



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA
CELULAR

**PREVALÊNCIA E ASSOCIAÇÃO DA INFECÇÃO GÁSTRICA POR
HELICOBACTER PYLORI E DO VÍRUS EPSTEIN-BARR EM CASOS DE
GASTRITE NA POPULAÇÃO DO AMAPÁ**

NÉLISSON CLEI FERREIRA ALVES

Belém – Pará

2017

NÉLISSON CLEI FERREIRA ALVES

**PREVALÊNCIA E ASSOCIAÇÃO DA INFECÇÃO GÁSTRICA POR
HELICOBACTER PYLORI E DO VÍRUS EPSTEIN-BARR EM CASOS DE
GASTRITE NA POPULAÇÃO DO AMAPÁ**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador: Prof. Dr. Rommel Mario Rodriguez Burbano.

BELÉM - PARÁ

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Alves, Néllisson Clei Ferreira.

Prevalência e associação da infecção gástrica por *Helicobacter pylori* e do vírus Epstein-Barr em casos de gastrite na população do Amapá / Néllisson Clei Ferreira Alves, 2017
61 f.:il.

Orientador: Prof. Dr. Rommel Mario Rodriguez Burbano

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2017.

1. Infecção bacteriana e viral. 2. Epidemiologia, mucosa gástrica. 3. Norte do Brasil. I. Título. II. Burbano, Rommel Mario Rodriguez Título. III. Universidade Federal do Pará. Programa de Pós-Graduação em Neurociência e Biologia celular.

CDD - 21. ed. **616.33014**

Bibliotecária Responsável:
TERESA RAQUEL FRANCO DA CONCEIÇÃO
CRB – 2/1291

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nélisson Clei Ferreira Alves

PREVALÊNCIA E ASSOCIAÇÃO DA INFECÇÃO GÁSTRICA POR *HELICOBACTER PYLORI* E DO VÍRUS EPSTEIN-BARR EM CASOS DE GASTRITE NA POPULAÇÃO DO AMAPÁ

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular.

Área de concentração: Biologia Celular

Banca examinadora:

Prof. Dr^a. Barbara do Nascimento Borges
Instituição: Laboratório de Citogenética Humana –
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Carlos Alberto Machado da Rocha
Instituição: Instituto Federal de Educação,
Ciência e Tecnologia do Pará.

Prof. Dr. Rommel Mario Rodriguez Burbano
Instituição: Universidade Federal do Pará

Belém
2017

DEDICATÓRIA

Aos pacientes portadores de *Helicobacter pylori*, vírus Epstein-Barr e comorbidades associadas aos mesmos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por conceder-me mais uma realização em minha vida.

Ao Prof. Dr. Rommel Mario Rodrigues Burbano, orientador desta dissertação, não apenas pelo apoio recebido durante esta jornada, mas também pela amizade, compreensão durante minha ausência, e pelo exemplo de competência e dedicação.

Aos meus pais Raimundo Marinho Alves, mais conhecido como Diquinho (*in memorian*) e Narcisa da Conceição Ferreira Alves pelo amor e dedicação que não mediram esforços para minha educação.

À minha família (Cida, Ana Luiza, Mainá e Luca), à meus parentes, à Andrea e Sebastião, e aos meus amigos Mary Cruz, Pablo Abdon, Maurício Abdon e Alexandre Bragança, pelo apoio, compreensão e incentivo na caminhada desta jornada.

À toda a equipe do Laboratório de Citogenética Humana da UFPA pelo trabalho realizado.

À UFPA, na pessoa dos professores e funcionários do Curso de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular do ICB, pela oportunidade dada.

Nunca saberei tudo, mas hoje tenho
certeza que sei mais que ontem.

(Autor: desconhecido)

RESUMO

A epidemiologia da HP e do vírus Epstein-Barr (EBV) é mundial. A prevalência de ambos os agentes carcinogênicos na população humana mundial é de cerca de 45%. Um estudo recente sugere que coinfeção de EBV com HP *cagA* positiva, aumenta o potencial oncogênico desta bactéria. O objetivo deste trabalho foi identificar a prevalência da bactéria HP e do EBV e a associação desses patógenos e do gene *cagA* em pacientes com gastrite na população do Amapá. Foi realizado um estudo descritivo, do tipo transversal, onde foram analisadas 292 amostras de mucosa gástrica de pacientes com gastrite submetidos a endoscopia, com faixa etária entre 14 e 83 anos de idade. Para detecção da HP foi utilizado o teste da Urease e a Reação em Cadeia da Polimerase, esta metodologia também serviu para revelar as cepas *cagA* positivas da bactéria. Adicionalmente, foi utilizada a técnica de hibridação *in situ* para detecção do EBV e a análise microscópica que determinou as características histopatológicas da mucosa gástrica. Resultados: Nosso estudo mostrou alta prevalência de casos de HP em pacientes com gastrite com uma frequência relativa de 87,67% dos 292 casos analisados, sendo maior incidência, dos casos positivos para HP, no sexo feminino, 88,27%. A incidência do gene *cagA* em amostras de pacientes positivos para HP foi de 72,66%, com maior prevalência no sexo feminino, 75,32%. No presente estudo foram encontrados 8,59% dos pacientes com infecção viral causada por EBV em amostras positivas para HP com maior prevalência no sexo masculino, 9,18%. De acordo com a faixa etária nosso estudo mostrou maior prevalência do gene *cagA* e do EBV em pacientes positivos para HP no segmento entre 44 e 54 anos, com 23,12% e 36,37%, respectivamente. A maioria dos achados deste estudo assemelha-se aos relatos da literatura, contudo, evidenciou-se a necessidade de estudos com maior casuística a fim de melhor esclarecer se há ou não há correlação entre a infecção por HP e EBV no norte do Brasil.

Palavras-chave: infecção bacteriana e viral, epidemiologia, mucosa gástrica, norte do Brasil.

ABSTRACT

The epidemiology of HP and of the Epstein-Barr virus (EBV) is worldwide. The prevalence of both carcinogenic agents, in the world human population is about 45%. A recent study suggests that EBV coinfection with HP *cagA* positive increases the oncogenic potential of this bacterium. The objective of this study was to identify the prevalence of the bacterium HP and of the virus EBV and the association of those pathogens and of the *cagA* gene in patients with gastritis in the population of Amapá. A descriptive study was accomplished, of the transversal type, where 292 samples of gastric mucous of the patients were analyzed with gastritis submitted to the endoscopy, age group between 14 and 83 years. For detection of HP, Urease test and Polymerase Chain reaction were used; this methodology was also useful to reveal the positive *cagA* of the bacterium. Additionally, the technique of *in situ* hybridization was used for detection of EBV and the microscopic analysis that determined the histopathological characteristics of the gastric mucous. Results: The study showed high prevalence of cases of HP in patients with gastritis with a relative frequency of 87,67% of the 292 analyzed cases, a higher incidence, of HP positive cases, in female, 88,27%. The incidence of the *cagA* gene in samples of positive patients for HP was 72,66%, higher prevalence in female, 75,32%. In the present study 8,59% of the patients were found with viral infection caused by EBV in positive samples for HP with bigger prevalence in male, 9,18%. According to the age group, the study showed higher prevalence of the gene *cagA* and of EBV in positive patient for HP in the age group between 44 and 54 years, with 23,12% and 36,37%, respectively. Conclusion: Most of the findings of this study are similar to the reports from the literature, however, it is necessary other studies in order to explain if there is or there is no correlation between the infection for HP and EBV in the north of Brazil.

Keywords: bacterial infection and viral, epidemiology, gastric mucous, north of Brazil.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Composição e morfologia da <i>Helicobacter pylori</i>	19
Figura 2 - Modelo da carcinogênese de acordo com o subtipo histológico.....	21
Figura 3 - Representação esquemática de motivos CagA e EPIYA.....	23
Figura 4 – Visualização do EBV no citoplasma do linfoblasto derivados de linfoma Burkitt cultivado <i>in vitro</i>	25
Figura 5 - Infecção por EBV em portadores saudáveis.....	28
Figura 6 - Prevalência de casos de HP em pacientes com gastrite.....	38
Figura 7 - Prevalência de HP por sexo.....	39
Figura 8 - Prevalência de casos <i>cagA</i> em relação a casos positivos de HP.....	40
Figura 9 - Prevalência de casos <i>cagA</i> em relação a casos positivos de HP por sexo.....	41
Figura 10 Prevalência de casos EBV em relação a casos positivos de HP.....	41
Figura 11 - Prevalência de casos EBV em relação a casos positivos de HP por sexo.....	42
Figura 12 - Prevalência de casos <i>cagA</i> em relação a casos positivos de HP por faixa etária.....	43
Figura 13 - Prevalência de casos EBV em relação a casos positivos de HP por faixa etária.....	43
Quadro 1 – Oligonucleotídeos utilizados na determinação dos genes urease e <i>cagA</i>	36

LISTA DE ABREVIATURAS

%: Percentagem

µm: Micrômetro

cagA: cytotoxin-associated gene / gene associado à citotoxina

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

CG: Câncer gástrico

CpG: Metilação do dinucleotídeo citosina-guanina por meio de ligações fosfato

DNA: Ácido desoxirribonucléico

EBER: *Epstein Barr small RNA* / Pequeno RNA viral do EBV

EBV: *Epstein Barr virus* / Virus de Epstein-Barr

EBV⁺: positivo para o vírus Epstein-Barr.

EBNA: *Epstein Barr viral nuclear antigen* / Antigen nuclear do EBV

EDA: Endoscopia digestiva alta

GP 350: Glicoproteína 350

HIS: Hibridização *in situ*

HIV: Human immunodeficiency vírus / vírus da imunodeficiência humana

HP: *Helicobacter pylori*

IARC: International Agency for Research on Câncer / Agência Internacional de Pesquisa Sobre o Câncer

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

IgA: Imunoglobulina A

IgG: Imunoglobulina G

INCA: Instituto Nacional do Câncer

In vitro: Procedimento realizado em ambiente controlado como em um laboratório, em placa de Petri ou ainda em tubo de ensaio

IBP: Inibidor de bomba de prótons

Kpb: Kilobases

LMP: *Latente Membran protein* / proteína de membrana do linfócito

OMS: Organização Mundial de Saúde

RNA: Ácido ribonucleico

RNS: Espécie reativa de nitrogênio

ROS: Espécie reativa de oxigênio

P53: Gene supressor de tumor

PCR: *Polymerase Chain Reaction* / Reação em cadeia da polimerase

UFPA: Universidade Federal do Pará

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Justificativa.....	17
1.2 Objetivos.....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 <i>Helicobacter pylori</i>.....	19
2.1.1 Considerações gerais.....	19
2.1.2 Transmissão e prevalência.....	20
2.1.3 Fisiopatogenia.....	21
2.1.3.1 A ilha de patogenicidade <i>cagA</i>	23
2.1.4 Resposta inflamatória a HP.....	24
2.2 Vírus Epstein-Barr (EBV).....	24
2.2.1 EBV: a descoberta do primeiro vírus tumoral humano	24
2.2.2 Características biológicas do EBV.....	25
2.2.3 Epidemiologia do EBV e a sua Associação ao Câncer Gástrico.....	26
2.2.4 Características clínico-patológicas e moleculares do EBV.....	27
2.2.5 Diagnóstico da infecção por EBV no Câncer Gástrico.....	29
2.3 HP e EBV em câncer gástrico.....	30
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 Tipo de pesquisa.....	31
3.2 local e período do estudo.....	31
3.3 População e amostra do estudo.....	31
3.4 Critérios de inclusão e exclusão.....	32
3.5 Coleta de dados.....	32
3.5.1 Endoscopia digestiva alta.....	33
3.5.2 Histopatologia.....	33
3.5.3 Lâminas com cortes histológicos.....	33
3.5.3.1 Hibridização <i>in situ</i>	33

3.5.3.2 Critérios para análise das lâminas.....	34
3.5.4 Extração de DNA.....	35
3.5.5 Diagnóstico de <i>Helicobacter pylori</i>	35
2.5.6 Determinação da presença do gene <i>cagA</i>	35
3.6 Análise do dados.....	36
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS.....	46
APÊNDICES.....	56

1 INTRODUÇÃO

A HP é um bacilo gram-negativo, espiralado, microaerófila, tendo como principal reservatório o estômago humano, podendo levar a úlceras pépticas, gastrite ativa e crônica, linfoma não-Hodgkin e adenocarcinoma gástrico (TOHIDPOUR *et al.*, 2017). Com formato de bastonete essa bactéria tem de 3 a 5 µm (micrômetro) de comprimento por 0,5 µm de largura, sua parede celular é lisa e possui de quatro a seis flagelos embainhados e com bulbo terminal (NIEDERLE & MOREIRA, 2010).

A infecção bacteriana crônica da mucosa gástrica por HP leva à instabilidade genômica (SINGH & JHA, 2017). A consequência da vulnerabilidade genômica é o desenvolvimento de doenças com variados níveis de lesões em humanos, como gastrite crônica, úlcera péptica e câncer gástrico (LADEIRA *et al.*, 2003). A HP, que reconhecidamente infecta mais da metade da população mundial (NAGINI, 2012), pode acometer o ser humano em qualquer idade sendo que diversos trabalhos epidemiológicos mostram que há maior frequência de contaminação na infância. Portanto, o diagnóstico quando realizado ainda nessa faixa etária pode representar uma diminuição da possível evolução da infecção em patologias mais graves quando adultos (BARILE *et al.*, 2009)

A forma de transmissão mais provável da HP é a fecal-oral, por indivíduos infectados, ou através de água contaminada. A condição sócio-econômica, o aglomerado de pessoas na família, baixo grau de escolaridade, condições higiênicas inadequadas e saneamento básico precário são fatores que aumentam o potencial de infecção por essa bactéria (RODRIGUES *et al.*, 2005).

