

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

MARCOS ANTONIO PEREIRA DE LIMA

ESTUDO DO VÍRUS EPSTEIN-BARR (EBV) EM
ADENOCARCINOMA GÁSTRICO:
FREQUÊNCIA, ASSOCIAÇÃO CLÍNICO-
HISTOPATOLÓGICA E RELAÇÃO COM A EXPRESSÃO
DAS PROTEÍNAS BCL-2, BAX E C-MYC.

FORTALEZA – CE

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MARCOS ANTONIO PEREIRA DE LIMA

ESTUDO DO VÍRUS EPSTEIN-BARR (EBV) EM
ADENOCARCINOMA GÁSTRICO:
FREQUÊNCIA, ASSOCIAÇÃO CLÍNICO-
HISTOPATOLÓGICA E RELAÇÃO COM A EXPRESSÃO
DAS PROTEÍNAS BCL-2, BAX E C-MYC.

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. Silvia Helena Barem Rabenhorst

FORTALEZA – CE

2006

MARCOS ANTONIO PEREIRA DE LIMA

ESTUDO DO VÍRUS EPSTEIN-BARR (EBV) EM
ADENOCARCINOMA GÁSTRICO:
FREQUÊNCIA, ASSOCIAÇÃO CLÍNICO-HISTOPATOLÓGICA E
RELAÇÃO COM A EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS BCL-2, BAX
E C-MYC.

Aprovada em: 08 de fevereiro de 2006

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Paula Rahal Liberatore
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP

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

Profa. Dra. Aparecida Diemi Nagao Dias
Universidade Federal do Ceará - UFC

Aos meus pais, que em todos os momentos e em todas as minhas decisões, me apoiaram e concederam a força e o amor necessários para meu caminhar.

Agradecimentos

Primeiramente a DEUS, fonte infinita de amor e compaixão, pela luz que ilumina minha vida e pela paz que repousa em meu saber.

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

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, representados pelos professores e demais funcionários, pelo empenho na formação científica de seus pós-graduandos.

A Profa. Dra. Silvia Helena Barem Rabenhorst, pessoa de conhecimento vasto e extrema competência que muito contribuiu para minha formação científica, pela exímia orientação e admirável dedicação durante todos os momentos da pesquisa.

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

Ao Cirurgião Marcos Aurélio Pessoa Barros, pela inestimável colaboração e compromisso no desenvolvimento deste estudo.

A Profa. Dra. Maria Inês de Moura Campos Pardini, pela valiosa colaboração para a concretização do presente estudo.

A doutoranda Adriana Ferrasi, pela importante contribuição na realização das PCR.

A Profa. Rosa Maria Salani Mota, pela importante colaboração quanto à análise estatística do trabalho.

Ao Hospital Universitário Walter Cantúdeo, 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 LABOROCHA[®], no nome da patologista Luciana Gomes Rocha de Arruda, pela prontidão no fornecimento de material clínico proveniente da Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza.

Ao Prof. Dalgimar Bezerra de Menezes, pela análise histopatológica dos tumores congelados e pelo fornecimento de espécimes clínicos incluídos em parafina, utilizados como controles das reações de hibridação *in situ*.

Ao Prof. Cláudio Gleidiston Lima da Silva, pela colaboração nas análises histopatológicas, pela força e pela amizade fraterna.

A residente de patologia Leila Carla da Cunha Magalhães, pelas reavaliações histopatológicas.

A farmacêutica mestranda Ângela Rosa André, pelo imenso apoio dispensado frente aos obstáculos e desalentos enfrentados ao longo desses dois anos e pela amizade fraterna.

Ao doutorando Mário Henrique Girão Faria, pela importante orientação quanto à realização da técnica de imuno-histoquímica e pela amizade.

Aos acadêmicos (de medicina) Carlos Henrique Paiva Granjeiro, Ana Claudia da Silva Mendes e (de biologia) Tiziane Gonçalves de Carvalho, pela dedicação durante as coletas de amostras e os procedimentos laboratoriais e pela amizade.

Aos companheiros mestrandos Cristianne Sousa Bezerra e Marlos Gomes Martins, pelo acolhimento, apoio e grande amizade.

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular – LABGEM, pelo apoio, carinho e ensinamentos.

A técnica laboratorial Margareth Gonçalves Maia, pelo diligente e valioso apoio quanto à preparação de cortes histológicos e colorações.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a concretização deste trabalho, a minha sincera e eterna gratidão.

“O verdadeiro conhecimento tem de vir de dentro”

(Sócrates)

Resumo

O vírus Epstein-Barr (EBV) tem sido associado com a tumorigênese dos adenocarcinomas gástricos, variando entre 1,3-19,3% de acordo com a população estudada. Diversos estudos têm demonstrado importantes evidências do envolvimento do EBV nesse processo, tais como a monoclonalidade do genoma viral e a presença do vírus em quase todas as células tumorais do sítio primário e em células metastáticas. No entanto, os mecanismos utilizados pelo vírus para orquestrar a transformação tumoral, ainda não foram totalmente elucidados. Neste contexto, o presente estudo objetivou investigar a frequência do EBV e a associação com as proteínas BCL-2, BAX e c-MYC. Para tanto, 100 casos de adenocarcinomas gástricos (67 homens e 33 mulheres), obtidos de dois hospitais de Fortaleza, foram analisados quanto à presença do EBV, detectado através das técnicas de PCR e de hibridação *in situ* (direcionada ao transcrito viral EBER1) pelo método usual e GenPoint®. Procedeu-se também, estudo imuno-histoquímico das referidas proteínas celulares, através do método da estreptoavidina-biotina-peroxidase. A distribuição por sexo, idade, sítio anatômico do tumor e as análises histopatológicas, de modo geral, reproduziram as tendências da literatura mundial. Pela técnica de hibridação *in situ*, 8 (8%) casos foram positivos, 6 destes apresentaram marcação difusa e 2 apresentaram marcação focal. Apenas 2 apresentaram linfócitos infectados. De modo geral, o EBV apresentou maior associação com o sexo masculino (87,5% [$p=0,265$]), com tumores situados na cárdia (37,5% [$p=0,549$]), de estadiamento avançado (IIIB e IV), do tipo intestinal (87,5% [$p=0,136$]) e moderadamente diferenciados (75%). Nenhum dos casos EBV-positivos exibiram marcação para BCL-2. Embora as proteínas BAX e c-MYC (nuclear) apresentaram índices de positividade e médias de escores significativos no grupo EBV-positivo, estes foram inferiores aos valores do grupo EBV-negativo, sobretudo a proteína c-MYC nuclear (Teste de Mann-Whitney LI $p=0,039$ e HS $p=0,045$). A marcação citoplasmática da proteína c-MYC revelou valores de marcação discretamente superiores no grupo EBV-positivo. O balanço entre as proteínas BCL-2 e BAX demonstrou que a maioria dos casos estudados apresentavam tendência à apoptose, mas 62,5% dos casos EBV-positivos exibiram um equilíbrio. Vinte e nove casos (28 negativos e 1 positivo) foram submetidos a outro método de hibridação *in situ* que emprega o sistema da biotínil-tiramida (GenPoint®), demonstrando resultados idênticos aos obtidos pela técnica convencional. De 61 casos analisados através da técnica de PCR, 35 (57,4%) foram positivos, sendo constatado um baixíssimo índice de concordância ($\kappa = -0,026 [\pm 0,069]$) com a técnica de hibridação *in situ*. Em 24/35 casos positivos, a deleção de 30pb do gene LMP1 foi investigada, sendo constatada em 37,5% destes. Os resultados obtidos no presente estudo quanto à frequência do EBV e a correlação com critérios clínico-histopatológicos, reproduziram os achados de estudos realizados em diversas partes do mundo. A correlação com as proteínas sugere que *in vivo*, o vírus não esteja relacionado com a expressão de BCL-2 e de c-MYC (nuclear), que poderiam atuar em sinergismo favorecendo o desenvolvimento tumoral. A supressão da expressão de BAX, pode representar um mecanismo viral para inibição da apoptose. Os resultados da c-MYC citoplasmática apontam para um possível envolvimento do EBV com mecanismos de transporte da membrana nuclear, determinando o acúmulo da proteína no citoplasma. A baixa frequência de linfócitos infectados indica que os mesmos não são os principais responsáveis pela elevada positividade da técnica de PCR, devendo ser ao menos em parte, decorrente de epitélio normal e/ou pré-neoplásico infectado sugerindo um padrão de latência que não expresse EBER1.

