric cancer: Helicobacter pylori, serum vitamin C, and other risk factors. **J Natl Cancer Inst.** v. 92, p. 1607-1612, 2000.

YU FJ, WU DC, KUO CH, LU CY, SU YC, LEE YC, LIN SR, LIU CS, JAN CM, WANG WM. Diagnosis of Helicobacter pylori infection by stool antigen test in southern Taiwan. **Kaohsiung J Med Sci.** v.17, p. 344-350, 2001.

ZHANG F, WANG L, WU PP, YAN ZW, ZHENG L, YU YY, JIANG XC. In situ analysis of p16/INK4 promoter hypermethylation in esophageal carcinoma and gastric carcinoma. **Chin J Dig Dis.** v. 5, p. 149-155, 2004.

## **8. Anexos**

## **Anexo I**

### **Protocolo de Coleta no Centro cirúrgico**

Durante todo o procedimento utilizar máscara e luvas estéreis.

- 1- Conferir o material a ser utilizado para coleta (Identificação do pacientes, máquina fotográfica, régua, caneta para tubo, criotubo estéril e protocolo a ser preenchido);
- 2- Identificar os tubos com o número da amostra, tipo de mucosa (tumoral ou normal) e a data (Ex.: CG-01-N1/D-M-2004);
- 3- Após a retirada da peça, colocá-la em cuba estéril e lavá-la com soro fisiológico estéril (se necessário). Secá-la com compressa estéril;
- 4- colocar a peça em um campo azul estéril, em seguida a régua e a identificação logo abaixo da peça, tirar uma foto panorâmica e uma foto somente do tumor utilizando flash (total 2 fotos);
- 5- Com o auxílio de pinça e bisturi estéreis, coletar primeiramente quatro espécimes da mucosa normal (o mais distante do tumor), em seguida quatro espécimes do tumor (preferencialmente as bordas, evitando as áreas de necrose e fibrose), colocar o material colhido dentro do criotubo estéril e acondicioná-los imediatamente em recipiente com gelo;
- 6- Tirar uma foto da peça pós-coleta com flash e sem régua;
- 7- Preencher o cadastro do tecido da peça cirúrgica em duplicata e desenhar um esboço marcando os locais dos quais foram coletados, bem como as margens cirúrgicas e o tamanho do tumor;
- 8- Transportar imediatamente os tubos para armazenagem em nitrogênio líquido.

**Anexo II**

Universidade Federal do Ceará  
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. N° 712/04

Fortaleza, 30 de novembro de 2004

Protocolo n° 199/04

**Pesquisador responsável:** Silvia Helena Barem Rabenhorst

**Dept°./Serviço:** Departamento de Patologia e Medicina Legal/UFC

**Título do Projeto:** "Alterações moleculares no câncer gástrico: associação com fatores epidemiológicos"

Levamos ao conhecimento de V.S<sup>a</sup>. que o Comitê de Ética em Pesquisa e do Complexo Hospitalar da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução n°196 de 10 de outubro de 1996 e Resolução n° 251 de 07 de agosto de 1997, publicadas no Diário Oficial, em 16 de outubro de 1996 e 23 de setembro de 1997, respectivamente, aprovou o projeto supracitado na reunião do dia 25 de novembro de 2004.

Outrossim, informamos, que o pesquisador deverá se comprometer a enviar o relatório parcial e final do referido projeto.

Atenciosamente,

*Mirian Parente Monteiro*

Dra. Mirian Parente Monteiro  
Coordenadora Adjunta do Comitê  
de Ética em Pesquisa  
COMEPE/HUWCUFC

**Anexo III**  
**TERMO DE CONSENTIMENTO DO PACIENTE**

**Instituição:** DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL – UFC  
LABORATÓRIO DE GENÉTICA MOLECULAR – LABGEM

**Endereço:** R. Coronel Nunes de Melo, 1127, Porangabuçu

**Investigadora:** Responsável: Silvia Helena Barem Rabenhorst

**Título:** ALTERAÇÕES MOLECULARES NO CÂNCER GÁSTRICO: ASSOCIAÇÃO COM FATORES EPIDEMIOLÓGICOS

Eu, \_\_\_\_\_ por este meio, fui informado (a), em detalhes sobre o estudo intitulado: ALTERAÇÕES MOLECULARES NO CÂNCER GÁSTRICO: ASSOCIAÇÃO COM FATORES EPIDEMIOLÓGICOS. O estudo está sendo realizado pelo Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará. O estudo em questão pretende associar fatores genéticos e ambientais, que podem levar ao desenvolvimento do carcinoma gástrico, de modo a identificar os fatores de risco, tais como a presença de uma bactéria denominada *H. pylori* e de um vírus denominado EBV. Esses serão detectados através da presença do material genético destes agentes infectantes no tumor. Serão também observadas as alterações genéticas das células tumorais. Estas alterações serão vistas pela expressão de proteínas, ou pela análise do DNA/RNA do tumor.