Dos indivíduos infectados, cerca de 15 a 20% dos casos resultam em complicações clínicas. As cepas de HP apresentam variações genotípicas, que causam ação do processo inflamatório através de mediadores e citocinas, que levam a diferentes graus de resposta inflamatória, tendo como consequência diferentes patologias. As cepas de HP que apresentam a ilha de patogenicidade *cag* são responsáveis por respostas inflamatórias mais graves, como na transcrição do gene *cag A*, que leva à síntese de proteína

relacionadas à aderência da bactéria e à resposta inflamatória mais acentuada, elevando o risco de desenvolvimento de complicações gástricas (LADEIRA *et al.*, 2003). Indivíduos infectados com HP podem desenvolver gastrite antral que pode evoluir para úlcera duodenal - raramente chegando a linfoma -, ou gastrite atrófica multifocal o que representa grupo de risco para úlcera gástrica, câncer gástrico ou linfoma (TAN & WONG, 2011)

A localização de uma úlcera péptica, quando considerada em associação com a infecção pela HP, dá ao clínico o padrão e a topografia da inflamação associada a HP no estômago. As úlceras duodenais estão associadas à gastrite antral predominante da variedade não atrófica, hipergastrinemia e hipersecreção de ácido. Os pacientes com úlcera duodenal não desenvolvem gastrite atrófica do corpo e, conseqüentemente, mantêm boa secreção ácida. Contudo, acredita-se que as úlceras gástricas estejam associadas a uma gastrite crônica não-atrófica no início, que evolui para a atrofia crônica, que envolve o corpo e o antro gástrico diminuindo a produção de ácido clorídrico (TAN & WONG, 2011). Estudos mostram que a infecção pela HP desencadeia processo inflamatório que causa danos oxidativos que podem estar relacionados ao desenvolvimento de condições pré-neoplásicas (FOX & WANG, 2002).

Menos de 1-2% dos pacientes infectados com HP desenvolverão câncer gástrico, geralmente adenocarcinoma de tipo intestinal. O adenocarcinoma de tipo difuso é relativamente mais comum em populações de baixo risco de câncer gástrico. Além disso, parece haver fatores ambientais significativos que contribuem para a etiopatogenia do CG, incluindo o tabagismo e o álcool (TAN & WONG, 2011). O câncer de estômago é atualmente o quinto tipo de câncer mais comum, com aproximadamente 1 milhão de novos casos diagnosticados em todo o mundo a cada ano e é a terceira principal causa de morte relacionada ao câncer. A carcinogênese gástrica está principalmente relacionado à infecção crônica com *Helicobacter pylori* (HP) (CHARVAT *et al.*, 2016). Estima-se que quase 90% dos casos de câncer gástrico não cárdicos são atribuíveis a HP (PLUMMER., *et al.*, 2015).

O diagnóstico da infecção por HP envolve métodos invasivos e não invasivos, sendo que para se ter um diagnóstico mais confiável recomenda-se o uso de pelo menos dois testes (KOLETZKO *et al.*, 2011). A terapia farmacológica se dá através do uso de inibidores de prótons, imidazol e amoxicilina ou inibidor de bomba de prótons, imidazol e claritromicina (KUO, 2012).

O EBV contamina uma grande parcela de seres humanos onde permanece por toda a vida na forma latente em linfócitos B e em células epiteliais (ELZBIETA *et al.*, 2011). Apesar da HP ser considerada a mais prevalente em doenças gastroduodenal, seu percentual de associação com o EBV ainda necessita de mais estudos comprobatórios (SHUKLA *et al.*, 2011).

A epidemiologia da bactéria HP e do vírus Epstein-Barr (EBV) se dá em todo o mundo. A existência de ambos os agentes carcinogênicos, HP e EBV, na população humana mundial é de cerca de 45%. A estatística mostra que a cada 100 mil habitantes aproximadamente 180 cidadãos estão desenvolvendo o câncer gástrico (CG) e outras anomalias gástricas (SINGH & JHA, 2017). Embora a prevalência da HP seja global, sua incidência vem declinando nas últimas décadas (EUSEBI *et al.*, 2014).

1.1 Justificativa

A descoberta da bactéria HP em pacientes com a doença ulcerosa péptica mostrou-se essencial para o entendimento da etiologia das patologias gástricas. Embora diversos estudos tenham sido realizados muitos aspectos sobre seu diagnóstico e tratamento ainda carecem de melhores entendimentos e explicações. Somando-se a isso a HP que possui potencial carcinogênico, comprovado em vários trabalhos científicos, a coloca como um objeto de estudo de grande relevância para pesquisas científicas.

Esse patógeno apresenta diversos fatores de virulência que causam diferentes graus de inflamação da mucosa gástrica o que faz com que haja a necessidade de estudos sobre o tipo de virulência prevalente levando em consideração a faixa etária e o gênero. Em relação ao vírus *Epstein-Barr*, estudos apontam suas implicações em neoplasias sólidas, sendo importante

conhecer sua incidência, correlação com a bactéria HP e com a suscetibilidade e os distúrbios gástricos.

1.2 Objetivos

1.2.1 Geral

- Identificar a prevalência de *Helicobacter pylori* e do vírus Epstein-Barr em casos de gastrite em amostras de uma população do norte do Brasil.

1.2.2 Específicos

- Correlacionar os laudos endoscópicos e histopatológicos à infecção por *Helicobacter pylori*;
- Diagnosticar a prevalência do fator de virulência *cagA* em amostras *Helicobacter pylori* positivas.
- Relacionar a presença do vírus *Epstein-Barr*, com a infecção por *Helicobacter pylori*.
- Correlacionar a presença do gene *cagA* e do vírus Epstein-Barr com a infecção por *Helicobacter pylori* levando em consideração o sexo e a idade.

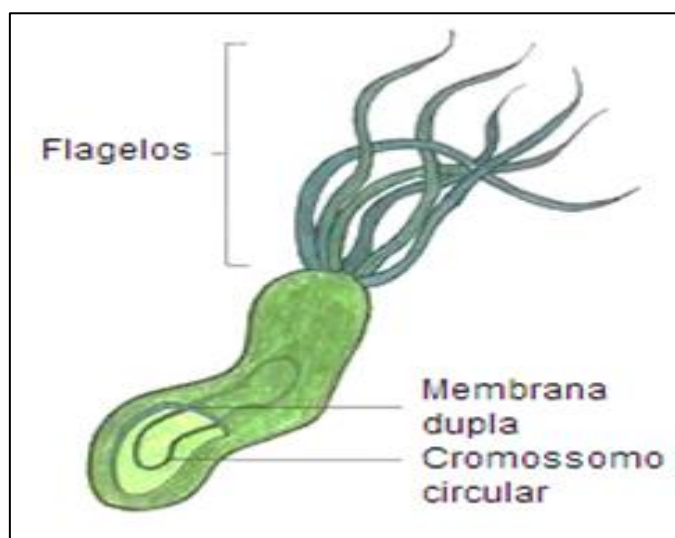
2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Helicobacter pylori* (HP)

2.1.1 Considerações gerais

Em 1984, Marshal e Warren publicaram um estudo feito em 100 pacientes com gastrite crônica e úlcera péptica onde detectaram a presença da bactéria HP nas biópsias de 58 pacientes. Esse estudo representou para a ciência um grande salto para a compreensão e tratamento de doenças digestivas como a úlcera péptica e câncer gástrico. Essa descoberta foi tão expressiva no mundo científico que rendeu o prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 2005 (ESPINO *et al.*, 2010).

A HP é um bacilo gram-negativo, espiralado, microaerófilo, tendo como principal reservatório o estômago humano, pode levar a úlceras pépticas, gastrite ativa e crônica, linfoma não-Hodgkin e adenocarcinoma gástrico distal (TOHIDPOUR *et al.*, 2017). Com formato de bastonete essa bactéria tem de 3 a 5 μm de comprimento por 0,5 μm de largura, sua parede celular é lisa e possui de quatro a seis flagelos embainhados e com bulbo terminal (NAITO & YOSHIKAWA, 2002).



Fonte: adaptado de Michelle Wiepje, 2008.

Figura 1 – Composição e morfologia da *Helicobacter pylori*

Existem variações genômicas entre as cepas de HP que fazem com que haja a codificação de diferentes fatores de virulência, determinando a

manifestação de diversos tipos de lesão no hospedeiro levando a variados graus de inflamação da mucosa gástrica (MALFERTHEINER *et al.*, 2012; SANTACROCE & BUTHANI, 2016).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) considera a bactéria HP como carcinógeno I (IARC, 1994). Apesar da associação da HP com diversas doenças gástricas, inclusive com alguns tipos de câncer gástrico, existem pacientes infectados por essa bactéria que não desenvolvem tais patologias (MARTINS *et al.*, 2005). Doenças gástricas, como a gastrite, são o resultado da interação das características genéticas do hospedeiro, do ambiente e da própria virulência da bactéria (FOCK & ANG, 2010). Esses fatores agem no microambiente gástrico por longo período de tempo (CORREA, 1992).

2.1.2 Transmissão e prevalência

Com distribuição pelos cinco continentes, a HP é um microrganismo infeccioso e sua prevalência sofre variação de acordo com a idade, nível socioeconômico e a raça. Em países em desenvolvimento, onde a maioria das crianças é infectada antes dos 10 anos, a prevalência da HP, em adultos, atinge 80% da população (FRUGIS *et al.*, 2016). A incidência da HP no sexo masculino é em média de 52%, enquanto que no sexo feminino é de 48% (SIMÕES, 2016).

A forma de contaminação do ser humano pela HP é oral-oral e fecal-oral. A condição sócio-econômica, o aglomerado de pessoas na família, baixo grau de escolaridade, condições higiênicas inadequadas e saneamento básico precário são fatores que aumentam o potencial de infecção por essa bactéria (FRUGIS *et al.*, 2016). Fora do corpo humano a HP pode permanecer viva por longo tempo em água (reservatórios de água por exemplo), vegetais e fezes (FRUGIS *et al.*, 2016).

Em países desenvolvidos estudos mostram que a contaminação ocorre após o terceiro ou quinto ano de vida, enquanto que em países em desenvolvimento essa contaminação pode ocorrer ainda no primeiro ano de vida da criança (LADEIRA *et al.*, 2003). A alta prevalência da infecção por HP em crianças nos países em desenvolvimento contribui para a manifestação do

quadro de infecção crônica na maioria dos jovens, adultos e população mais velha (SINGH *et al.*, 2003).

Apesar da HP não causar problemas na maioria das pessoas, entre os indivíduos infectados cerca de 10% desenvolvem doença de úlcera péptica, pelo menos 2% desenvolvem câncer gástrico e menos de 0,1% desenvolvem linfoma associado à mucosa do tecido linfóide (MALT) (PEEK, 2006; BUCKER *et al.*, 2012; OLUWASOLA, 2014).

2.1.3 Fisiopatogenia

As pessoas infectadas pela HP podem desenvolver gastrite antral que pode evoluir para úlcera duodenal - raramente chegando a linfoma -, ou gastrite atrófica multifocal, o que representa grupo de risco para úlcera gástrica, câncer gástrico ou linfoma (TAN & WONG, 2011) (Figura 1). A HP está ligada à produção de espécie reativa de oxigênio (ROS) e de espécie reativa de nitrogênio (RNS) que podem ter como resultado danos no DNA deixando o indivíduo infectado suscetível ao desenvolvimento de câncer gástrico (DAS & PAUL, 2007).

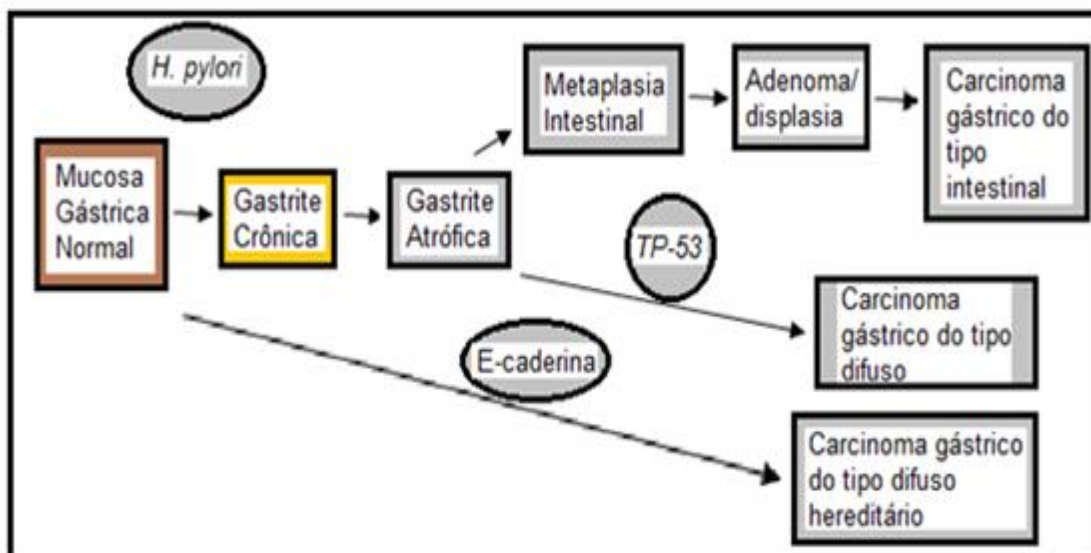


Figura 2 - Modelo de carcinogênese de acordo com o subtipo histológico (adaptado de Yuasa 2003)

A mucosa gástrica, por ação da gastrite atrófica crônica, desenvolve atrofia multifocal e metaplasia intestinal, que depois evolui para displasia e, por fim, havendo o desenvolvimento do carcinoma invasivo (CORREA, 2002).