Palavras-chave: Vírus Epstein-Barr, Adenocarcinoma gástrico, Tumorigênese.

Abstract

The Epstein-Barr virus (EBV) has been related to the tumorigenesis of the gastric carcinomas, varying from 1.3-19.3% according to the studied population. Several studies have demonstrated strong evidences of its relation in this process, such as the monoclonality of the viral genome and its the presence in almost all tumor cells. However, most of the mechanisms used by the virus to control this process are still unknown. In this context, the present study aimed to investigate the frequency of the EBV and the association with the BCL-2, BAX and c-MYC proteins. Therefore, 100 cases of gastric carcinoma (67 males and 33 females), obtained from two hospitals in Fortaleza, were assessed to detect the EBV by PCR and *in situ* hybridization (aimed to the EBER1 transcript) using the standard method and GenPoint[®]. Immunohistochemistry technique was done to evaluate the expression of the referred cellular proteins, by streptavidin-biotin-peroxidase method. The distribution by sex, age, tumor anatomic site and the histopathologic analysis, in general, reproduced the pattern of the world scientific bibliographies. Regarding virus detection by *in situ* hybridization, 8 (8%) cases were positive, 6 of these had shown diffuse pattern of staining, and 2 had demonstrated focal pattern. From 100 cases, only 2 presented infected lymphocytes. In general, the EBV demonstrated higher association with: males (87.5% [$p=0.265$]), tumors situated in the cardia (37.5% [$p=0.549$]), advanced stage (IIIB and IV), intestinal type (87.5% [$p=0.136$]), and moderately differentiated (75%). There were no EBV-positive cases which exhibited BCL-2 staining. Although the BAX and the c-MYC (nuclear) proteins have demonstrated significant positivity index and scores averages in the EBV-positive group, these were lower than the values of the EBV-negative group, notably the c-MYC nuclear protein (Mann-Withney test LI $p=0.039$ and HS $p=0.045$). The cytoplasmic staining of the c-MYC protein revealed slightly higher staining values in the EBV-positive group. The balance between the BCL-2 and BAX proteins demonstrated that the majority of the evaluated cases had exhibited apoptosis-orientation, however 62.3% of the EBV-positive cases exhibited equilibrium between these proteins. Twenty-nine cases (28 negative and 1 positive) were submitted to the biotinyl tyramide system (*in situ* hybridization method - GenPoint[®]), demonstrating the same results obtained by the standard technique. From the 61 cases assessed by PCR, 35 (57.4%) were positive, being verified a low concordance index ($\kappa = -0.026 [\pm 0.069]$) with the standard *in situ* hybridization technique. The 30bp deletion of LMP1 gene was investigated in 24 out of 35 positive cases, being verified in 37.5% of these. The results obtained in the present study, concerning the EBV frequency and the correlation with clinic-histopathologic data, reproduced findings of researches done in several world regions. The correlation with the proteins suggests that *in vivo* the virus is not related to the overexpression of BCL-2 and c-MYC (nuclear) that could act in synergism to promote the tumor development. The suppression of the BAX expression might represent a viral mechanism for apoptosis inhibition. The results of the cytoplasmic c-MYC point to a possible involvement of the EBV with transport mechanisms of the nuclear membrane, resulting in its accumulation in the cytoplasm. The low frequency of infected lymphocytes indicates that they are not the main responsible of the high number of positivity in the PCR technique. It could be, at least in part, due to the infected normal and/or pre-neoplastic epithelium, suggesting a new latency pattern which not express the EBER1.

Keywords: Epstein-Barr virus, gastric carcinomas, tumorigenesis.

Lista de Figuras

FIGURA 1	Representação esquemática do genoma do vírus Epstein-Barr (EBV).	19
FIGURA 2	Representação esquemática da estrutura da LMP1 e as vias de sinalização envolvidas	27
FIGURA 3	Representação esquemática da estrutura da LMP2A e as vias de sinalizações envolvidas	29
FIGURA 4	Representação esquemática das possíveis estruturas secundárias dos EBERs	31
FIGURA 5	Incidência de Câncer Gástrico em várias regiões do mundo distribuído quanto ao sexo, 2002	34
FIGURA 6	Regiões anatômicas do estômago e a frequência de tumores correspondentes	35
FIGURA 7	Histopatologia dos adenocarcinomas gástricos do tipo difuso e intestinal	36
FIGURA 8	Incidências de EBV em carcinoma gástrico verificadas em estudos de diversas partes do mundo	39
FIGURA 9	Representação esquemática de possíveis vias tumorigênicas do EBV em carcinoma gástrico	43
FIGURA 10	Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos segundo a procedência dos pacientes (n=100)	55
FIGURA 11	Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto ao sexo dos pacientes (n=100)	56
FIGURA 12	Número de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos segundo o sexo e faixa etária dos pacientes (n=100)	56
FIGURA 13	Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto à cor dos pacientes (n=100)	56
FIGURA 14	Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto ao tipo sanguíneo dos pacientes (n=57)	57
FIGURA 15	Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto à presença de fatores de risco.	57
FIGURA 16	Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto à localização anatômica dos tumores (n=100)	58
FIGURA 17	Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos	58

	segundo a classificação de Låuren e a faixa etária dos pacientes (n=100)	
FIGURA 18	Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto ao estadiamento tumoral e a classificação de Låuren (n=100)	60
FIGURA 19	Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto ao estadiamento tumoral e a faixa etária dos pacientes (n=100)	60
FIGURA 20	Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto ao grau de diferenciação dos tumores (n=100)	60
FIGURA 21	Percentual de casos positivos (positividade) e média dos escores de LI e H-score, referentes à expressão das oncoproteínas BCL-2, BAX, c-MYC (nuclear e citoplasmático)	61
FIGURA 22	Expressão das oncoproteínas celulares BCL-2, BAX e c-MYC detectada através da técnica de imuno-histoquímica	62
FIGURA 23	Perfil de marcação das oncoproteínas BCL-2, BAX, c-MYC (nuclear e citoplasmático), verificado através da técnica de imuno-histoquímica	63
FIGURA 24	Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto à localização do tumor e a expressão das proteínas BCL-2, BAX, c-MYC (nuclear e citoplasmático) (n=100)	63
FIGURA 25	Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto à classificação de Låuren e a expressão das proteínas BCL-2, BAX, c-MYC (nuclear e citoplasmático) (n=100)	64
FIGURA 26	Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto ao grau de diferenciação tumoral e a expressão das proteínas BCL-2, BAX, c-MYC (nuclear e citoplasmático) (n=100)	64
FIGURA 27	Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto ao estadiamento tumoral e a expressão das proteínas BCL-2, BAX, c-MYC (nuclear e citoplasmático) (n=100)	65
FIGURA 28	Distribuição percentual dos casos de carcinoma gástrico segundo a tendência celular (sobrevida, apoptose, equilíbrio), estimada através da relação dos índices de marcação BCL-2/BAX, verificados por imuno-histoquímica (n=100)	65