Cerca de 100 pacientes serão incluídos no presente estudo. Portanto, concordando em participar serei um dos pacientes participantes deste estudo que envolve diversas instituições, permitindo coleta de material necessário para o estudo. Não haverá mudança ou perdas em relação a análise pelo patologista do meu material. Paralelamente, serão anotados algumas questões referentes a minha pessoa, no que diz respeito a dados pessoais como a data de nascimento e relativo a hábitos de vida e a minha doença. Estas informações serão retiradas do meu prontuário ou na ausência delas, serão perguntada pessoalmente a mim.

Minha participação não terá benefício direto imediato, em principio, mas que poderá estar contribuindo para que se entenda melhor os fatores de risco e alterações que propiciem o aparecimento do câncer gástrico. A identificação dos fatores de risco para câncer gástrico servirá para direcionar medidas preventivas. Por outro lado as alterações do material genético encontradas nas células tumorais poderão ser usadas como fatores que auxiliarão no diagnóstico, prognóstico e também como alvos das novas terapias que estão sendo agora desenvolvidas.

Todos os dados da minha participação neste estudo serão documentados e mantidos confidencialmente, sendo disponíveis apenas para as autoridades de saúde e profissionais envolvidos neste estudo, os quais, quando necessário, terão acesso ao meu prontuário.

Como minha participação é voluntária, posso abandonar o estudo a qualquer momento, sem que isso resulte em qualquer penalidade ou perda de meus direitos onde recebo atendimento médico. Se tiver qualquer dúvida ou perguntas relativas a esse estudo ou aos meus direitos no que diz respeito a minha participação, posso contactar a Dra. Silvia Helena Rabenhorst no telefone 3288 8206 ou 9994 5689.

Assinatura do paciente: \_\_\_\_\_

Endereço do paciente: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Nome da testemunha: \_\_\_\_\_

Assinatura da testemunha: \_\_\_\_\_

Assinatura do investigador: \_\_\_\_\_

**Anexo IV**  
**Cadastro de Pacientes Submetidos a Coleta de Tecido de Peça Cirúrgica**

**Código: CG** \_\_\_\_\_ **Data** \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Nº Prontuário \_\_\_\_\_ Data de admissão no serviço hospitalar \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Depto Responsável \_\_\_\_\_ Hospital \_\_\_\_\_

Nome \_\_\_\_\_ Sexo F [ ] M [ ]

Endereço \_\_\_\_\_

Contato \_\_\_\_\_ Naturalidade \_\_\_\_\_ Procedência \_\_\_\_\_

Idade \_\_\_\_\_ Nasc \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Cor \_\_\_\_\_ ABO \_\_\_\_\_

Grau de instrução \_\_\_\_\_ Profissão \_\_\_\_\_

**História familiar:**

[ ] Avô [ ] Avó [ ] Mãe [ ] Pai [ ] Irmão(ã) [ ] Tio(a) [ ] Filho(a) Outros \_\_\_\_\_

**Hábitos:** [ ] Sal [ ] Frutas [ ] Verduras [ ] Churrasco [ ] Carne seca [ ] geladeira

[ ] Tabagista Tipo \_\_\_\_\_ Freqüência \_\_\_\_\_ Fum. passivo [ ]

[ ] Álcool Tipo \_\_\_\_\_ Freqüência \_\_\_\_\_

**Dados relativos à neoplasia.**

Data do primeiro diagnóstico \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Exam \_\_\_\_\_

H. pylori [ ]

Sítio anatômico \_\_\_\_\_ Est. Clínico T \_\_\_ N \_\_\_ M \_\_\_

Aspecto morfológico \_\_\_\_\_ Bormann \_\_\_\_\_

**Exame anatomopatológico** Nº: \_\_\_\_\_

**Tratamento:** [ ] Radioterapia [ ] Quimioterapia [ ] Hormonioterapia [ ] Imunoterapia

Protocolo \_\_\_\_\_

**Cirurgia:** realizada em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Cirurgião \_\_\_\_\_

Responsável pela Coleta \_\_\_\_\_

**Tempo de ressecção da coleta:** [ ] <1h [ ] 1h [ ] 2h [ ] 3h [ ] < ou =4h [ ] Outras

**Observações** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Nº de  
 amostra Tumoral congelada [ ] Nº de amostra Normal [ ]