Algumas características contribuem para a virulência da HP como a motilidade, poder de adesão à célula hospedeira, produção de enzimas tóxicas, especialmente lipase, urease e proteases (LIMA & RABENHORST, 2009), e diversidade genética (COSTA *et al.*, 2009)

A motilidade da HP é garantida pela vibração dos flagelos na camada viscoelástica, barreira química e mecânica protetora do tecido epitelial gástrico, propiciando penetração rápida na mucosa do estômago para que a bactéria se proteja da acidez e do peristaltismo nesse órgão (BLASER, 1997).

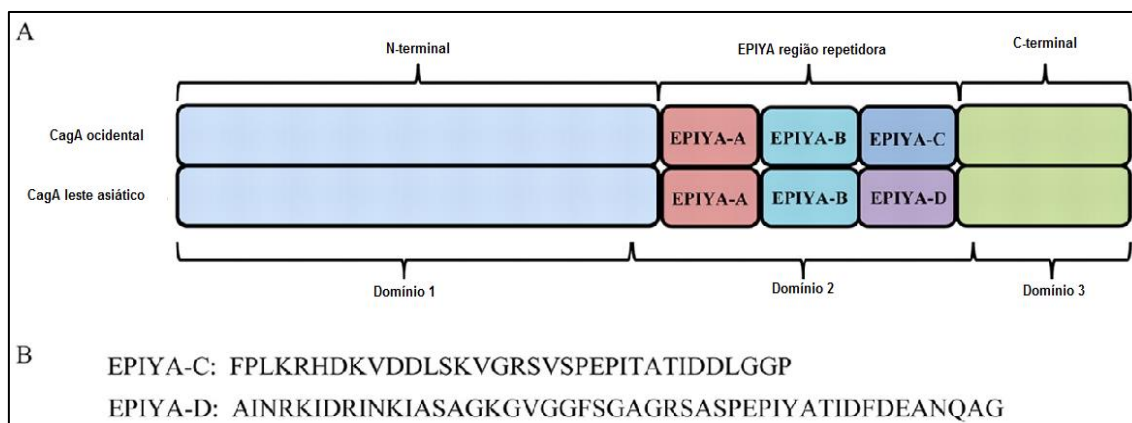
A adesão da HP às células epiteliais gástricas se dá através de estruturas circulares que a envolve, dessa forma, dificultando a sua eliminação por peristaltismo gástrico (BOREN *et al.*, 1993).

A HP tem a capacidade de sintetizar enzimas que alteram a estrutura, integridade, síntese e secreção do muco gástrico. As enzimas lipase e protease degradam a camada mucosa contribuindo para a progressão da bactéria. A urease tem a função de realizar a hidrólise da uréia resultando na produção de amônia que age como receptor de íons de H⁺, tornando o ambiente intracelular da bactéria neutro, protegendo-a da acidez gástrica imposta pelo ácido clorídrico. Superóxido dismutase, catalase e arginase protegem a bactéria contra atividade lítica de macrófagos e neutrófilos, diminuindo a eficácia da resposta imunológica do hospedeiro (LADEIRA *et al.*, 2003).

A heterogeneidade genômica no DNA da HP garante a diversidade de cepas bacterianas o que resulta na codificação de diversos fatores de virulência que contribuem para a manifestação de lesões gástricas no hospedeiro (FOCK & ANG, 2010; MALFERTHEINER *et al.*, 2012). Além dessa vantagem, a diversidade genética da bactéria pode contribuir para a sua adaptação no estômago do hospedeiro e para o prognóstico clínico da infecção (COSTA *et al.*, 2009).

2.1.3.1 A Ilha de patogenicidade *cag* (*cag*-PAI)

A diversidade dos genes associados à virulência da HP, como o *cagA* (*cytotoxin-associated gene*), tem papel relevante no resultado clínico da infecção por essa bactéria. A ilha de patogenicidade *cag*-PAI possui 40 Kb com aproximadamente 31 genes, presentes em 60 a 90% das cepas em todo o mundo e está envolvido no desenvolvimento do câncer gástrico (LIMA & RABENHORST, 2009; OLBERMANN, *et al.*, 2010).



Fonte: Adaptado de DUNCAN, 2012. Traduzido por: Nélisson Clei Ferreira Alves

Figura 3. Representação esquemática de motivos CagA e EPIYA. (A) Diagrama esquemático de CagA (não desenhado na escala). Os motivos de EPIYA são locais de fosforilação de tirosina. Os motivos EPIYA-C são encontrados comumente nas sequências CagA ocidentais, e os motivos EPIYA-D são encontrados comumente nas sequências CagA da Ásia Oriental. (B) motivos EPIYA-C e EPIYA-D representativos.

As cepas de HP podem ser divididas em dois grupos, as cepas *cagA*-positivas e as cepas *cagA*-negativas baseados na presença/ausência do produto do gene terminal da *cag*-PAI, o *cagA*. As cepas *cagA*-positivas estão associadas com gastrite severa, úlcera péptica, gastrite atrófica e câncer gástrico não-cárdia, No caso do gene *cagA* apresentando prevalência de 60% a 100% nas cepas positivas para HP, contribuindo para o aumento da virulência da cepa (MARTINS *et al.*, 2002).

O gene *cagA* é um marcador para o reconhecimento da presença de *cag*-PAI. Este gene é responsável em codificar a citotoxina *cagA* que quando injetada no citoplasma da célula epitelial gástrica, interage com proteínas da

célula hospedeira, induzindo alterações na morfologia das células e nas respostas mitogênicas pró-inflamatórias (OLBERMANN, *et al.*, 2010).

Além de causar essa instabilidade do ciclo celular, as cepas *cagA* positivas induzem a expressão da *DNA-editingenzime*, que leva ao acúmulo de mutações para a proteína supressora tumoral P53 (DELAHAY & RUGGE, 2012).

Apesar dos avanços da compreensão estrutural e funcional do gene *cagA*, muito ainda precisa ser entendido sobre as circunstâncias que, conjuntamente, contribuem para permitir que esse gene inicie a carcinogênese (MURATA-KAMIYA *et al.*, 2010).

2.1.4 Resposta inflamatória a HP

Em decorrência da relação da presença da ilha de patogenicidade *cagPAI* na HP com a resposta inflamatória gástrica, a identificação do gene *cagA* representa um marcador para a presença do *cagPAI* assim também como para o diagnóstico de linhagens HP com maior potencial de virulência. Estudos mostram que pacientes infectados por linhagens de HP negativas para o gene *cagA* apresentam menos risco para o desenvolvimento de câncer gástrico ao serem comparados com pacientes contaminados por linhagens *cagA* positivas (IKENOUE *et al.*, 2001)

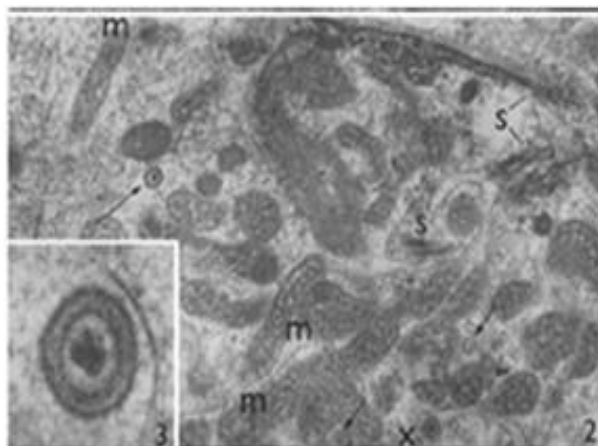
2.2 VIRUS EPSTEIN BARR (EBV)

2.2.1 EBV: a descoberta do primeiro vírus tumoral humano

Em 1958, Denis Burkitt, cirurgião britânico, descreveu a relação de um vírus com o câncer em crianças de algumas áreas da África Oriental. Em 1964 Anthony Epstein, Yvone Barr e colaboradores, através do uso da microscopia eletrônica, para a análise de amostras de linhagem celular estabelecida a partir de biopsia de linfoma de Burkitt, identificaram partículas semelhantes a

herpesvírus em uma pequena parte das amostras dessas células (EPSTEIN *et al.*, 1964). Esse novo vírus passou a ser chamado de Vírus Epstein-Barr ou EBV, (Figura 4).

No ano de 1968, Henle e Henle, com base na soroconversão, descreveram a associação do vírus Epstein Barr à mononucleose infecciosa (MONTEIRO, 2010). Na década de 1980, o EBV foi associado ao linfoma não Hodgkin e à leucemia de células pilosas, em pacientes soropositivos para HIV. Desde então o EBV tem sido identificado em diversos tumores, incluindo as síndromes linfoproliferativas de célula B, o linfoma de células T e a doença de Hodgkin. No ano de 1997, o EBV foi classificado pela *International Agency for Research on Cancer*, como um carcinógeno de grau I (HAU & TSAO, 2017)).



Fonte: Adaptado de Epstein *et al.*, 1965

Figura 4 - Visualização do EBV no citoplasma de linfoblastos derivados de linfoma de Burkitt cultivados *in vitro*

2.2.2 Características Biológicas do EBV

O EBV pertence à família Herpesviridae, subfamília Gamaherpesvirinae e foi o primeiro vírus determinado como oncogene em humanos (EPSTEIN *et al.*, 1964; JAVIER & BUTIEL, 2008). É um herpesvírus de DNA de cadeia dupla com 184 Kpb de comprimento codificante de 85 genes (THOMPSON & KURZROCK, 2004). Possui um cerne circundado por um capsídeo icosadeltaédrico com 162 capsômeros e revestido por um envoltório glicoprotéico (CONNOLLY *et al.*, 2011).

O EBV contamina uma grande parcela de seres humanos onde permanece por toda a vida na forma latente em linfócitos B e em células epiteliais (ELZBIETA *et al.*, 2011). O EBV entra nas células B através da ligação da proteína gp350 ao receptor do complemento do tipo 2 (CR2), também denominado CD21. Porém, em decorrência da expressão do receptor CD21 no epitélio gástrico ser baixa ou inexistente, a entrada do vírus ocorre principalmente pelo contato célula a célula entre linfócitos e a célula gástrica (IMAI *et al.*, 1998).

2.2.3 Epidemiologia do EBV e a sua Associação ao Câncer Gástrico

A detecção de EBV em carcinoma linfoepiteliais foi determinada pela primeira vez em 1990 por Burke *et al.* No decorrer dos anos 90, a partir do surgimento da técnica de hibridização *in situ*, que consiste na detecção da expressão de pequenas moléculas RNAs (EBERS) codificados pelo EBV, estudos mostraram resultados positivos, na maioria dos casos, para o genoma do EBV em carcinoma linfoepitelial. O EBV está associado a alterações proliferativas de caráter benigno e maligno de origem linfóide, como por exemplo, tumorigênese neoplásica (PEREIRA DE LIMA & RABENHORST, 2006)

O EBV, que se apresenta com grande distribuição pelo mundo, estabelece infecção em forma de latência em 95% da população global (SINGH & JHA, 2017). A coinfeção do EBV com a bactéria HP aumenta o risco para o desenvolvimento de gastrite e úlcera péptica (PIAZUELO *et al.*, 2010).

No Brasil, a prevalência do EBV varia entre 5 a 11,3% na população, com maior incidência em pacientes do sexo masculino. No estado do Ceará, essa prevalência é de 8% nos pacientes, com maior incidência em casos com idade a partir de 45 anos. Já no estado de São Paulo a prevalência de EBV é de 3% nos pacientes com maior incidência em pessoas com idade de 65 anos em diante (PEREIRA DE LIMA *et al.*, 2011).

Diversos estudos têm sido realizados para compreender o papel dos patógenos que infectam o estômago humano dentre eles o EBV, na

carcinogênese gástrica (DE SOUZA, 2014). Apesar da elevada taxa de infecção pelo EBV, apenas uma pequena parcela da população humana desenvolve tumores (THOMPSON & KURSROCK, 2004). Nos casos de carcinoma gástrico associado ao EBV (EBV-GC), há predominância da infecção em indivíduos do sexo masculino (PIAZUELO *et al.*, 2010).

A transmissão do EBV se dá através da saliva desenvolvendo infecção nas células epiteliais da orofaringe, nasofaringe e glândulas salivares e, posteriormente se dissemina para os tecidos linfóides, onde infecta os linfócitos B que, através da gastrite atrófica, por infiltração podem entrar em contato com as células epiteliais gástricas (DE SOUZA *et al.*, 2014). Somado a isso, a gastrite intensa pode criar um ambiente rico em citocinina, que sustenta o crescimento clonal de células epiteliais infectadas pelo EBV (SAIKI *et al.*, 1996; DE SOUZA *et al.*, 2014).