FIGURA 29	Percentuais de concomitância (+/+), concordância (-/-) e discordâncias (+/- ou -/+) entre as marcações nuclear e citoplasmática da oncoproteína c-MYC, distribuídos segundo o estadiamento tumoral (n=100)	66
FIGURA 30	Percentual de casos positivos (positividade) e média dos escores de LI e H-score para BAX, distribuídos quanto à expressão c-MYC nuclear	66
FIGURA 31	Presença de EBV em carcinoma gástrico detectada pela técnica de Hibridação <i>in situ</i>	67
FIGURA 32	Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto ao sexo dos pacientes e a presença de EBV detectado por hibridação <i>in situ</i> (n=100)	68
FIGURA 33	Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos segundo à cor dos pacientes e a presença de EBV detectado por hibridação <i>in situ</i> (n=100)	68
FIGURA 34	Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos segundo à faixa etária dos pacientes e presença de EBV detectado por hibridação <i>in situ</i> (n=100)	69
FIGURA 35	Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto ao tipo sangüíneo dos pacientes e a presença de EBV detectado por hibridação <i>in situ</i> (n=100)	69
FIGURA 36	Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto à localização do tumor e a presença de EBV detectado por hibridação <i>in situ</i> (n=100)	70
FIGURA 37	Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto ao estadiamento tumoral e a presença de EBV detectado por hibridação <i>in situ</i> (n=100).	70
FIGURA 38	Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto à ocorrência de metástase à distância e a presença de EBV detectado por hibridação <i>in situ</i> (n=100)	70
FIGURA 39	Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto à classificação de Låuren e a presença de EBV detectado por hibridação <i>in situ</i> (n=100).	71

FIGURA 40	Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto ao grau de diferenciação tumoral e a presença de EBV detectado por hibridação <i>in situ</i> (n=100)	71
FIGURA 41	Relação entre as técnicas de Hibridação <i>in situ</i> e PCR quanto à detecção do EBV em carcinomas gástricos (n=61)	71
FIGURA 42	Gel de agarose após corrida eletroforética dos produtos de amplificação do gene EBNA1	72
FIGURA 43	Percentual de casos de carcinoma gástrico PCR-positivos para o EBV, distribuídos quanto a presença da deleção de 30pb do gene da LMP1 (n=24)	72
FIGURA 44	Percentual de casos positivos (positividade) e média dos escores de LI e H-score para BCL-2, distribuídos quanto à presença de EBV detectado por hibridação <i>in situ</i> (n=100) e PCR (n=61)	73
FIGURA 45	Percentual de casos positivos (positividade) e média dos escores de LI e H-score para BAX, distribuídos quanto à presença de EBV detectado por hibridação <i>in situ</i> (n=100) e PCR (n=61)	74
FIGURA 46	Percentual de casos positivos (positividade) e média dos escores de LI e H-score para c-MYC nuclear, distribuídos quanto à presença de EBV detectado por hibridação <i>in situ</i> (n=100) e PCR (n=61)	74
FIGURA 47	Percentual de casos positivos (positividade) e média dos escores de LI e H-score para c-MYC citoplasmático, distribuídos quanto à presença de EBV detectado por hibridação <i>in situ</i> (n=100) e PCR (n=61)	75

Lista de Tabelas

TABELA 1	Expressão de genes latentes quanto aos tipos de latência e tecido associado.	21
TABELA 2	Definição do TNM patológico	37
TABELA 3	Agrupamento por Estadiamento	38
TABELA 4	Regiões celulares de expressão dos alvos das técnicas empregadas e os respectivos clones dos anticorpos	51
TABELA 5	Casos de carcinoma gástrico estudados distribuídos segundo a definição da profundidade da invasão tumoral (pT), comprometimento de linfonodos regionais (pN) e presença de metástases à distância (pM) (n=100)	59
TABELA 6	Correlação entre os resultados das técnicas de Hibridação <i>in situ</i> e PCR para detecção do EBV em carcinoma gástrico (n=61)	72
TABELA 7	Perfil patológico e de expressão das proteínas BCL-2, BAX, c-MYC (nuclear e citoplasmático), dos casos EBV-positivos detectados pela técnica de Hibridação <i>in situ</i>	75
TABELA 8	Distribuição quanto ao estadiamento tumoral, observada em pesquisas de diversas partes do mundo, incluindo o presente estudo	80
TABELA 9	Percentuais de positividade das proteínas BCL-2, BAX, c-MYC (nuclear e citoplasmática), observados em diversas referências, incluindo o presente estudo	82
TABELA 10	Associação do EBV com adenocarcinoma gástrico	85

Sumário

1. Introdução.....	17
1.1. Histórico.....	17
1.2. O vírus Epstein-Barr (EBV).....	18
1.3. Papel dos Expressos Latentes do EBV.....	22
1.3.1. EBNA1.....	22
1.3.2. EBNA2.....	24
1.3.3. Família EBNA3.....	25
1.3.4. EBNA-LP.....	25
1.3.5. LMP1.....	25
1.3.6. LMP2.....	28
1.3.7. EBERs.....	30
1.3.8. BARF1.....	31
1.4. Técnicas de Detecção do EBV.....	32
1.5. EBV em Tumores Sólidos.....	33
1.6. Câncer Gástrico.....	33
1.6.1. Epidemiologia do Câncer Gástrico.....	33
1.6.2. Classificações Clínico-Histológicas do Câncer Gástrico.....	34
1.6.3. Etiologia do Câncer Gástrico.....	38
1.6.4. EBV & Adenocarcinoma Gástrico.....	38
1.6.5. Papel do EBV na Oncogênese Gástrica.....	41
1.7. Oncoproteínas e Vias de Sinalização Celulares Relacionadas ao EBV.....	43
1.7.1. Família Bcl-2.....	43
1.7.2. Proto-oncogene c-MYC.....	44
1.8. Perspectivas de Estudos Moleculares.....	46
2. Objetivos.....	47
2.1. Objetivo Geral.....	47
2.2. Objetivos Específicos.....	47
3. Materiais e Métodos.....	48
3.1. Casuística.....	48
3.2. Aspectos Éticos.....	48
3.3. Instrumentos e Procedimentos de Coleta de Dados.....	49
3.4. Avaliação Histopatológica.....	49
3.5. Hibridação <i>in situ</i>	49

3.6. Hibridação <i>in situ</i> com o sistema GenPoint®	50
3.7. Imuno-histoquímica.....	50
3.8. Critérios para Análise das Lâminas.....	51
3.9. Extração do DNA de Espécimes Congelados.....	52
3.10. Reação da Polimerase em Cadeia (PCR).....	53
3.10.1. Detecção do EBV.....	53
3.10.2. Deleção de 30pb do gene da LMP1.....	53
3.11. Análise Estatística.....	54
3.12. Programas Computacionais.....	54
4. Resultados.....	55
4.1. Análise Clínico-Epidemiológica.....	55
4.2. Análise Histopatológica.....	58
4.3. Análise Imuno-Histoquímica.....	61
4.4. Detecção do Vírus Epstein-Barr.....	67
4.4.1. Detecção do EBV por Hibridação <i>in situ</i>	67
4.4.2. Correlação dos Resultados da Hibridação <i>in situ</i> com os Dados Clínico-patológicos.....	68
4.4.3. PCR x Hibridação <i>in situ</i>	71
4.4.4. Deleção de 30pb do Gene Viral da LMP1.....	72
4.5. Correlação do EBV com as Oncoproteínas Celulares.....	73
5. Discussão.....	76
5.1. Análise Clínico-Epidemiológica.....	76
5.2. Análise Histopatológica.....	79
5.3. Análise Imuno-Histoquímica.....	81
5.4. Detecção do Vírus Epstein-Barr.....	85
5.4.2. Detecção do EBV por Hibridação <i>in situ</i>	85
5.4.1. PCR x Hibridação <i>in situ</i>	89
5.5. Correlação do EBV com as Oncoproteínas Celulares.....	92
6. Conclusões.....	95
7. Referências Bibliográficas.....	97
8. Anexos.....	110
Anexo I – Procedimento de Coleta.....	111
Anexo II – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	112
Anexo III – Termo de Consentimento.....	113
Anexo IV – Ficha de Coleta de Dados.....	114

Anexo V – Orçamento.....	115
Anexo VI – Artigo 1.....	117
Anexo VII – Artigo 2.....	128
Anexo VIII - Apresentação em Congresso 1.....	145
Anexo IX – Apresentação em Congresso 2.....	146
Anexo X – Tabela de Dados Gerais.....	147

1.Introdução

1.1. Histórico

Durante muito tempo a participação dos vírus no desenvolvimento de neoplasias não foi aceita. No início do século XX, alguns pesquisadores começaram a sugerir a possibilidade de agentes virais estarem envolvidos no surgimento de tumores, o que gerou muita polêmica na comunidade científica da época, pois implicava na possibilidade de transmissão do agente causador da doença (EPSTEIN, 2001). Em um dos primeiros e mais significativos estudos, Ellermann e Bang (1908) estudando leucemia de galinhas, perceberam que podiam induzir o desenvolvimento da doença em animais sadios através da inoculação de um filtrado *cell-free*, obtido das células tumorais. Contudo, seus achados não foram vistos com muito interesse na época. Nos anos que se seguiram, diversos autores realizaram pesquisas sob a participação de vírus em neoplasias de vários animais. Alguns desses autores receberam duras críticas da comunidade científica. Mas, por volta da década de 50, novos estudos confirmaram os achados prévios, que até então não eram aceitos, derrubando um dogma ao confirmar que os vírus exerciam papel no desenvolvimento de neoplasias (EPSTEIN, 2001).