Local Armazenamento: \_\_\_\_\_



**Anexo V**  
**Orçamento Geral**

<b>MATERIAL PERMANENTE</b>	<b>ORIGEM</b>	<b>Qtd</b>	<b>VALOR Total (R\$)</b>
Balança semi-analitica	Celtac	1	2.100,00
Banho-Maria	Quimis	2	700,00
Capela de Exaustão	Quimis	1	1.200,00
Capela de Fluxo Laminar	Pachane	1	4.000,00
Centrifuga para tubos de 15 mL	Eppendorf	1	17.000,00
Centrifuga minspin	Eppendorf	1	2.500,00
Cuba para eletroforese horizontal	Bio-Rad	1	1.500,00
Cuba para eletroforese vertical	Bio-Rad	2	6.000,00
Conjunto de Micropipetas	Eppendorf/Gilson	2	6.000,00
Destilador de água	Biopar	1	750,00
Estufa 60C	Fanen	1	690,00
Fonte para eletroforese	Bio-Rad	1	5.000,00
Forno de Microondas 700watts	Electrolux	1	300,00
Freezer -14C	Prosdócimo	1	800,00
Geladeira Comercial	Eletrólux	2	2.000,00
Freezer-80C	Thermo	1	40.000,00
Micro centrífuga Refrigerada	Eppendorf	1	23.000,00
Medidor de pH	Denver	1	1.300,00
Sistema de fotodocumentação	UVP	1	14.170,00
Sistema de purificação de água	MilliQ	1	17.000,00
Termociclador	Eppendorf	1	24.000,00
<b>Total</b>			<b>170.010,00</b>

**COLETA DE ESPÉCIMES E EXTRAÇÃO DE DNA**

<b>Reagentes e materiais</b>	<b>ORIGEM</b>	<b>Qtd</b>	<b>VALOR Total (R\$)</b>
Álcool Isopropílico	Vetec <sup>®</sup>	3	R\$ 15,00
Álcool Isoamílico	Vetec <sup>®</sup>	1	R\$ 7,00
Cx. luvas de procedimento	Blowtex <sup>®</sup>	20	R\$ 80,00
Clorofórmio	Vetec <sup>®</sup>	3	R\$ 30,00
CTAB	Gibco BRL <sup>®</sup>	1	R\$ 150,00
EDTA	Sigma <sup>®</sup>	1	R\$ 553,00
Etanol P.A.	Vetec <sup>®</sup>	1	R\$ 105,00
Pacote de Criotubos	Gilson <sup>®</sup>	2	R\$ 40,00
SDS	Sigma <sup>®</sup>	1	R\$ 500,00
β-Mercaptoetanol	Sigma <sup>®</sup>	1	R\$ 600,00
Tris Ultrapuro	Sigma <sup>®</sup>	1	R\$ 382,00
<b>SUBTOTAL</b>			<b>R\$ 2.462,00</b>

<b>PCR</b>			
<b>Reagentes e materiais</b>	<b>Origem</b>	<b>Qtd.</b>	<b>Valor R\$</b>
Agarose 500g	Gibco BRL®	1	1.665,00
Azul de Bromofenol	Gibco BRL®	1	100,00
Brometo de etídeo	Sigma®	1	120,00
dNTP set, 100mM (4 x 25uMol)	Amersham®	3	1.320,00
Marcador de PM 100pb	Invitrogen®	1	500,00
Pacote de tubos do tipo Eppendorf (Diversos)	Eppendorf®	4	112,00
Ponteiras descartáveis (Diversas)	Gilson®	4	90,00
22 Pares Primers (detecção de H.pylori, subtipos)	Invitrogen®	2	2.200,00
Taq polimerase/Reagentes para PCR	Invitrogen®	1	3 500,00
Tampão TBE	Sigma®	1	450,00
Agarose	Invitrogen®	1	1 500,00
Acrilamida	GE care	1	1 219,00
Bis-acrilamida	GE care	1	377,00
Reagentes para coloração pela prata	diversos	1	500,00
Bluejuice gel loading buffer	Invitrogen®	1	230,00
<b>SUBTOTAL</b>			<b>13.883,00</b>
<b>TOTAL (PCR e Coleta e Extração de DNA)</b>			<b>16.345,00</b>
<b>TOTAL GERAL</b>			<b>R\$ 186.355,00</b>