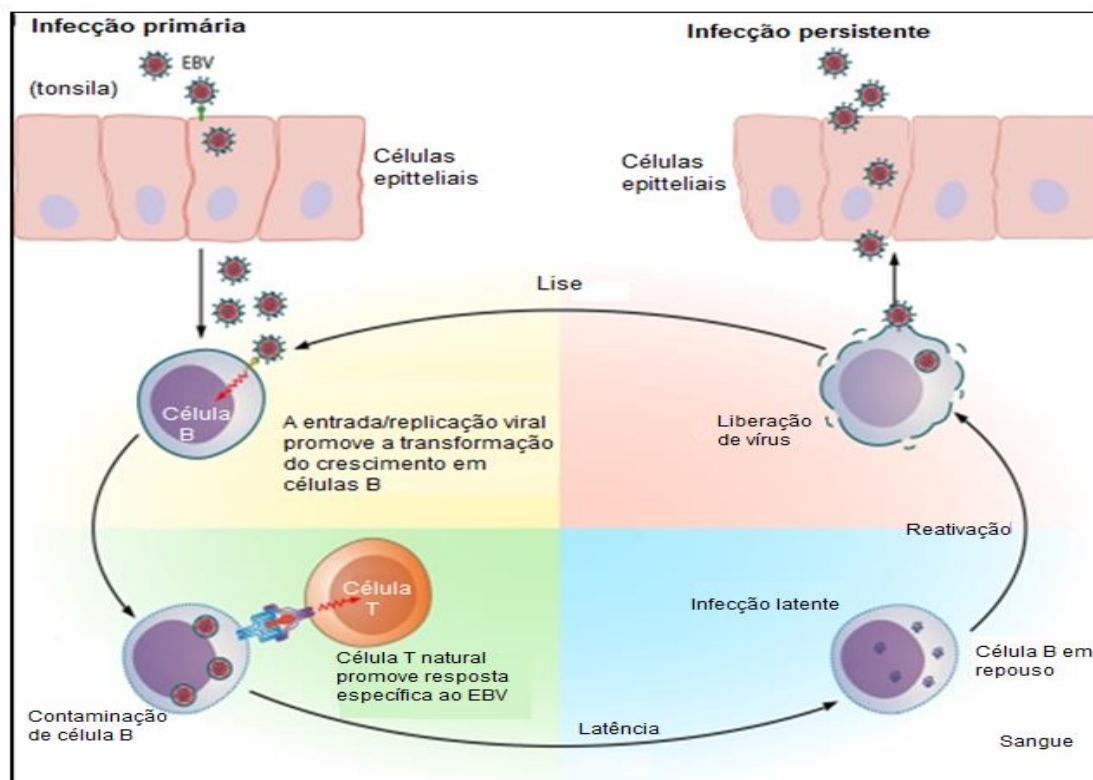
A maioria desses indivíduos transmite intermitentemente esse vírus, e a infecção ocorre durante a infância nos primeiros anos de vida (DE SOUZA *et al.*, 2014).

O EBV tem a capacidade de produzir infecção latente com caráter periodicamente reativo. O processo de reativação de latência mostra, na maioria dos casos, que a infecção é adquirida durante a infância e no caso do surgimento, no futuro, de câncer nos adultos (CARVALHO, 2006).

2.2.4 Características Clínico-Patológicas e Moleculares do EBV

Após a entrada do EBV nas células da cavidade oral há duas possíveis formas de infecção denominadas lítica e latente. O EBV no estado epissomal, é tido como latente e verifica-se a expressão de até 12 genes durante a latência, dependendo do tipo celular ou do estado imunológico do hospedeiro (LIMA, 2006). Os produtos gênicos são: seis antígenos nucleares do EBV (EBNAs 1, 2, 3A, 3B e 3C e EBNA-LP), três proteínas latentes de membrana (LMP-1, LMP-2A e LMP-2B), duas pequenas moléculas de RNA (EBER-1 e 2) e transcritos com múltiplos *splicing* da região BamHI A do genoma viral (BARF0 e de BARF1) (TANG *et al.*, 2012) (Figura 3).

Para que o EBV desenvolva sua característica oncogênica é necessário que ele mantenha seu genoma no interior das células hospedeiras sem matá-las e dessa forma evitar a ação do sistema imunológico (DE SOUZA *et al.*, 2014). Quando o epissoma do EBV está nas células B de memória não há expressão de qualquer proteína de latência conhecida. Porém, no momento que as células de memória latentes infectadas se reproduzem no entorno, o EBV expressa o seu EBNA-1, que é responsável em conservar o genoma do vírus na célula, através da inserção do mesmo no DNA da célula hospedeira, tendo como consequência sua replicação (YATES *et al.*, 1985). A proteína EBNA 1 é a única que é expressa em todos os tecidos malignos associados ao EBV (CHEN *et al.*, 2012). A expressão da LMP-1 em indivíduos imunodeprimidos pode induzir a transformação de linfócitos B e o surgimento de processos linfoproliferativos (DIAS *et al.*, 2009).



Fonte: Odumade, Hogquist & Balfour, 2011. Traduzido por: Néllisson Clei Ferreira Alves

Figura 5: Infecção por EBV em indivíduos saudáveis. A infecção primária por EBV começa na cavidade oral. O EBV usa diferentes glicoproteínas para infectar células epiteliais e células B *naive*. A entrada viral resulta no transporte do genoma de EBV para o núcleo das células B, onde ocorre a replicação por DNA viral e celular. Os produtos do gene EBV ativam o programa de crescimento de células B, resultando numa grande proliferação de células linfoblastóides. A ativação de célula T, que se dá pela presença de antígenos, ocorre paralelamente. Normalmente, a sobrecarga de células linfoblastóide é destruída por linfócitos T citotóxicos. Uma vez na circulação, as células B de memória previamente ativadas, podem continuar a sofrer replicação lítica ou, se o EBV desligar a maioria dos seus genes codificadores de proteínas, ocorre a latência. Por fim, à medida que as células recirculam entre os compartimentos oral e periférico, as células B em repouso podem ser ativadas, resultando em reativação viral e replicação.

Existem estudos que mostram a associação da presença do EBV com a elevada frequência de metilação de regiões promotoras de genes reguladores do ciclo celular, genes de reparo e de proteção de DNA, genes de adesão celular e de apoptose (SUDO *et al.*, 2004).

Um estudo recente sugeriu que a proteína SHP1 do hospedeiro interage com a proteína *cagA* da HP e causa desfosforilação do gene *cagA*, evitando assim a atividade oncogênica da *cagA*. Porém, a coinfeção com EBV causa a metilação do SHP1 do hospedeiro e impede sua atividade de desfosforilação da *cagA* e, portanto, pode aumentar potencial oncogênico da *cagA* (BUELOW *et al.*, 2016)

2.2.5 Diagnóstico da Infecção por EBV no Câncer Gástrico

Em pacientes EBV-CG são encontrados índices elevados de imunoglobulinas (Ig), especialmente IgA e IgG, que agem contra antígenos do capsídeo viral, por um período maior que 5 anos, portanto antes do diagnóstico do câncer gástrico, sugerindo que a reativação do EBV ocorre antes do desenvolvimento do carcinoma gástrico (KOSHIOL *et al.*, 2007). As manifestações tumorais relacionados ao EBV são muito diversificadas e dependem do *status* imunológico dos pacientes. O conhecimento de alguns fatores como a infecção por HIV e imunossupressão pós-transplante, e do *status* do paciente em relação ao EBV combinados com a citomorfologia e resultados auxiliares, são frequentemente necessários para se chegar ao diagnóstico do CG associado ao EBV (MICHELOW *et al.*, 2012).

A presença da infecção por EBV é determinada por várias maneiras incluindo testes sorológicos, baseados na detecção de anticorpos heterófilos e os métodos de ELISA, exame molecular como a carga viral para o EBV, que determina se o portador encontra-se em estado hígido ou de doença (GULLEY & TANG, 2008). Alto índice de DNA de EBV no plasma ou no soro, antes da terapia, indicam mau prognóstico (GULLEY *et al.*, 2002). Em casos de tumores o EBV pode ser diagnosticado através da análise de anticorpos que agem contra seus antígenos EBNA e LMP que podem ser diagnosticados pelas

técnicas de imunofluorescência e coloração imunohistoquímica da membrana ou do citoplasma, hibridização *in situ* (HIS) para a detecção de EBERs, técnicas moleculares como Southern blot e a reação em cadeia de polimerase (PCR) (HECHT *et al.*, 2002).

2.3 HP E EBV EM CÂNCER GÁSTRICO

O câncer de estômago é atualmente o quinto câncer mais comum, com aproximadamente 1 milhão de novos casos diagnosticados em todo o mundo a cada ano e é a terceira principal causa de morte relacionada ao câncer, contribuindo com 6,8% do total de casos diagnosticados de câncer e 8,8% do total de morte associada ao câncer em todo o mundo (SINGH & JHA, 2017). A maior parte dos casos diagnosticado de CG e de morte, devido o câncer gástrico, ocorre nos países em desenvolvimento, enquanto que nos países desenvolvidos essa porcentagem é de 23% (FITZMAURICE *et al.*, 2015). Excluindo os tumores de pele não melanoma, na região Norte o câncer de estômago é o segundo mais incidente com 11,62 casos a cada 100 mil habitantes. Nas mulheres é o quarto mais frequente na região Norte com 5,82 casos a cada 100 mil habitantes (INCA, 2016).

A carcinogênese gástrica está principalmente relacionada à infecção crônica por HP (CHARVAT *et al.*, 2016). A contaminação dos indivíduos pela HP, ainda durante a infância, é um fator preponderante para o desenvolvimento do câncer gástrico, pois esse microrganismo pode agir de forma silenciosa durante anos (ASHOUR *et al.*, 2002b). Estima-se que quase 90% dos cânceres gástricos não cárdicos são atribuíveis a HP (PLUMMER., *et al.*, 2015). Outro fator de risco para o desenvolvimento do CG é a presença do vírus Epstein-Barr (EBV). A prevalência do EBV, na maioria das vezes em fase latente, é de 95% na população humana, sendo que a coinfeção com a HP aumenta ainda mais o risco de desenvolvimento do CG (LUZURIAGA & SULLIVAN, 2010).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Tipo de pesquisa

Este é um estudo descritivo, do tipo transversal que foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) em Seres Humanos do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará (UFPA), (Protocolo 35/2010). A coleta das amostras foi iniciada após aprovação do CEP e autorização dos pacientes e, no caso dos pacientes menores de idade, a autorização foi obtida por consentimento dos pais ou responsáveis, por meio de termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE A).

3.2 Local e período do estudo

As amostras foram coletadas no Laboratório Dr. Paulo Albuquerque que funciona no Hospital São Camilo, em Macapá-Amapá, no período de dezembro/2011 a junho/2012.

3.3 População e amostra do estudo

A população foi composta por 292 pacientes atendidos no Laboratório Dr. Paulo Albuquerque do Hospital São Camilo no município de Macapá-AP. Segundo as informações referente a endereço preenchido pelos pacientes, a maioria alegou morar na cidade de Macapá, porém não foi possível verificar se essa maioria realmente residia à anos na capital do Amapá. Foram utilizados fragmentos de mucosa gástrica de pacientes com faixa etária entre 14 e 83 anos de idade.

A amostra foi composta pelos pacientes que preencheram os critérios de inclusão.

3.4- Critérios de inclusão e exclusão

Foram coletadas 300 amostras de tecido gástrico, porém foram incluídas nesta pesquisa 292 amostras de pacientes com idade de 14 a 83 anos que passaram pelo procedimento de endoscopia digestiva alta (EDA) para esclarecimento de manifestações clínicas relativas ao trato digestivo alto. Foram excluídos os pacientes que receberam terapia antimicrobiana, bloqueador de receptores de H₂, inibidores de bomba de prótons (IBP) e/ou anti-inflamatórios não hormonais nos últimos 30 dias antes da biópsia; pacientes com hipertensão portal recebendo injeção de escleroterapia ou ligadura de varizes; pacientes com impedimento anatômico à EDA, com distúrbios da coagulação, com doenças graves ou com sedação insuficiente ou apresentando reações alérgicas graves às drogas utilizadas para a sedação ou anestesia e ainda, pacientes com formulários informativos preenchidos de forma incompleta.

3.5 Coleta de dados

A coleta de dados foi realizada durante sete meses, segundo o cronograma definido para seu desenvolvimento. Para o estudo foi elaborado formulário de pesquisa (APÊNDICE B) com as seguintes variáveis: nome, idade, gênero, procedência, diagnóstico endoscópico, histopatológico, Teste de Urease, *cagA*, hibridização *in situ* para EBV.

Adicionado a isso, foram coletados dois fragmentos de mucosa gástrica antral obtidos por EDA, sendo os mesmos armazenados em meio ALLPROTECT, acondicionados em caixa térmica até a chegada ao Laboratório de Citogenética Humana do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal do Pará, quando foram armazenados em Freezer a -20° C. Posteriormente um fragmento foi usado para pesquisa do HP e outro para pesquisa do EBV.

3.5.1. Endoscopia digestiva alta

Os achados endoscópicos foram classificados conforme Sistema de Sydney (APÊNDICE C).

3.5.2. Histopatologia

Os achados histopatológicos foram classificados em gastrite crônica leve, moderada e acentuada sendo a avaliação realizada por laboratório privado em Fortaleza-Ceará.

3.5.3. Lâminas com cortes histológicos

Os cortes histológicos foram fixados em lâminas para microscopia devidamente limpas em acetona e tratadas com silano a 4%. Duas lâminas de cada bloco foram obtidas para estudo pelo método de HIS.