Foi em meio a este contexto que, Epstein *et al.* (1964), utilizando métodos não convencionais para a época, cultivaram linhagens de linfoma de Burkitt *in vitro*, em seguida, utilizaram microscopia eletrônica através da qual foi possível observar a presença de partículas virais, semelhantes aos membros da família Herpesvirus, sendo posteriormente chamado de vírus Epstein-Barr (EBV) em homenagem aos seus descobridores. Inicialmente, os pesquisadores da época não deram muita atenção para tal achado, primeiramente, pela dificuldade de se cultivar com êxito linhagens linfóides e segundo, que a microscopia eletrônica era uma técnica recente, ainda pouco compreendida e limitada a alguns laboratórios.

Pouco tempo após a demonstração da associação do EBV com o linfoma de Burkitt, vários laboratórios conduziram estudos com o referido vírus. Em 1967, no laboratório de Werner e Brigitte Henle na Filadélfia-EUA, durante análises de soros de pacientes para rastreamento de anticorpos contra o EBV, visando identificar novas doenças associadas, uma das técnicas constatou após o desenvolvimento de mononucleose infecciosa (MI), que seu soro antes usado como controle negativo, havia se tornado positivo para anticorpos contra o EBV (EPSTEIN, 2001). Com base nesse evento, Henle *et al.* (1968) desenvolveram um estudo utilizando o banco de soros da Universidade de Yale e logo verificaram que todos pacientes com história de mononucleose infecciosa apresentavam elevados títulos de anticorpos contra o vírus, sugerindo assim, uma relação causal do EBV com a referida afecção. Essa relação foi confirmada pelo estudo de Evans *et al.* (1968). Adicionalmente,

todos os pacientes com linfoma de Burkitt estudados por Henle *et al.*(1968), também apresentaram elevados títulos de anticorpos.

Em 1966, MacMahon já sugeria que a Doença de Hodgkin (DH) deveria ser causada por algum agente infeccioso. Contudo, foi Levine *et al.* (1971) que relataram as primeiras evidências do envolvimento do EBV no desenvolvimento da DH ao constatar elevados títulos de anticorpos contra antígenos do EBV em pacientes com esse tipo de linfoma.

A primeira sugestão de que o EBV pudesse estar envolvido com a tumorigênese do carcinoma de nasofaringe (CNF) provém do estudo de Old *et al.* (1966), que observaram casualmente elevados títulos de anticorpos contra o EBV em soros de pacientes com CNF. Em 1970, Zur Hausen *et al.* reforçaram essa hipótese ao demonstrarem a presença do genoma viral em amostras de CNF. Mas, apenas em 1973 foi relatada a presença do EBV especificamente em células epiteliais de CNF (WOLF *et al.*, 1973). Desde então, diversos estudos foram realizados reforçando cada vez mais o papel do EBV no surgimento desse tipo de tumor.

Em 1973, Reedman e Klein (1973) demonstraram em células infectadas pelo EBV o antígeno nuclear do EBV (EBNA), sendo esta a primeira proteína do EBV associada com o desenvolvimento de neoplasias. Logo, alguns estudos relataram a presença do EBNA em desordens linfoproliferativas em pacientes imunossuprimidos. Durante a década de 80, com o surgimento de novas terapias imunossupressoras destinadas a pacientes transplantados e o aumento de casos da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), os casos de doenças linfoproliferativas associadas ao EBV também aumentaram (OKANO, 2000).

Os avanços das técnicas imunológicas e moleculares de detecção viral têm possibilitado compreender melhor o papel do EBV em diversas doenças associadas, assim como, verificar novas associações. Atualmente, sabe-se que o EBV também é verificado em linfomas de células T, linfomas/leucemias de células NK (*Natural killers*), leucoplasia pilosa e carcinoma gástrico. Recentemente, vários autores têm demonstrado a presença do genoma viral em diversos tipos de tumores sólidos, como revisado por Lima e Rabenhorst (2006).

1.2. O vírus Epstein-Barr (EBV)

O EBV é um membro da subfamília gama-Herpesvirus, sendo protótipo do gênero *Lymphocryptovirus* (KIEFF, 1996). Mede aproximadamente 150nm de diâmetro, apresentando um cerne constituído de DNA linear dupla fita com cerca de 172Kpb, circundado por um capsídeo icosaédrico formado por 162 capsômeros e revestido por um envoltório glicoprotéico (HSIEH *et al.*, 1999). Existem dois subtipos virais chamados de tipo 1 e 2, ambos tipos diferem em apenas poucos genes (KIEFF, 1996).

O genoma do EBV foi delimitado em regiões estabelecidas com base na posição dos fragmentos no mapa de restrição da endonuclease *Bam*HI (*Bacillus amyloliquefaciens H*), nomeados em ordem alfabética de acordo com o tamanho, sendo o fragmento *Bam*HI A, o maior entre eles (ARRAND *et al.*, 1981). Foi verificado que o genoma viral apresenta regiões de repetição, cuja função ainda não está esclarecida. Ambas as extremidades da forma linear do genoma viral, apresentam uma seqüência de repetição de 500pb cada, denominada repetição terminal (TR), onde ocorre a ligação das extremidades durante o processo de circularização no interior das células infectadas (Figura 1). O EBV apresenta também, quatro seqüências de repetição interna (IR1-4), de 3Kpb. Foi demonstrado posteriormente que, na região *Bam*HI C do genoma viral está localizada uma seqüência denominada OriP (**O**rigem da Replicação **P**lasmidial) (KIEFF, 1996) Essa região contém dois elementos chamados de: FR (do inglês, *Family of Repeats*), que inclui 20 repetições em 30pb em seqüência; e DS (do inglês, *Dyad Symmetry*), constituído de 4 repetições (AMBINDER *et al.*, 1991).

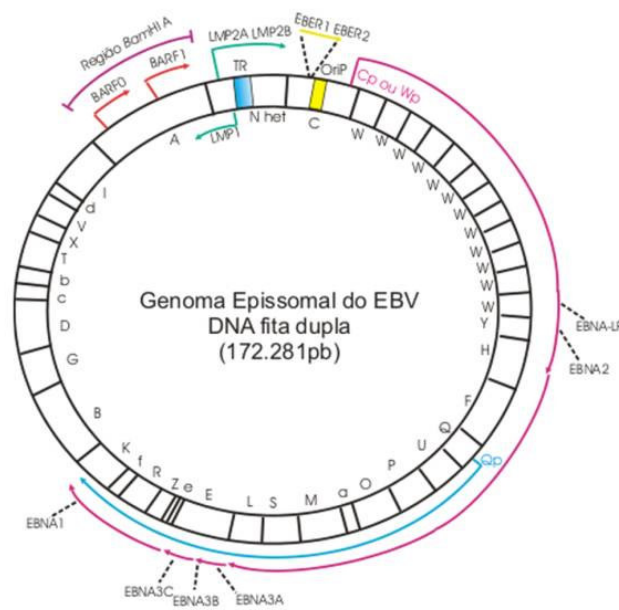


FIGURA 1 - Representação esquemática do genoma do vírus Epstein-Barr (EBV). As regiões do genoma determinadas pelo ponto de restrição da enzima *Bam*HI, são representadas pelas letras dispostas no interior do círculo. A origem da replicação plasmidial (OriP) é demonstrada em amarelo. A seqüência de repetição terminal (TR) é demonstrada em azul. A seta cor-de-rosa representa o longo transcrito produzido a partir do promotor Cp ou Wp durante a latência tipo III, que é submetido a diversos *splices* para codificar todos os EBNA's. A seta azul representa o transcrito do EBNA1, produzido a partir do promotor Qp durante as latências I e II. As demais setas coloridas, representam o sentido e a origem da transcrição dos genes latentes do EBV. Adaptado de Osato e Imai (1996) e de Murray e Young (2001).