3.5.3.1. Hibridização *in situ*

O método de estudo utilizado nesta pesquisa foi adaptado do descrito por (BACCHI *et al.* 1996). A sonda utilizada, descrita por (SHIBATA *et al.*,1992), apresenta uma sequência biotinilada de 30pb complementar ao RNA EBER1, na extremidade 3' (5'- AGACACCGTCCTCACCCCGGGACTTGTA-3'). O método segue os seguintes procedimentos:

a) Desparafinação e hidratação das lâminas – as lâminas foram colocadas em estufa pré-aquecida a 60°C durante 120 minutos. Após esse período, as lâminas foram mergulhadas em xilol aquecido a 60°C por 10 minutos. Posteriormente, foram submetidas a uma bateria de xileno (I, II e III) – álcool a 100% (I, II e III) – álcool a 80%;

- b) Bloqueio da Peroxidase endógena – as lâminas foram mergulhadas em um borel contendo peróxido de hidrogênio a 3% por 20 minutos;
- c) Digestão enzimática com proteinase K - a proteinase K em concentração final de 0,02µg/µL, por 13 minutos;
- d) Lavagem em água com DEPC 0,1%;
- e) Desidratação em gradiente de água e de álcool em concentração de 80%, 100% (I, II e III);
- f) Incubação com solução de pré-hibridização – a solução de pré-bibridação consiste em solução de Denhardt (3,5X); SSC (4,5X); EDTA (0,0075M); SDS (0,35%); DNA desnaturado de esperma de salmão (75µg/µL); NaH₂PO₄ (0,75M); Sulfato de dextrano (10%), as lâminas foram incubadas por 60 minutos à 37°C.
- g) Incubação em solução de hibridação – a solução de hibridação consiste em solução de Denhardt (2X); Formamida (50%); Sulfanato de Dextrano (2%); NaH₂PO₄ (0,002M); e sonda (0,3 ng/µL), por 16 horas em estuda à 37°C.
- h) Incubação das lâminas com anticorpo anti-biotina (DakoCytomation®) (diluição 1:20), por 30 minutos;
- i) Incubação com anticorpo anti-imunoglobulina (DakoCytomation®) (diluição 1:100), por 45 minutos;
- j) Revelação com cromógeno DAB líquido (3,3' – diaminobenzidine) (DakoCytomation®), preparado conforme recomendações do fabricante;
- k) Contra-coloração – as lâminas mergulhadas em um borel contendo Hematoxilina de Harris a 40%;
- l) Desidratação em componente de água – álcool – xilol;
- m) Montagem com lâminas utilizando Bálsamo do Canadá.

Como controle foi utilizado lâmina de fragmento gástrico sabidamente positiva para EBV.

3.5.3.2. Critérios para análise das lâminas

Na análise das lâminas foi admitida como marcação positiva a presença de uma coloração marrom característica, adquirida pelo cromógeno após oxidação, situadas nas regiões celulares previstas para cada alvo avaliado em contraste com o azul/violeta conferido pela hematoxilina, constatada por microscopia óptica.

Na técnica de HIS, considerou-se positivo qualquer marcação nuclear em células gástricas, independente do percentual de células marcadas.

3.5.4. Extração de DNA

A extração de DNA a partir das amostras de tecido gástrico foi realizada conforme o protocolo estabelecido pelo QiaAmp (Qiagen®) DNA mini kit. Posteriormente, o DNA extraído foi armazenado no freezer a -80°C.

3.5.5. Diagnóstico de *Helicobacter pylori*

Para o diagnóstico do HP foi realizado o teste de Urease em fragmentos de biópsia gástrica de todos os pacientes envolvidos no estudo.

3.5.6. Determinação da presença do gene *cagA*

A detecção da presença do gene *cagA* foi realizada em fragmentos de mucosa gástrica de todos os pacientes do estudo, com a utilização de oligonucleotídeos descritos por COVACCI *et al.* (1993) (Quadro 1). A reação de PCR foi realizada em 35 ciclos de amplificação, a etapa de desnaturação

ocorreu por 1 minuto a 95°C, o anelamento por 1 minuto a 57°C e a extensão por 1 minuto a 72°C, com uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

Quadro 1: Oligonucleotídeos utilizados na determinação dos genes urease e *cagA*. Tamanhos dos fragmentos: Ure 411pb e Cag 394pb.

Gene	Sequência
<i>ure A</i> (sense)	5' –GCCAATGGTAAATTAGTT-3'
<i>ure A</i> (antisense)	5' –CTCCTTAATTGTTTTTAC-3'
<i>cagA</i> (sense)	5'-ATAATGCTAAATTAGACAACCTTGAGCGA-3'
<i>cagA</i> (antisense)	5'- TTAGAATAATCAACAAACATCACGCCAT-3'

3.6 Análise dos dados

Para avaliar a correlação dos laudos endoscópicos e histopatológicos com HP foi calculada a incidência de casos positivos de gastrite com a presença da bactéria.

Para diagnosticar a presença do fator de virulência do gene *cagA* em amostras de HP foi calculada a incidência de casos positivos de *cagA* com a presença da bactéria.

Para avaliar a correlação da virulência do gene *cagA* aos resultados histopatológicos nos pacientes em estudo, foi calculada a incidência de casos positivos de gastrite com a presença do gene.

Para comparação dos valores de incidência em relação às demais comparações, foi aplicado o teste do Qui-quadrado (BEIGUELMAN, 1994) analisados no programa Biostat 5.0. Segundo a fórmula e o esquema abaixo:

$$X^2 = (a*d - b*c)^2 * N / n1 * n2 * n3 * n4,$$

Em que a e d são valores observados em uma diagonal e b e c na outra diagonal;

N é o total geral;

n_1 , n_2 , n_3 e n_4 são os totais marginais.

Esquema de organização dos dados.

Sexo	Positivo	Negativo	Total
M	A	B	n_1
F	C	D	n_2
Total	n_3	n_4	N

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre o período de dezembro de 2011 a junho de 2012 foram analisadas 300 biópsias, destas foram utilizadas 192 no presente estudo, sendo que 8 foram excluídas, pois pela análise dos formulários, preenchidos pelos pacientes, não foi possível identificar o gênero. Do total das amostras 113 foram de pacientes do gênero masculino e 179 do gênero feminino.

Neste estudo a prevalência de HP em pacientes com gastrite foi alta, 87,67% (Figura 6), resultado similar ao da literatura.

Em países em desenvolvimento, a prevalência da HP, em adultos, atinge 80% da população. A condição socioeconômica, o aglomerado de pessoas na família, baixo grau de escolaridade, condições higiênicas inadequadas e saneamento básico precário são fatores que aumentam o potencial de infecção por essa bactéria (FRUGIS *et al.*, 2016). No estado do Paraná, FRUGIS *et al.* (2016), demonstrou uma prevalência para HP em 17,03% de um total de 2536 amostras gástricas analisadas. No interior do estado do Amazonas, no município de Coari, (JUNIOR, *et al.*, 2012), evidenciou que a prevalência de HP foi de 82% de um total de 100 amostras analisadas.

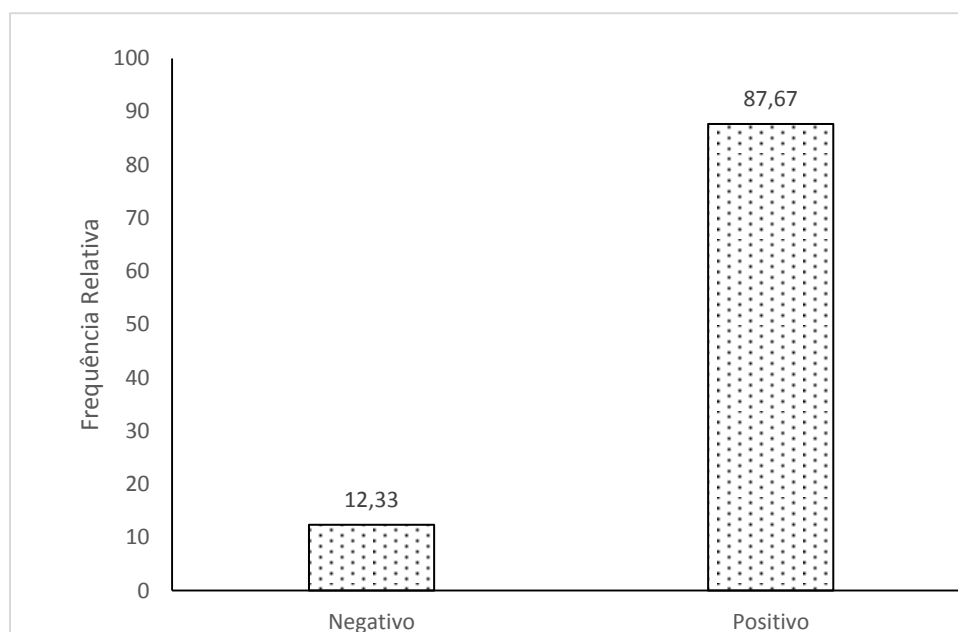


Figura 6. Prevalência de casos de HP em pacientes com gastrite.

De acordo com nossos estudos houve maior prevalência de HP em pacientes do sexo feminino, com 88,27% dos casos contra 86,73% do sexo masculino, dos casos positivos para HP (Figura 7), concordando com outras pesquisas realizadas no Brasil.

Em um estudo no estado de Minas Gerais, SIMÕES *et al.*(2016), mostraram que a prevalência de pacientes positivos para HP é de 52% no sexo masculino e de 48% no sexo feminino, de um total de 1225 amostras. No Pará, (CHAVES *et al.*, 2016), a prevalência de casos positivos para HP por gênero foi semelhante, sendo 40,6% no sexo masculino e 40,8% no sexo feminino, de um total de 88 amostras.

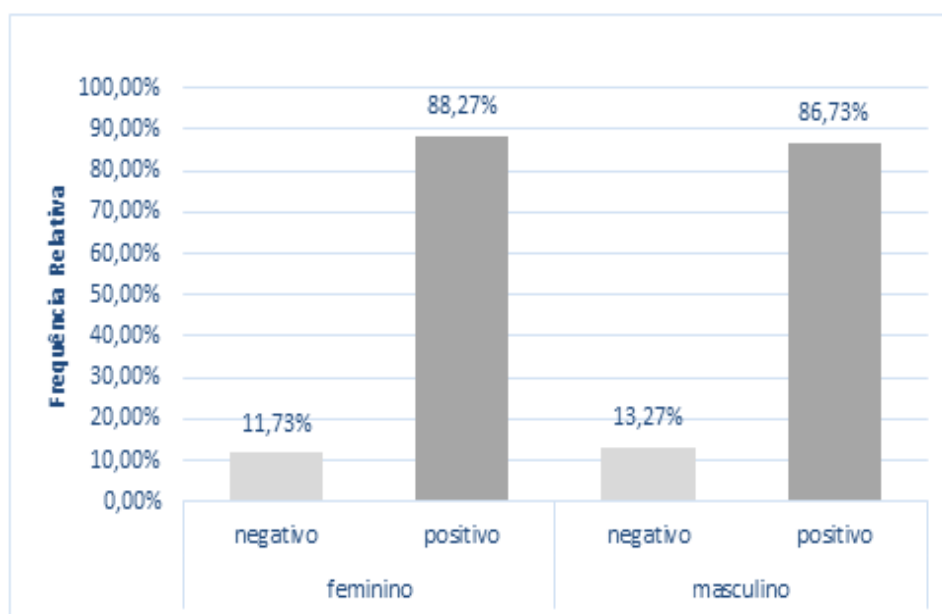


Figura 7. Prevalência de HP por sexo.

A presença do gene *cagA* em relação a casos positivos de HP foi de 72,66% (figura 8), achado semelhante ao encontrado em outros estudos.

A diversidade dos genes associados à virulência da HP, como o *cagA* tem papel relevante no resultado clínico da infecção por essa bactéria. Este gene é responsável em codificar a citotoxina *cagA* que quando injetada no citoplasma da célula epitelial gástrica, interage com proteínas da célula hospedeira, induzindo alterações na morfologia das células e nas respostas mitogênicas pró-inflamatórias (OLBERMANN, *et al.*, 2010).

As cepas positivas para *cagA* estão associadas com gastrite severa, úlcera péptica, gastrite atrófica e câncer gástrico não-cárdia, ligando assim a presença destes genes, no caso do gene *cagA*, a prevalência de 60% a 100% nas cepas positivas para HP, contribuindo para o aumento da virulência dessas cepas (MARTINS *et al.*, 2002). Pacientes infectados por linhagens de HP negativas para o gene *cagA* apresentam menos risco para o desenvolvimento de patologias gástrica, como a gastrite por exemplo, ao serem comparados à pacientes contaminados por linhagens *cagA* positivas (IKENOUE *et al.*, 2001).

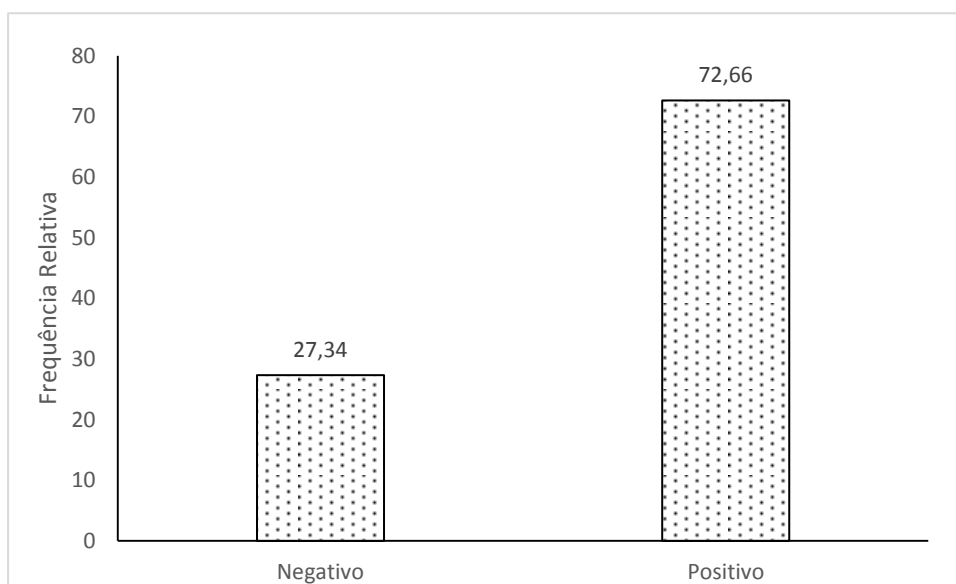


Figura 8. Prevalência de casos *cagA* em relação a casos positivos de HP

Cepas positivas para o gene *cagA* em pacientes positivos para HP foram encontradas em 75,32% no sexo feminino, já no sexo masculino essa prevalência foi de 68,38% (Figura 9). Esse achado não divergiu significativamente aos dados encontrados no Brasil.

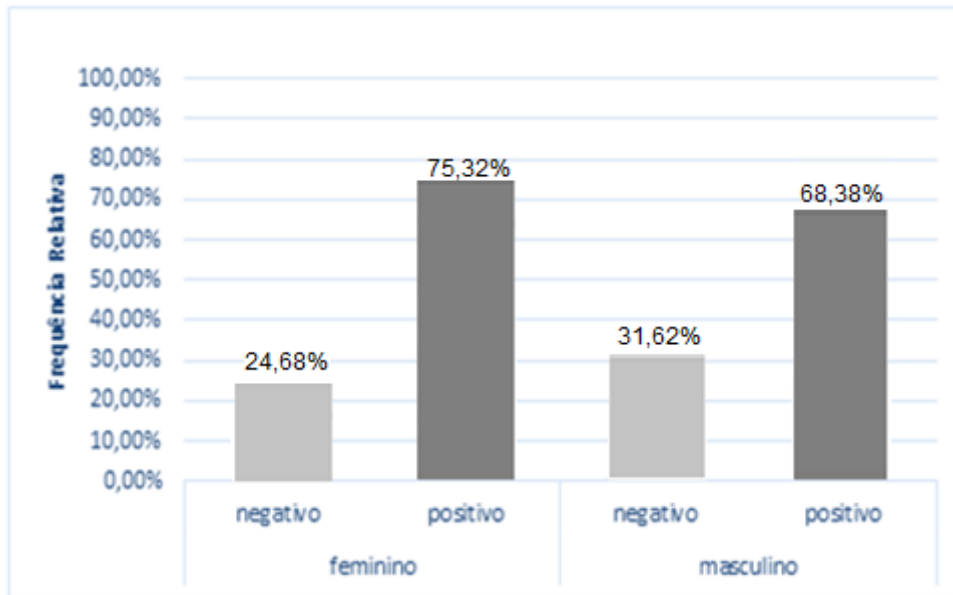


Figura 9. Prevalência de casos *cagA* em relação a casos positivos de HP por sexo.

A prevalência de EBV positivos em pacientes positivos para HP foi 8,59% (Figura 10).

O EBV, que se apresenta com grande distribuição pelo mundo, estabelece infecção em forma de latência em 95% da população global e quando há coinfeção do EBV com a bactéria HP o risco para o desenvolvimento de complicações gástricas, como gastrite, aumentam (SINGH & JHA, 2017).

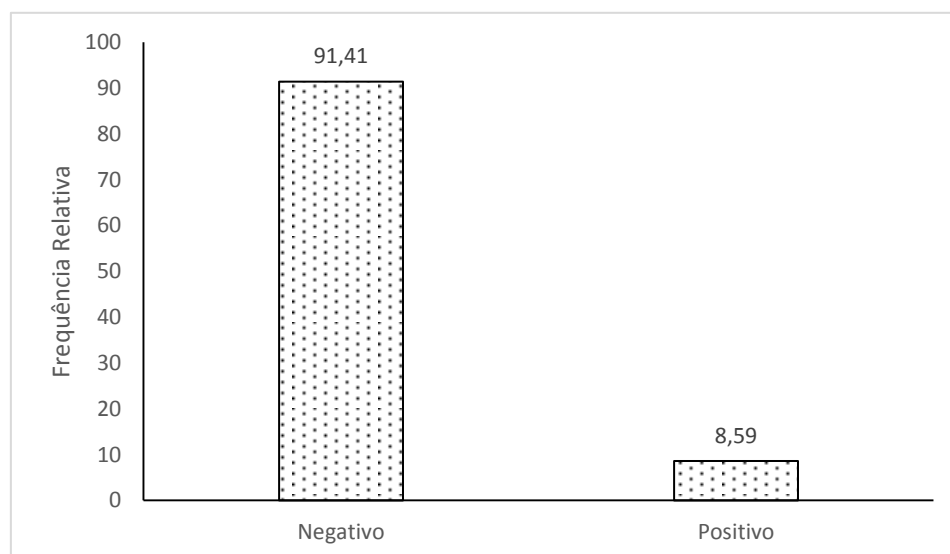


Figura 10. Prevalência de casos EBV em relação a casos positivos de HP.

A incidência de EBV positivos em pacientes positivos para HP, de acordo com o sexo, mostrou maior prevalência, em nosso estudo, em pacientes do sexo feminino, 8,23%, enquanto que no sexo masculino a prevalência foi de 9,18% (Figura 11), concordando com a literatura.

No Brasil, a prevalência do EBV varia entre 5 a 11,3% na população, como maior incidência em pacientes do sexo masculino (PEREIRA DE LIMA *et al.*, 2011).

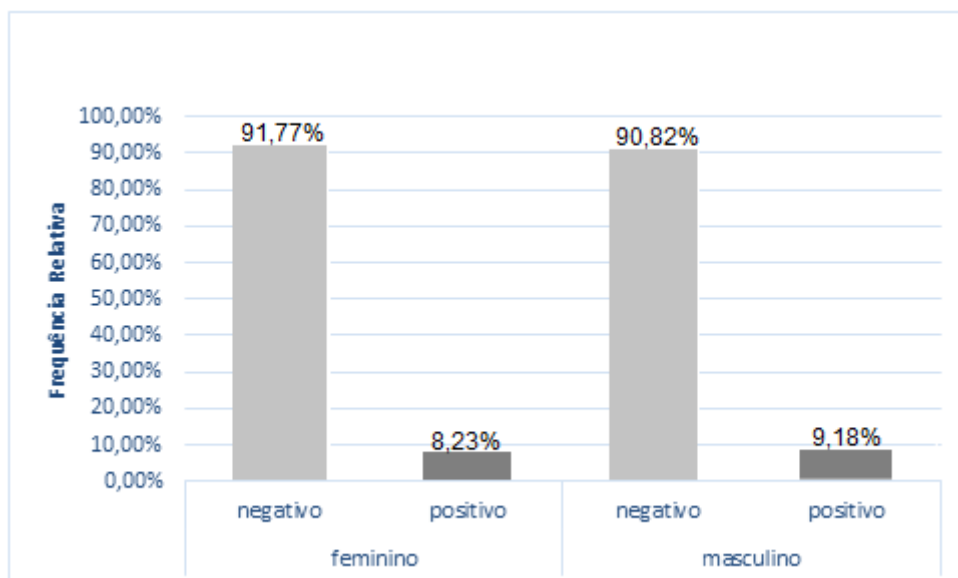


Figura 11. Prevalência de casos EBV em relação a casos positivos de HP por sexo.

A maior prevalência de casos *cagA* em relação a casos positivos de HP por faixa etária foi entre 24 e 64 anos, com 76,35% dos casos (figura 12), resultado corroborado pela literatura.

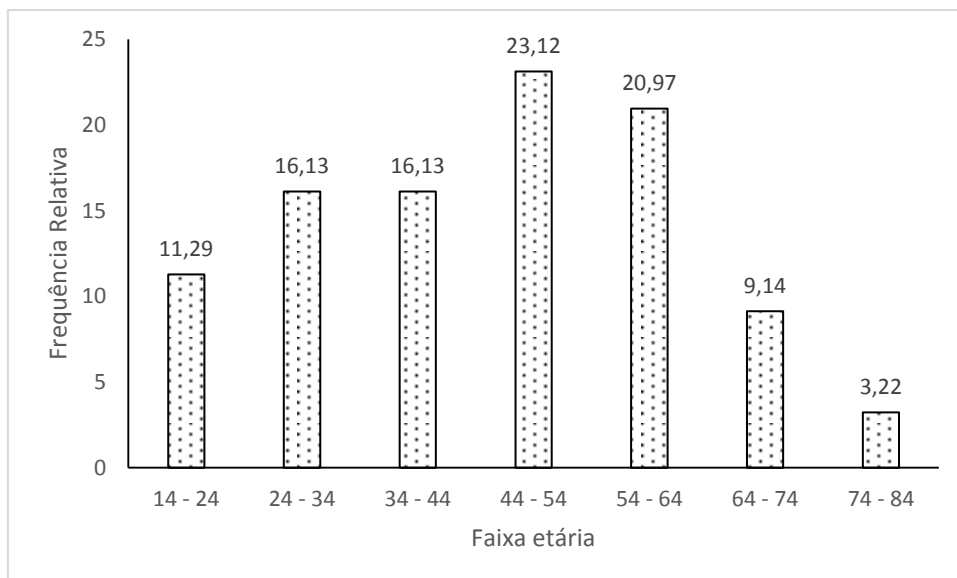


Figura 12. Prevalência de casos *cagA* em relação a casos positivos de HP por faixa etária.

Casos positivos de EBV em relação a casos positivos de HP por faixa etária, mostrou-se maior entre 34 e 64 anos, com 72,73% (figura 13), dos casos, resultado semelhante ao encontrado na literatura.

No estado do Ceará, essa prevalência foi 8% nos pacientes, com maior incidência em infectados com idade a partir de 55 anos. Já no estado de São Paulo a prevalência de EBV foi 3% nos pacientes com maior incidência em pessoas com idade de 65 anos em diante (PEREIRA DE LIMA *et al.*, 2011)

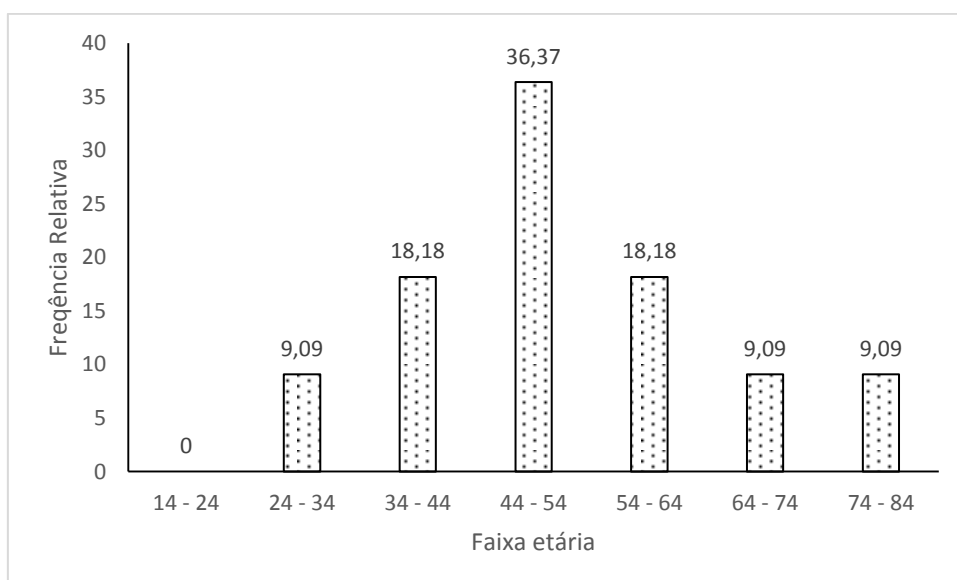


Figura 13. Prevalência de casos EBV em relação a casos positivos de HP por faixa etária.

A prevalência do EBV, na maioria das vezes em fase latente, é de 95% na população humana, sendo que a coinfeção com a HP aumenta ainda mais o risco de desenvolvimento do CG (LUZURIAGA & SULLIVAN, 2010). Neste trabalho os estudos mostraram correlação da presença do gene *cagA* e do EBV em pacientes positivos para HP relacionados a faixa etária, com maior incidência de casos entre 44 e 54 anos com registro de 23,12% para *cagA* e de 36,37% para o EBV (figuras 10 e 11).