O EBV é amplamente distribuído no mundo, sendo estimado que mais de 90% da população adulta esteja infectada e que boa parte destes indivíduos transmitam intermitentemente o vírus. A transmissão é mediada através da saliva, principalmente através do beijo e possivelmente de perdigotos. Inicialmente, o EBV infecta células epiteliais da orofaringe, nasofaringe e glândulas salivares, penetrando nestas células (por receptores não identificados) e sendo replicado (TSUCHIYA, 2002). Posteriormente, os vírus disseminam-se para tecidos linfóides subjacentes infectando linfócitos B, que representam o principal reservatório viral. Alguns autores sugerem que, durante a infecção primária, os vírus presentes na saliva podem também penetrar nas criptas de estruturas linfoepiteliais (tais como as tonsilas), atravessando uma fina camada superficial de células epiteliais para alcançar diretamente os linfócitos subjacentes (THORLEY-LAWSON, 2001).

Nos linfócitos, a penetração é viabilizada pela fusão do envoltório com a membrana celular, mediada pela ligação da gp350/220 ao receptor CD21 (ou CR2) do componente C3d do sistema complemento, auxiliada pelas glicoproteínas gp25 (gpL), gp 42/38 e gp 85 (gpH), que formam um complexo e se ligam à MHC-II (molécula de histocompatibilidade de classe II), que atua como co-receptor na entrada do vírus (DOLCETTI e MASUCCI, 2003). No citoplasma, o capsídeo é desnudado e o genoma viral antes linear, torna-se imediatamente circular, sendo então transportado para o núcleo onde permanece sob a forma de DNA episossomal extracromossômico (KIEFF, 1996; HSIEH *et al.*, 1999).

No estado episossomal o vírus é descrito como **latente**, sendo replicado apenas durante a mitose da célula hospedeira. Apesar de seu genoma poder codificar cerca de 100 genes, pode-se verificar a expressão de até 12 genes durante a latência, dependendo do tipo celular ou estado imunológico do hospedeiro. Os produtos desses genes latentes, incluem: seis proteínas conhecidas como antígenos nucleares do EBV (do inglês, *Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen*), EBNA-1, 2, 3A, 3B (EBNA4), 3C (EBNA6) e LP (do inglês, *Leader Protein*, também conhecida como EBNA5); três proteínas latentes de membrana (do inglês, *Latent Membrane Protein*) LMP-1, LMP-2A e LMP-2B; duas pequenas moléculas de RNA, EBER-1 e 2 (do inglês, *Epstein-Barr Virus Encoded RNA*); transcritos com múltiplos *splices*, da região *BamHI A* do genoma viral, BARF0 (do inglês, *BamHI A Right-ward Open Reading Frame*) e BARF1 (AMBINDER, 1994). Sabe-se que, linfócitos B primários infectados pelo EBV *in vitro* tornam-se imortalizados, assumindo um fenótipo denominado de linhagem celular linfoblastóide (LCL), com potencial proliferativo ilimitado. Essa linhagem expressa os 12 genes latentes (padrão completo de expressão). Esse padrão também é verificado na doença linfoproliferativa pós-transplante (DLPT) em pacientes imunossuprimidos, apontando para a importância da vigilância imunológica no controle dos efeitos oncogênicos do EBV.

Da observação de que os genes latentes virais, não são expressos concomitantemente nas diversas células de tecidos ou linhagens tumorais EBV-positivas, foi proposto a existência de quatro tipos de latência com padrões distintos de expressão, descritos na tabela 1. Além destes padrões já estabelecidos, um novo vem sendo relatado por Sugawara *et al.* (1999), que estudando carcinoma hepatocelular, demonstraram a expressão de EBNA1 e ausência de EBERs, sugerindo a possibilidade do EBV estabelecer uma infecção latente com padrão de latência distinto de todos já conhecidos, pela ausência de EBERs.

Tabela 1: Expressão de genes latentes quanto aos tipos de latência e tecido associado.

TIPO DE LATÊNCIA	TECIDO ASSOCIADO	GENES EXPRESSOS PELO EBV											
		EBNA-1	-2	-3A	-3B	-3C	LP	LMP1	LMP2A	LMP2B	EBERs	BARF0	BARF1
I	Linfoma de Burkitt	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
	Carcinoma Gástrico	+	-	-	-	-	-	-	+/-	-	+	+	+
II	Carcinoma de Nasofaringe	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	DH; Linfoma de células T	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
III	DLPT; Linfoma-AIDS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
IV	Linf. B circulantes	+/-	-	-	-	-	-	-	+	-	+		
Outros	Hepatocarcinoma	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
	Leiomiossarcoma		+					-			+		

DH, Doença de Hodgkin

DLPT, Doença Linfoproliferativa Pós-transplante

Linfoma não-Hodgkin associado a AIDS

Linfócitos B circulantes de indivíduos sadios portadores

Leiomiossarcoma em indivíduos imunocomprometidos

Nas células epiteliais durante a infecção primária, onde o EBV replica-se intensamente (ciclo lítico), é possível observar a expressão de proteínas líticas virais (CALLAN, 2004), enquanto que, nos linfócitos B inicialmente infectados, o EBV desenvolve uma infecção latente com a expressão do padrão completo de genes, característico da latência do tipo III. Algumas destas células B são capazes de migrar a partir do local primário de infecção, podendo ser detectadas no sangue periférico. No entanto, após o controle da infecção inicial, promovido principalmente por linfócitos T CD8+, o número de linfócitos B infectados reduz significativamente, de cerca de 10.000 células para uma célula infectada por 10⁶ células-B circulantes (OHGA *et al.*, 2002). Também é possível verificar uma mudança no padrão de expressão de proteínas latentes, assumindo o padrão de latência tipo IV,

caracterizado por uma mínima expressão de genes latentes, o que possivelmente contribui para o escape ao sistema imune (HSIEH *et al.*, 1999).

Os estímulos responsáveis por desencadear o **ciclo lítico** do vírus, ainda não estão esclarecidos. Durante esse ciclo, as primeiras proteínas a serem observadas, denominadas como proteínas precoces imediatas, são codificadas pelos seguintes genes: BZLF1 (também conhecida como ZEBRA) e BRLF1 (GULLEY, 2001). A proteína codificada pelo BZLF1 pode regular negativamente o promotor Cp e conseqüentemente a expressão de EBNAs, favorecendo possivelmente, a transição do estado latente para o lítico. Os produtos dos dois referidos genes regulam a expressão dos genes precoces BHLF1 e BSMLF1, que estão associados a transativação de outros genes precoces. Quanto aos demais genes precoces, a maioria está relacionada com a replicação do DNA, incluindo a DNA polimerase viral (BALF5), uma proteína de ligação a DNA (BALF2), timidina quinase (BXLF1), uma exonuclease alcalina (BGLF5) e ribonucleotídeo redutase (BORF2 e BaRF1) (AMBINDER e MANN, 1994; KIEFF, 1996). Posteriormente, verifica-se a expressão de genes tardios, que consistem principalmente de proteínas estruturais do vírus ou proteínas envolvidas na penetração celular e formação do envelope, tais como as glicoproteínas gp350/220 (BLLF1), gp110 (BALF4), gp85 (BXLF2), gp55/80 (BILF2), gp42 (BDLF3) (KIEFF, 1996).

Importante mencionar que, a proteína codificada pelo gene BHRF1 apresenta homologia com a proteína celular BCL-2 (KHAN *et al.*, 1993), enquanto que, o produto do gene BCRF1 apresenta homologia com a interleucina 10 (IL-10), citocina que atua suprimindo a resposta imune do hospedeiro (AMBINDER e MANN, 1994; HSIEH *et al.*, 1999).