CONCLUSÃO

No presente estudo ocorreu a alta prevalência de HP em pacientes com gastrite. Houve uma grande presença do gene *cagA* em relação a casos positivos com maior prevalência em pacientes com faixa etária entre 24 e 64 anos, achados semelhantes aos encontrados em outros estudos. Verificou-se a presença de cepas positivas para o gene *cagA* em pacientes positivos para HP. Os achados neste trabalho sobre a prevalência do gene *cagA* em pacientes positivos para a HP mostrou maior incidência no sexo feminino, porém sem significativa diferença em relação à literatura. A maior prevalência de EBV em pacientes positivos ocorreu na faixa etária entre 34 a 64 anos dos casos analisados e a incidência desses casos, de acordo com o sexo, em nosso estudo, sem diferença significativa entre os sexos. Embora a maioria dos achados nesse estudo esteja corroborado pela literatura nacional e internacional, evidenciou-se a necessidade de estudos com maior casuística, a fim de melhor esclarecer se há ou não há correlação entre a infecção por HP e EBV em nossa região.

REFERÊNCIAS

ARVANITIS, C.; FELSHER, D. W. Conditionally MYC: insights from novel transgenic models. **Cancer Lett.**, 226(2), p.95-99, 2005.

ASHOUR, A. A. R.; GUSMÃO, V. R.; MAGALHÃES, P. P.; COLLARES, G. B.; MENDES, E. N.; QUEIROZ, D. M. M.; ROCHA, G. A.; ROCHA, A. M. C.; CARVALHO, A. S. T. Associação entre *cagA* e alelos do *vacA* de *Helicobacter pylori* e úlcera duodenal em crianças no Brasil. **J. Brasil.Patol. Med. Lab.**, v. 38, p. 79-85, 2002b.

BACCHI, C.E.; BAZAN,R.; PADOVANI, E.G.; RABENHORST, S.H.; BACCHI, M.M. Linfoma do sistema nervoso central: associação com o vírus de Epstein-Barr. **Jornal Brasileiro de Patologia**, 32: 103-109, 1996.

BARILE, K.A.S.; MARTINS, L.C.; AMARAL, R.K.C.; LOIOLA, R.S.P.; CORVELO, T.C.O. Prevalência de infecção por *Helicobacter pylori* em crianças e mães na Região Norte do Brasil. **Ver. Panam Infectol.** V. 11, n.4, 6-12, 2009.

BEIGUELMAN, B. Curso prático de bioestatística. Quarta edição. **Revista brasileira de Genética.** São Paulo, 1994.

BLASER, M.J. Not all *Helicobacter pylori* strains are created equal: should all be eliminated? **Lancet** 349: 1020-1022, 1997.

BOREN, M.J.; FALK, P.; ROTH, K.A.; LARSON, G.; NOMARK, S. Attachment of *Helicobacter pylori* to human epithelium mediated by blood group antigens. **Science** 262: 1892-1895, 1993.

BUCKER, R. *et al.* *Helicobacter pylori* colonization critically depends on postprandial gastric conditions. **Scientific Reports.**v.2, n. 994, 2012.

BUELOW, D.; SUN, Y.; TANG, L.; GU, Z.; POUNDS, S.; HAYDEN, R. "Comparative evaluation of four real-time PCR methods for the quantitative

detection of Epstein-Barr virus from whole blood specimens,” **The Journal of Molecular Diagnostics**, vol. 18, pp.527–534, 2016.

CAMARGO, M.C.; MURPHY, G.; KORIYAMA, C.; PFEIFFER, R.M.; KIM, W.H.; HERREA-GOEPFERT, R.; CORVALÁN, A.H.; CARRASCAL, E.; ABDIRAD, A.; ANWAR, M.; HAO, Z.; KATTOOR, J.; YOSHIWARA-WAKABAYASHI, E. *et al.* Determinants of Epstein-Barr virus-positive gastric cancer: an international pooled analysis. **Br J Cancer**. v.105, p. 38-43, 2011.

CARVALHO, A.C.G. Resposta linfóide em biópsias gástricas de criança do hospital Universitário Antônio Pedro: Associação com *Helicobacter pylori* e o vírus Epstein-Barr. 69 f. 2006. **Dissertação (Mestrado em Patologia)-Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2006.**

CHANG, M.S.; KIM, W.H. Epstein-Barr Virus in Human Malignancy: a special reference to Epstein-Barr virus associated Gastric Carcinoma. **Cancer Res. Treat.**, 37(5), p.257-267, 2005.

CHARVAT, H.; SASAZUKI, S.; INOUE, M.; IWASAKI, M.; SAWADA, N.; SHIMAZU, T.; YAMAJI, TAIKI.; TSUGANE, S. Prediction of the 10year probability of gastric cancer occurrence in the Japanese population: the JPHC study cohort II. **International Journal Cancer**: 138, 320-331, 2016

CHEN, J. *et al.* Variations of Epsteins-Barr Virus nuclear antigen 1 in Epstein-Barr virus. Associated Gatric Carcinomas from Guangzhou, Southern China. **Plos One**. Nov., v. 7, n. 11, 2012.

CONNOLLY, S.A.; JACKSON, J.O.; JARDETZKY, T.; LONGNECKER, R. Fusing structure and function: a structural view of the herpesvirus entry machinery. **Nat. Rev. Microbiol.**, 9(5), p.369–381, 2011.

CORREA, P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process - First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. **Cancer Res.**, 52, p.6735-6740, 1992.

CORREA, P. Gastric neoplasia. **Curr. Gastroenterol.Rep.**, 4, p.463-470, 2002.

COSTA, A.C.; FIGUEIREDO, C.; TOUATI, E. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. **Journal Compilation**, Helicobacter 14 suppl.1, p.15-20, 2009.

DAS, J.C.; PAUL, N. Epidemiology and pathofisiology of *Helicobacter pylori* infection children. **Indian Journal of Pediatrics**. v.74, march, 2007.

DELAHAY, R.M.; RUGGE, M. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. **Helicobacter**. v. 17, suppl. 1, p. 9-15, 2012.

DE SOUZA, C.R.T.; DE OLIVEIRA, K.S.; FERRAZ, J.J.S.; LEAL, M.F.; CALCAGNO, D. Q.; SEABRA, A.D.; KHAYAT, A.S.; MONTENEGRO, R.C.; ALVES, A.P.N.N.; ASSUMPÇÃO, P.P.; SMITH, M.C.; BURBANO, R.M.R. Occurrence of *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr virus infection in endoscopic and gastric cancer patients from Northern Brazil. **BMC Gastroenterology**, v. 14:179, 2014.

DIAS, E.P. *et al.* Detecção do vírus Epstein-Barr em tonsilites recorrentes. **Ver. Bras Otorrinolaringol.** v. 75, n. 1, p. 30-4, 2009.

DUNCAN, S.S.; VALK, P.P.; SHAFFER, C.L.; BORDENSTEIN, S.R.; COVER, T.C. J-Western Forms of *Helicobacter pylori* *cagA* Constitute a Distinct Phylogenetic Group with a Widespread Geographic Distribution. **Journal of Bacteriology**, 194 (6). p. 1593-1604, 2012.

ELZBIETA, P.; BRONIARCZYK, J.K.; GOZDZICKA-JOZEFIAK, A. Epigenetic mechanisms in virus-induced tumorigenesis. **Clin Epigenet.** v. 2, p. 233-247, 2011.

EPSTEIN, M.A.; ACHONG, B.; BARR, Y. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. **Lancet**, 1: 702–703, 1964.

EPSTEIN, M.A.; HENLE, G.; ACHONG, B.G.; BARR, Y.M. Morphological and biological studies on a virus in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. **J. Exp. Med.**, 121, p.761–70, 1965.

ESPINO, E. A. Infección por *Helicobacter pylori*. **Gastroenterol. Latinoam.** v. 21 n.92, p.323-327, 2010.

EUSEBI, L.H.; ZAGARI, R.M.; BAZZOLI, F. Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection. **Wiley Online Libery 19 (Suppl.1)**: 1-5, 2014.

FITZMAURICE, C.; DICKER, D.; PAIN, A. *et al.* The global burden of cancer 2013. **JAMA Oncology**, vol. 1, pp. 505–527, 2015.

FOCK, K.M.; ANG, T.L. Epidemiologi of *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer in Asia. **Journal of gastroenterology and hepatology.** v. 25, n. 3, p. 479-486, 2010.

FOX, J.G. & WANG, T.C. *Helicobacter pylori* infection: pathogenesis. **Curr. Opin. Gastroenterol**, 18: 15-25, 2002.

FRUGIS, S.; CZECZKO, N. G.; MALAFAIA, O.; PARADA, A. A.; POLETTI, P.B.; SECCHI, T.F.; DEGIOVANI, M.; RAMPANAZZO-NETO, A.; D'AGOSTINO, M. D. Prevalência da *Helicobacter pylori* há dez anos comparada com a atual em pacientes submetidos à endoscopia digestiva alta. **ABCD Arq. Bras. Cir. Dig.** v. 29 (3): 151-154, 2016.

GULLEY, M.L.; GLASER, S.L; CRAIG, F.E.; BOROWITZ, M.; MANN, R.B.; SHEMA, S.J.; AMBINDER, R.F. Guidelines for interpreting EBER in situ hybridization and LMP1 immunohistochemical tests for detecting Epstein-Barr virus in Hodgkin lymphoma. **Am. J. Clin. Pathol.**, 117, p.259–267, 2002.

GULLEY, M.; TANG, W. Laboratory assays for Epstein-Barr related disease. **J. Mol. Diagn.**, 10: 279–292, 2008.

HAU, P.M.; TSAO, S.W. Epstein–Barr Virus Hijacks DNA Damage Response Transducers to Orchestrate Its Life Cycle. **Viruses**, 9, 341. v. 9110341, 2017.

HECHT, J.; CIBAS, E.; KUTOK, J. Fine-needle aspiration cytology of lymphoproliferative disorders in the immunosuppressed patient: the diagnostic utility of *in situ* hybridization for Epstein-Barr virus. **Diagn Cytopathol.**, 26, 360–365, 2002.

IARC International Agency for Research on Cancer). *Schistosomes, Liver Flukes and Helicobacter pylori*, **IARC**. Lyon, França, 1994.

IKENOUE, T.; MAEDA, S.; OGURA, K.; MASAO, A.; MITSUNO, Y.; IMAI, Y., et al. Determination of *Helicobacter pylori* virulence by simple gene analysis of the *cag* Pathogenicity Island. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.8 (1), p.181-186, 2001

IMAI, S.; NISHIKAWA, J.; TAKADA, K. Cell-to-cell contact as an efficient mode of Epstein-Barr virus infection of diverse human epithelial cells. **J Virol.**, 72, p.4371–4378, 1998.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – INCA. <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>. Acessado: 21/01/2017.

JAVIER, R.T.; BUTEL, J.S. The History of Tumor Virology. **Cancer Res.**, 68(19), p.7693-7706, 2008.

KOLETZKO, S. *et al.* Evidence-based Guidelines From ESPGHAN and NASPGHAN for *Helicobacter pylori* infection in Children. **JPGN**, v. 53, n. 2, Aug, 2011.

KOSHIOL, J.; QIAO, Y.L.; MARK, S.D. *et al.* Epstein–Barr virus serology and gastric cancer incidence and survival.**Br. J. Cancer**, 97, p.1567 – 1569, 2007.

KUO, C. *et al.* The optimal First-Line Therapy of *Helicobacter pylori* Infection in Year. **Gastroenterology Research and Practice**. v. 2012 p. 1-8, 2012.

LADEIRA, M.S.P; SALVADOR, D.M.F.; RODRIGUES, M.A.M. Biopatologia do *Helicobacter pylori*. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** v 39, n-34, 2003.

LIMA, V.P.; RABENHORST, S.H.B. Genes associados à virulência de *Helicobacter pylori*. **Revista Brasileira de Cancerologia.** v. 55, n. 4, p. 389-396, 2009.

LUZURIAGA, K.; SULLICAN, J. L. Infectious mononucleosis. **New England Journal of Medicine.** v. 362, n. 21, p. 1993–2000, 2010.

MALFERTHEINER, P.; MEGRAUD, F.; O'MORAIN, C.; ATHERTON, J.; AXON, A. T. R.; BAZZOLI, F.; GENSINI, G.F.; GISBERT, J. P.; GRAHAM, D. Y.; ROKKAS, T.; EL-OMAR, E. M.; KUIPERS, E. Management of *helicobacter pylori* infection the Maastricht IV / Florence Consensus Report. **Gut.** v.61, p. 646-664, 2012.

Martins, L.C.; CORVELO, T.C.O.; OTI, H.T.; BARILE, K.A.S. Seroprevalence of antibodies against the CagA antigen the *Helicobacter pylori* in patients with gastric ulcer in the North region of Brazil. v. 35(4), p. 307-310, 2002.

MARTINS, L.C; CORVELO, T.C.O.; DEMACHKI, S.; ARAÚJO, M.T.F.; ASSUMPÇÃO, M.B.; VILAR, S.C.A.J., et al. 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 (8), p.875-881, 2005.

WIEPJE, M. 2001. Disponível em: <
<http://knoow.net/cienmedicas/medicina/helicobacter-pylori-bacteria/>>.

Acessado: 03/12/2017.

MICHELOW, P.; WRIGHT, C.; PANTANOWITZ, L. A. Review of the cytomorphology of Epstein-Barr virus-associated malignancies. **ActaCytol.**, 56, p.1-14, 2012.

MONTEIRO, T.A.F. Detecção do genoma do vírus de Epstein Barr (EBV) em tecidos de pacientes com doença de Hodgkin da região Norte do Brasil. 99f. 2010. Dissertação (Mestrado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários) – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, Pará, 2010.