1.3. Papel dos Expressos Latentes do EBV

Atualmente, de acordo com a *International Agency from Research on Cancer - IARC* o EBV é classificado como um agente carcinógeno do grupo I (IARC, 1997). Contudo, os mecanismos oncogênicos empregados pelo EBV, ainda não estão totalmente esclarecidos. Tem sido sugerido que os efeitos tumorigênicos estejam relacionados com a expressão de seus genes latentes, que por sua vez, podem atuar sobre mecanismos de proliferação e morte celular. Estão relacionados a seguir, os genes latentes virais conhecidos até o presente momento e seus efeitos sobre os mecanismos celulares.

1.3.1. EBNA1

O EBNA1 é uma proteína de ligação a DNA, constituída de 641 aminoácidos, que é codificada a partir do gene BKRF1, localizado entre os nucleotídeos 107567-110176 do

genoma viral (KIEFF, 1996). O EBNA1 é expresso nos três primeiros tipos de latência, indicando a sua importância na infecção latente. Durante a latência tipo I e II o gene do EBNA1 é transcrito a partir do promotor Qp (figura 1), resultando na formação de uma cadeia de 2,3 Kpb, enquanto que na latência tipo III, pode ser transcrito a partir dos promotores Wp e Cp, produzindo transcritos de 3,4 e 3,6 Kpb, respectivamente. Na latência tipo III, todos os EBNA1s são gerados a partir de um único e longo transcrito primário que sofre diversos *splices*. Foi demonstrado que um outro promotor, o Fp, pode controlar a expressão do EBNA1 em células de Linfoma de Burkitt que expressam transcritos líticos (KNECHT *et al.*, 1997).

O EBNA1 tem demonstrado ser essencial na segregação do genoma viral durante a divisão das células hospedeiras, promovendo a manutenção do mesmo nas células-filha (KNECHT *et al.*, 1997; YOUNG, 2000; MURRAY e YOUNG, 2001; RAAB-TRAUB, 2002; DOLCETTI e MASUCCI, 2003). Esse processo é mediado através da ligação desta proteína à região oriP, localizada no fragmento *Bam*HI-C do genoma viral (LEIGHT e SUGDEN, 2000). Alguns autores relatam que, a ligação do EBNA1 à sequência FR da região oriP promove a ativação de vários promotores, dentre eles, o Cp (AMBINDER *et al.*, 1991; KNECHT *et al.*, 1997). Pode ainda, ligar-se à duas regiões abaixo do promotor Qp, a partir do qual é transcrito nos dois primeiros tipos de latência, regulando negativamente sua própria expressão (YOUNG *et al.*, 2000). A ligação da proteína ao DNA, ocorre através do domínio carboxi-terminal (aminoácidos 459-487) a uma sequência consenso palindrômica: TAGCATATGCTA (AMBINDER *et al.*, 1990). Adicionalmente, o EBNA1 sofre homodimerização, evento necessário para o sucesso da ligação ao DNA (SHAH *et al.*, 1992).

A maior parte da região amino-terminal do EBNA1 é composta pela repetição de glicina-alanina (GAR). Tem sido demonstrado que essa repetição inibe degradação proteolítica realizada pelo proteossomo, de modo que, os epítomos não são processados e apresentados na superfície celular em moléculas de histocompatibilidade humana de classe I (MHC-I) (LEVITSKAYA *et al.*, 1995). Esse mecanismo além de prolongar a meia-vida da proteína, pode também contribuir no desenvolvimento de neoplasias, uma vez que as células infectadas conseguem evadir-se ao controle do sistema imune, particularmente de linfócitos T CD8 citotóxicos.

A principal evidência do papel tumorigênico do EBNA1 decorre do estudo de Wilson *et al.* (1996), que verificaram o desenvolvimento de linfoma de células B em camundongos transgênicos expressando EBNA1. Por outro lado, foi demonstrado ser esta proteína capaz de suprimir a nível transcricional (por um mecanismo desconhecido) a expressão do oncogene *c-erbB-2* (*HER2/neu*) (CHUANG *et al.*, 2002). Drotar *et al.* (2003) relataram que o EBNA1 pode contribuir na superexpressão de *c-MYC*, particularmente na

translocação cromossômica entre o *locus* do *c-MYC* e o *locus* da cadeia leve ou pesada de imunoglobulina, favorecendo o desenvolvimento de linfoma. Outras funções atribuídas ao EBNA1, incluem ligação à RNAs e regulação do promotor do gene LMP1 (KNECHT *et al.*, 1997; MURRAY e YOUNG, 2001; CHUANG *et al.*, 2002).

1.3.2. EBNA2

O EBNA2 é uma proteína observada no núcleo das células infectadas, que atua como fator transcricional de genes virais e celulares. É codificado pelo gene BYRF1 e apresenta-se sob duas formas alélicas, EBNA2A e EBNA2B, que distinguem os dois subtipos virais: EBV tipo 1 e 2 (RAAB-TRAUB, 2002). O EBNA2A é constituído de 483 aminoácidos, enquanto que, o EBNA2B contém 455 aminoácidos. Ambas são essenciais para a imortalização de linfócitos-B infectados. Contudo, o EBNA2B demonstra uma capacidade reduzida quando comparada a EBNA2A (RICKINSON *et al.*, 1987).

O EBNA2 e o EBNA-LP são as primeiras proteínas virais a serem detectadas na infecção de linfócitos-B primários. Juntas, induzem a expressão de ciclina D2, um marcador da fase G1 do ciclo celular, promovendo a transição da fase G0 para G1 em linfócitos-B em repouso (SINCLAIR *et al.*, 1994). O EBNA2 transativa os genes *CD21*, *CD23* (marcadores de ativação linfocítica), *c-fgr* (codificador de uma proteína-quinase, membro da família src) e o proto-oncogene *c-MYC*, um evento que provavelmente contribui para a proliferação de linfócitos-B (YOUNG *et al.*, 2000; MURRAY, 2001; DOLCETTI e MASUCCI, 2003). Não obstante, o EBNA2 também transativa a LMP1, LMP2A e se liga ao promotor Cp (KNECHT *et al.*, 1997; RAAB-TRAUB, 2002). Uma das evidências mais expressivas da relevância do EBNA2 na transformação celular, provém da incapacidade da cepa P3HR-1, que apresenta deleção do gene do EBNA2 e dos últimos dois exons do EBNA-LP, de induzir transformação de linfócitos B *in vitro* (BAUMFORTH *et al.*, 1999).

O EBNA2 pode transativar genes através da combinação com um fator transcricional, chamado de RBP-Jκ (também conhecido como CBF-1). Este fator está envolvido na via de sinalização Notch, relacionada com a determinação do destino celular (CLUDTS, 1998), a qual tem sido associada ao desenvolvimento de linfomas de células T em humanos (YOUNG *et al.*, 2000). Dessa forma, o EBNA2 compartilha homologia funcional com o componente Notch1 IC, por transativar genes ao se ligar a RBP-Jκ (DOLCETTI e MASUCCI, 2003).

1.3.3. Família EBNA3

Essa família é constituída por três proteínas: EBNA3A, -3B (também denominada EBNA4) e -3C (EBNA6) (ALLDAY e FARREL, 1994; CHU, 1999). Tem sido demonstrado que as proteínas EBNA3A e -3C são fundamentais na transformação de linfócitos B *in vitro*, enquanto que, a participação do EBNA3B parece ser dispensável (BAUMFORTH *et al.*, 1999). O EBNA3C pode induzir a expressão de genes virais (LMP1) e celulares (CD21) e suprimir o promotor Cp (MURRAY e YOUNG, 2001). Pode também se ligar a pRb (proteína do retinoblastoma) liberando os fatores de transcrição E2F, responsáveis pela ativação de diversos genes importantes para a progressão do ciclo celular, contribuindo dessa forma, na transformação celular (PARKER *et al.*, 1996).