MURATA-KAMIYA, N.; KIKUCHI, K.; HAYASHI, T.; HIGASHI, H.; HATAKEYAMA, M. *Helicobacter pylori* exploits host membrane phosphatidylserine for delivery, localization, and pathophysiological action of the CagA oncoprotein. **Cell. Host. Microbe**, 7, p.399–411, 2010.

NAGINI, S. Carcinoma of the stomach: A review of epidemiology, pathogenesis, molecular genetics and chemoprevention. **World J. Gastroenterol. Oncol.**, 4(7), p. 156-169, 2012.

NAITO, Y., YOSHIKAWA, T. Molecular and cellular mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced inflammation and oxidative stress. **Free Radic. Biol. Med.**, 33, p.323-336, 2002.

NIERDELE, R.; MOREIRA, A.C. O perigo pode estar no estômago: *Helicobacter pylori* – aspectos epidemiológicos, patológicos de tratamento e Preventivos. **Revista Contexto & Saúde**. Ed. INILUÍ., v. 10, n. 19. 19 JUL/DEZ. p. 69-66. 2010.

ODUMADE, A.O.; HOGQUIST, K.A.; BALFOUR, H.H.JR. Progress and Problems in Understanding and Managing Primary Epstein-Barr Virus Infections. **Clin. Microbiol. Ver.** Jan 24 (1): 193-209, 2011.

OLBERMANN, P.; JOSENHANS, C.; MOODLEY, Y.; UHR, M.; STAMER, C.; VAUTERIN, M.; SUERBAUM, S.; ACHTMAN, M.; LINZ, B. A global overview of the genetic and functional diversity in the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. **PLoS Genet**; [PMID: 20808891 DOI: 10.1371/journal.pgen.1001069], 2010.

PARSONNET, J.; FRIEDMAN, G.D.; ORENTREICH, N.; VOGELMAN, H. Risk for gastric cancer in people with *CagA* positive or *CagA* negative *Helicobacter pylori* infection. **Gut**, 40, p.297-301, 1997.

PEEK, R. M. Jr.; CRABTREE, J. E. *Helicobacter* infection and gastric neoplasia. **J. Pathol.** 208:233–248, 2006.

PEREIRA DE LIMA, M.A.; RABENHORST, S.H.B. Associação do vírus Epstein-Barr (EBV) com tumores sólidos. **Revista Brasileira de Oncologia.** 52 (1): 87-96, 2006.

PEREIRA DE LIMA, M.A.; FERREIRA, M.V.P.; BARROS, M.A.P.; PARDINI, M.I.M.C.; FERRASI, A.C.; RABENHORST, S.H.B. Detecção do vírus Epstein-Barr (EBV) em adenocarcinomas gástricos procedentes dos estados do Ceará e de São Paulo. **J Bras Patol Med Lab.** v. 47, n. 2, p. 171-179, 2011.

PIAZUELO, M.B.; EPPLEIN, M.; CORREA, P. Gastric câncer: Na infectious disease. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, 24(4), p.853–869, 2010.

PLUMMER, M.; FRANCESCHI, S; VIGNAT, J. Global burden of gastric cancer attributable to *Helicobacter pylori*. **International Journal do Cancer.** V.136:487–490, 2015.

RODRIGUES, M. N.; QUEIROZ, D. M. M.; RODRIGUES, R. T.; ROCHA, A. M. C.; BRAGANETO, M. B.; BRAGA, L. L. B. C. *Helicobacter pylori* infection in adults from a poor urban community in Northeastern Brazil: demographic, lifestyle and environmental factors. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.9 n.5, p.405-410, 2005.

SAIKI, Y.; OTANI, H.; NAITO, Y.; MIYAZAWA, M.; NAGURA, H. Immunophenotypic characterization of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: massive infiltration by proliferating CD8+ T-lymphocytes. **Lab Invest.** 75: 67-76, 1996.

SANTACROCE, L.; BHUTANI, M. S. *Helicobacter pylori* Infection Up dated: Aug 14, 2016. [acessado em 26 jan. 2017]. Disponível em: <http://emedicine.medscape.com/article/176938-overview#a1>.

SHIBATA, D.; WEISS, L. M. Epstein-Barr Virus-associated Gastric Adenocarcinoma. **American Journal of Pathology**, v. 140, nº.4, 1992.

SHUKLA, S.K.; PRASAD, K.N.; SAXENA, A.; GHOSAL, E.C.; KRISHNANI, N.; HUSAIN, N. Epstein Barr virus DNA load and its association with *Helicobacter pylori* infection in gastroduodenal diseases. **Braz. J Infect. Dis.**, v. 15, n. 6, p.583-590, 2011.

SIMÕES, I.M.A.R; COLI, A.C.M.; IRULEGUI, R.S.C. Perfil Epidemiológico de Pacientes Submetidos à Biópsia Gástrica em um Hospital Escola do Sul de Minas Gerais. **Revista Ciências em Saúde**. v.4, n. 3, 2014.

SINGH, M. *et al.* *Helicobacter pylori* and the Gut: Genotypes of *Helicobacter pylori* in Children with Upper Abdominal Pain. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**. v. 18, p. 1018-1023, 2003.

SINGH, S.; JHA, H.C. Status of Epstein-Barr Virus Coinfection with *Helicobacter pylori* in Gastric Cancer. **Journal of Oncology**. v 2017, 2017.

SUDO, M.; CHONG, J.M.; SAKUMA, K.; USHIKU, T.; UOZAKI, H.; NAGAI, H.; FUNATA, N.; MATSUMOTO, Y.; FUKAYAMA, M. Promoter hypermethylation of E-cadherin and its abnormal expression in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. **Int. J. Cancer** 109(2), p.194-199, 2004.

TAN, B.; LUO, H.Q.; XU, H.; LV, N.H.; SHI, R.H.; LUO, H.S.; LI, J.S.; REN, J.L.; ZOU, Y.Y.; LI, Y.Q. Polaprezinc combined with clarithromycin-based triple therapy for *Helicobacter pylori*-associated gastritis: A prospective, multicenter, randomized clinical trial. **Journal Pone**. Apr 13;12 (4): 0175625. doi: 10.1371/journal.pone.0175625. Collection 2017.

TAN, V.P.Y.; WONG, V.P.Y. *Helicobacter pylori* and gastritis: untangling a complex relationship 27 years on. **Journal of gastroenterology and hepatology**., 26, suppl 1, 42-45, 2011.

TANG, W.; MORGAN, D.R.; MEYERS, M.O. Epstein-Barr virus infected gastric adenocarcinoma expresses latent and lytic viral transcripts and has a distinct human gene expression profile. **Infect. Agent.Cancer**, 7(1), p.21, 2012.

THOMPSON, M.P.; KURZROCK, R. Epstein-Barr Virus and Cancer. **Clinical Cancer Research**. Vol. 10, 803–821, 2004.

OLUWASOLA, A.O. Genetic determinants and clinico-pathological outcomes of helicobacter pylori infection. **Ann Ib Postgrad Med.**; v. 12: 22-30 [PMID: 25332697], 2014.

YAÑEZ, P.; GARZA, A.M.; PÉREZ-PÉREZ, G.; CABRERA, L.; MUÑOZ, O.; TORRES, J. Comparison of invasive and noninvasive methods for the diagnosis and evaluation of eradication of *Helicobacter pylori* infection in children. **Archives of Medical Research**. v. 31, p. 415-421, 2000.

YATES, J.L.; WARREN, N.; SUGDEN, B. Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. **Nature**, 313, p. 812–15, 1985.

APÊNDICES

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

INFORMAÇÃO

O *Helicobacter pylori* é uma bactéria que pode infectar adultos e crianças, sendo que na maioria dos pacientes não causará sintomas. No entanto um pequeno número de pacientes apresentará úlcera no estômago (risco de 15%) e uma proporção ainda menor desenvolverá câncer gástrico (risco de 0,1%). O risco de evolução para câncer gástrico depende do tipo (genótipo) de *Helicobacter pylori*.

Você está sendo convidado a participar dessa pesquisa a qual tem como objetivo saber a prevalência dos marcadores genéticos do *Helicobacter pylori* em crianças de adolescentes. Para tal, recolheremos alguns dados seus (nome, idade, sexo e procedência) bem como fragmentos de suas biópsias gástricas e duodenais coletado durante a Endoscopia Digestiva Alta (EDA), os quais serão utilizados para o diagnóstico do *Helicobacter pylori* e uma pesquisa de marcadores genéticos associados ao mesmo. Informo que a indicação da EDA será de responsabilidade do médico assistente do paciente, não cabendo aos pesquisadores indicá-la e, portanto, não terão responsabilidades com as complicações relacionadas à mesma. No que se refere à coleta das biópsias, o risco para o paciente será a ocorrência potencial do discreto sangramento local após as mesmas, o que em geral resolve espontaneamente, não necessitando de tratamento. O tratamento do paciente, também, continuará a cargo do médico assistente, não tendo pois os pesquisadores quaisquer responsabilidades quanto ao mesmo. Os resultados da pesquisa serão publicados no meio acadêmico e científico, sendo resguardados o seu nome, endereço, filiação e qualquer outro dado relacionado à sua identificação, a qual sob nenhuma hipótese será divulgada.

Esta pesquisa poderá beneficiar primeiramente você que estará tendo a pesquisa do *Helicobacter pylori* e dos marcadores genéticos associados ao mesmo- e muitas pessoas porque a prevalência destes marcadores será estabelecida, o que poderá contribuir para tomada de medidas preventivas.

Sua participação nesta pesquisa é voluntária, sendo-lhe garantida a liberdade de retirada do consentimento a qualquer momento podendo deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo. Você terá a garantia do acesso, em qualquer etapa do estudo, sobre qualquer esclarecimento de eventuais dúvidas, e caso sinta necessidade, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará (UFPA).

Não existirão despesas ou compensações pessoais para os participantes em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Este termo foi elaborado em duas vias, sendo que uma via ficará com você e outra arquivada com os pesquisadores responsáveis. Abaixo está o consentimento livre e esclarecido para ser assinado caso não tenha ficado qualquer dúvida.

.....

Pesquisador

CONSENTIMENTO

Após ter sido satisfatoriamente esclarecido pelo pesquisador, sobre o trabalho de pesquisa intitulado: “Prevalência e associação da infecção gástrica por *Helicobacter pylori* e do vírus Epstein-Barr em casos de gastrite em uma população do norte do Brasil”, realizado sob responsabilidade do Dr. Rommel Mario Rodrigues Burbano e o professor Nélisson Clei Ferreira Alves, concordo que pela qual sou responsável, participe do mesmo, sempre que se resguardar minha identidade e a do meu filho (a) se for o caso.

Fui esclarecido (a) sobre a coleta de dados do paciente e de que os fragmentos de biópsias gástricas e duodenais coletados durante a Endoscopia Digestiva Alta (EDA) serão utilizados para o diagnóstico do *Helicobacter pylori*, bem como para pesquisa dos marcadores genéticos associados ao mesmo, e que os resultados destes exames serão utilizados para análise na pesquisa. Estou ciente de que o Dr. Rommel Mario Rodrigues Burbano e o professor Nélisson Clei Ferreira Alves estarão disponíveis para fornecer

informações sobre o desenvolvimento da pesquisa e que posso retirar este meu consentimento a qualquer tempo, sem prejuízos ou perdas. Estou, também, ciente de que o tratamento continuará a cargo do médico solicitante do EDA, não tendo pois o Dr. Rommel Mario Rodrigues Burbano e o professor Nélisson Clei Ferreira Alves quaisquer responsabilidades em relação ao mesmo.

Macapá, de de 2012

.....

Assinatura dos pais ou responsável

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP-CCS/UFPA) -
Complexo de sala de aula/CCS-sala 13-Campus Universitário, n 01, Guamá-
CEP 66075-110-Belém-Pará. Tel.: 3201-7735. E-mail: cepccs@ufpa.br

APÊNDICE B – FORMULÁRIO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR		
Nome:		No.
Idade:	Sexo: Masculino ()	Feminino ()
Procedência: Interior () Macapá ()		
EDA: Úlcera gástrica () Úlcera péptica () Outros ()		
Gastrite: Enanmentosa () Erosiva () Nodular ()		
Histopatológico		
Gastrite leve () Moderada () Acentuada ()		
Úlcera péptica () Duodenal ()		
Urease: positivo () negativo ()		
HP CagA: postivo () negativo ()		
Pesquisa do EBV: positivo () negativo ()		

APÊNDICE C- DIAGNÓSTICO ENDOSCÓPICO

Estômago – Classificação endoscópica de gastrite – Sistema de Sydney***Corpo***

Enantematosa	(0)	(1+)	(2+)	(3+)
Erosiva	(0)	(1+)	(2+)	(3+)
Nodular	(0)	(1+)	(2+)	(3+)
Hemorrágica	(0)	(1+)	(2+)	(3+)

Antro

Enantematosa	(0)	(1+)	(2+)	(3+)
Erosiva	(0)	(1+)	(2+)	(3+)
Nodular	(0)	(1+)	(2+)	(3+)
Hemorrágica	(0)	(1+)	(2+)	(3+)

Doudeno – Classificação endoscópica de duodenite – Sistema de Sydney

Enantematosa	(0)	(1+)	(2+)	(3+)
Erosiva	(0)	(1+)	(2+)	(3+)
Nodular	(0)	(1+)	(2+)	(3+)
Hemorrágica	(0)	(1+)	(2+)	(3+)