Além da interação EBNA3C-pRb, foi verificado que as três proteínas dessa família são capazes de se ligar à RBP-Jκ, impedindo sua interação com outras proteínas e o DNA, suprimindo assim, a expressão de genes mediada pela via Notch ou através do EBNA2 (CLUPTS, 1998; YOUNG *et al.*, 2000; DOLCETTI e MASUCCI, 2003). Destarte, as proteínas EBNA2 e a família EBNA3 devem atuar no balanço da atividade do RBP-Jκ. Adicionalmente, as proteínas EBNA3 devem promover um mecanismo de *feedback* negativo ao impedir os efeitos mediados pelo EBNA2. Ao passo que esta última, não irá ativar o promotor Cp, resultando na inibição da expressão das próprias proteínas EBNA3 (CLUPTS, 1998).

1.3.4. EBNA-LP

O EBNA-LP (também conhecido como EBNA5), é codificado pela seqüência líder do longo transcrito viral que dá origem aos EBNA's, sendo por essa razão denominado LP (*leader protein*). O tamanho dessa proteína é variável, dependendo do número de repetições do fragmento BamHI-W de cada isolado viral (MURRAY e YOUNG, 2001). Tem sido demonstrado que a sua expressão parece ser prescindível na transformação de células B *in vitro*, sendo, no entanto, importante na proliferação de linhagens celulares linfoblastóides (LCL) (YOUNG *et al.*, 2000). Ademais, estudos bioquímicos *in vitro* verificaram que o EBNA-LP liga-se às proteínas pRb e p53 (SZEKELY *et al.*, 1993). Contudo, diferente de expressos de outros vírus, tais como as proteínas E1 do adenovírus, não se observam alterações nas vias de sinalização de ambas oncoproteínas celulares.

1.3.5. LMP1

A proteína LMP1 é codificada pelo gene BNLF1, sendo o único dentre os genes latentes a ser transcrito para a esquerda, de acordo com o mapa de restrição (figura 1). É

constituída de 386 aminoácidos, apresentando um curto domínio citoplasmático amino-terminal (23 aminoácidos) e um longo domínio citoplasmático carboxi-terminal (200 aminoácidos), intercalados por seis domínios transmembranais (YOUNG *et al.*, 1999). A porção extracelular da LMP1 é insignificante, contudo, o primeiro *loop* da molécula na porção extracelular do primeiro segmento transmembrana contém o epítipo reconhecido por células T citotóxicas (KNECHT, 1997). Análises da seqüência do gene revelaram a ocorrência de uma deleção de 30pb entre os nucleotídeos 168256-168285, que codifica uma região próxima à extremidade carboxi-terminal. Tem sido sugerido que as cepas que apresentam essa deleção exercem um potencial oncogênico mais elevado. Além disso, foi verificado que a deleção ocorre freqüentemente em cepas de EBV-1 (CHEN *et al.*, 1996; HIGA, 2002; HIGA, 2003; KNECHT, 1997).

O domínio carboxi-terminal da LMP1 apresenta uma homologia funcional com receptores da família do fator de necrose tumoral (TNFR), tal como o CD40, que interagem com moléculas transdutoras de sinais, chamadas de fatores associados a receptores de TNF (TRAF) (NIEDOBITEK, 2000). Esses fatores compreendem uma família de proteínas (TRAF1-6), que se ligam em regiões específicas dos TNFR, que contenham seqüências de aminoácidos Prolina-x-Glicina-x-Treonina (PxQxT [x, representa qualquer aminoácido]) (THORLEY-LAWSON, 2001). Na LMP1, esses fatores (especialmente o TRAF2) se ligam às regiões C-terminal de ativação (CTAR) 1 e 2, as quais contém seqüências PxQxT (figura 2). Essa ligação determina a ativação do Fator Nuclear- κ B (NF- κ B), possivelmente através da ativação da NIK (NF- κ B-inducing kinase) que promove a fosforilação e subsequente degradação proteolítica do inibidor I κ -B α , liberando o NF- κ B para migrar até o núcleo, onde atua como fator transcricional (HERRERO *et al.*, 1995; YOUNG *et al.*, 1999). A região CTAR2 é responsável pela maior parte do NF- κ B ativado pela LMP1, sendo a CTAR1 responsável por cerca de 20-30% (BAUMFORTH *et al.*, 1999). Todavia, a ativação do NF- κ B através da CTAR2 é mediada essencialmente pela interação com o TRADD (do inglês, *TNF-Receptor Associated Death Domain*), seguida da interação com o TRAF2 (MURRAY e YOUNG, 2001). Normalmente, a proteína TRADD está envolvida em sinais de morte celular, mas no caso da LMP-1 isso não é verificado.

Do ponto de vista funcional, existem algumas diferenças entre a LMP1 e o receptor CD40: (1) a interação com TRAF6, não é observada na proteína viral; (2) associação do CD40 (e outros membros da família TNFR) com os TRAFs é mediada através da interação com ligantes específicos na porção extracelular do receptor, enquanto que, a LMP1 é constitutivamente ativada independente de ligante, sendo essa ativação atribuída à agregação de LMP1 na membrana plasmática (YOUNG *et al.*, 1999; THORLEY-LAWSON, 2001).

A LMP1 está associada a pelo menos outras três vias de sinalização independentes, que juntas contribuem no desenvolvimento dos efeitos atribuídos à presença da proteína viral em questão. Essas vias incluem a ativação de STATs (do inglês, *Signal Transducers and Activators of Transcription*), através da interação da JAK3 (do inglês, *Janus-activated kinase 3*) com uma seqüência rica em prolina situada entre as regiões CTAR1 e CTAR2 (BAUMFORTH *et al.*, 1999). Inclui também, a ativação do AP-1 (do inglês, *Activator Protein 1*) através da interação da JNK (do inglês, *c-Jun N-terminal Kinase*, também conhecida como proteino-quinase ativada por estresse – SAPK) com o TRAF2 na CTAR2 (ELIOPOULOS *et al.*, 1999a). Por fim, a via da proteino-quinase ativada pelo mitógeno p38 (p38/MAPK), mediada pela interação do TRAF2 com as regiões CTAR1 e 2. Essa última via de sinalização está relacionada com a indução da secreção de IL-6 e IL-8 (ELIOPOULOS *et al.*, 1999b).

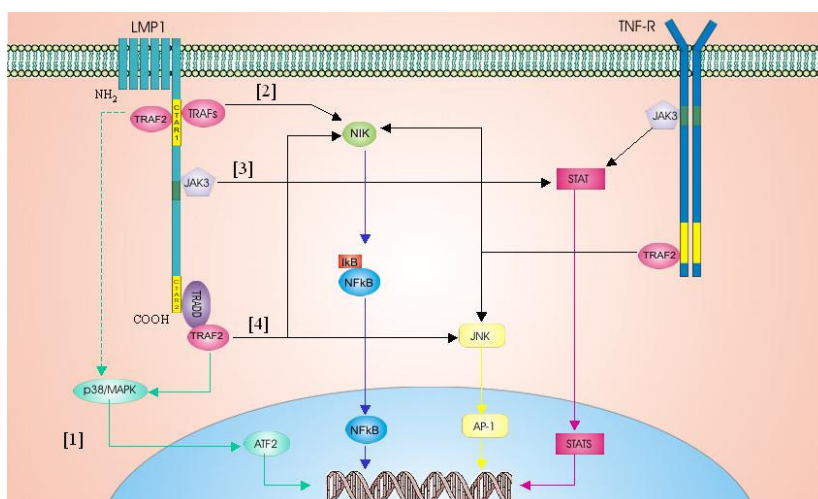


FIGURA 2 - Representação esquemática da estrutura da LMP1 e as vias de sinalização envolvidas. [1] Ativação da via p38/MAPK, mediada pela ligação do TRAF2 diretamente na região CTAR1 (ativação fraca) ou indiretamente na CTAR2, através do TRADD (ativação forte). [2] Ativação do NF-κB, através do recrutamento de NIK induzido pelos TRAFs (especialmente o TRAF2), promovendo a ativação da IKK que fosforila o inibidor IκB, liberando o NF-κB para atuar no núcleo. [3] Ativação de STATs, mediada pela ativação da tirosina-quinase JAK3, que fosforila as moléculas STATs induzindo dimerização e subsequente migração para o núcleo. [4] Ativação da API1 através da via JNK, induzida exclusivamente pelo TRAF2 na região CTAR2. Regiões em amarelo, de ambas as proteínas membranares, apresentam a seqüência PxQxT de aminoácidos. Regiões em verde correspondem a sítios de ancoragem da JAK3. NIK, *NF-κB-inducing kinase*; IKK, *IκB kinase*; MAPK, *mitogen activated protein kinase*. Adaptado de Baumforth *et al.* (1999) e Young *et al.* (2000).

Estudos com linhagens de células B demonstram que a LMP1 induz a expressão de: moléculas de adesão ICAM-1 (CD54), LFA1 (CD11a), LFA3 (CD58); receptor de transferrina (CD71); marcadores de ativação linfocítica CD21, CD23; receptor CD40; e

indução de proteínas anti-apoptóticas, tais com BCL-2, Mcl-1 e A20 (BAUMFORTH *et al.*, 1999; YOUNG *et al.*, 2000; MURRAY e YOUNG, 2001; DOLCETTI e MASUCCI, 2003). Rowe *et al.* (1994) verificaram que a regulação positiva de BCL-2 ocorria apenas em linhagens de células B. No entanto, a expressão de BCL-2 tem sido observada após a expressão das moléculas supracitadas, sugerindo que sua regulação seja dependente da expressão prévia desses mediadores (KNECTH, 1997). Já nas células epiteliais, estudos demonstraram que a LMP1 induz expressão de CD40, CD54, IL-6, IL-8, A20 e reduz a expressão de citoqueratinas e E-caderina, além de bloquear a diferenciação celular (KNECHT, 1997; YOUNG *et al.*, 1999; NIEDOBITEK, 2000; RAAB-TRAUB, 2002). A LMP1 induz também a expressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), através de uma via de sinalização induzida por TRAFs, independente da ativação do NF- κ B (MILLER *et al.*, 1997). O conjunto de efeitos induzidos pela LMP1, tais como a ativação de fatores transcricionais (NF- κ B, AP-1, STATs e ATF2) e outras moléculas, possivelmente promove a transformação das células hospedeiras, conduzindo-as a um fenótipo tumoral.

1.3.6. LMP2

A LMP2 é codificada por seqüências localizadas em ambas as extremidades do genoma viral (ver figura 1), sendo transcrita a partir de dois promotores distintos, originando duas proteínas: LMP2A e LMP2B. Ambas as proteínas exibem uma estrutura peptídica semelhante, apresentando domínio citoplasmático C-terminal, 12 domínios transmembrana e um discreto domínio extracelular, diferindo apenas no domínio citoplasmático N-terminal de 119 aminoácidos adicionais, presente na LMP2A (YOUNG *et al.*, 2000). As duas proteínas se organizam na membrana plasmática das células hospedeiras, formando agregados (BAUMFORTH *et al.*, 1999).

Tem sido reportado que nenhuma das duas proteínas é essencial para a transformação de linfócitos B (LONGNECKER, 2000). Contudo, a expressão de LMP2A em células B de memória circulantes, infectadas pelo EBV, sugere que a LMP2A exerça importante papel nessa infecção viral persistente. Assim como a LMP1, a LMP2 atua como um receptor independente de ligante. Tem sido demonstrado que a domínio N-terminal da LMP2A apresenta oito resíduos de tirosina, dois dos quais (Y74 e Y85) formam um imuno-receptor semelhante aos encontrados nas cadeias α e β dos receptores de célula B (BCR), chamados de ITAM (do inglês, *Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*) (THORLEY-LAWSON, 2001).

A ativação de BCR leva a fosforilação dos resíduos de tirosina, presentes neste receptor, pela Lyn e o recrutamento de Syc tirosino-quinase (ambos, membros da família Src

de tirosino-quinases), desencadeando uma cascata de sinalização, que promovem a diferenciação e proliferação de linfócitos B (DOLCETTI e MASUCCI, 2003). Contrariamente, a LMP2A seqüestra e degrada Lyn e Syk, inibindo a sinalização do BCR e subsequente ativação dessas células, esse efeito inibe ainda, a fosforilação da fosfolipase C, bloqueando a mobilização normal de cálcio (figura 3) (KIEFF, 1996). Esse conjunto de efeitos impede o desenvolvimento do ciclo lítico, promovendo a permanência do estado latente viral (RAAD-TRAUB, 2002; MURRAY e YOUNG, 2001). Quanto a LMP2B, tem sido sugerido que esta atue aumentando o espaçamento entre as LMP2A nos aglomerados transmembranais, favorecendo a liberação das tirosino-quinases (Lyn e Syk) e restaurando a transdução de sinais de BCRs (BAUMFORTH *et al.*, 1999). Adicionalmente, na ausência de antígenos, os BCRs transmitem sinais não proliferativos, que são essenciais para a sobrevivência das células B. Tem sido sugerido que a LMP2A mimetize esse tipo de sinalização, podendo prolongar a sobrevivência de células B infectadas (THORLEY-LAWSON, 2001).

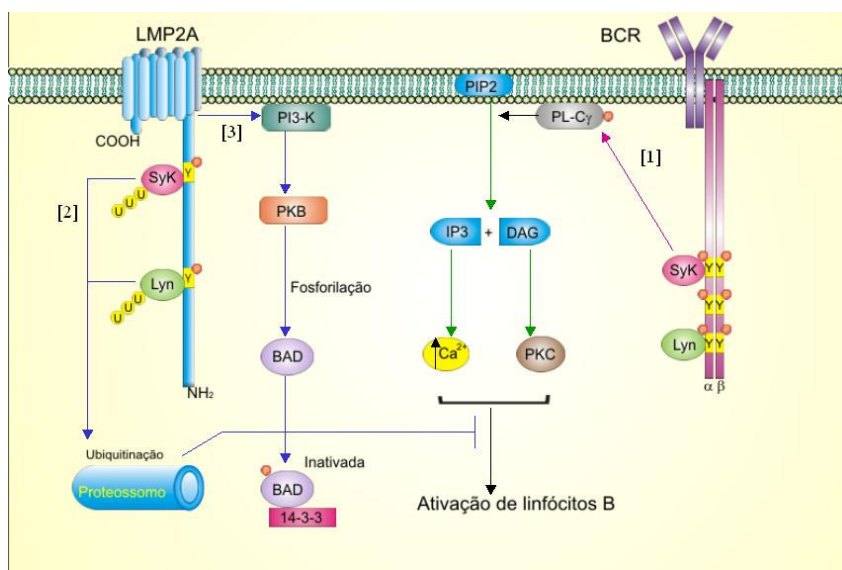


FIGURA 3 - Representação esquemática da estrutura da LMP2A e as vias de sinalização envolvidas. [1] Ativação da fosfolipase $C\gamma$ (PL- $C\gamma$), mediada por tirosino-quinases Syk recrutadas pelos imunorreceptores ITAM, promove a clivagem do bifosfato de fosfatidilinositol (PIP2), produzindo trifosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG), que desencadeiam vias bioquímicas distintas resultando na elevação de cálcio citosólico e na ativação da proteína-quinase C (PKC), que favorecem a ativação de linfócitos B. [2] Recrutamento de Lyn e Syk pela LMP2A e subsequente indução de ubiquitinação das mesmas, culminando na inibição da ativação de linfócitos B. [3] Inativação da proteína Bad, através da ativação da PI-3K pela LMP2A, que por conseguinte, ativa a proteína-quinase B (PKB) levando a fosforilação da proteína Bad e a combinação com a proteína citosólica 14-3-3, que a mantém inativa. Regiões em amarelo em ambas proteínas membranares representam seqüências ricas em tirosina. U, ubiquitina; Y, tirosina; ITAM, *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*; PI-3K, *phosphatidylinositol 3-kinase*. Adaptado de Thorley-Lawson (2000).

Tem sido demonstrado que a LMP2A pode promover a transformação de células epiteliais, sendo possivelmente decorrente da ativação da via PI3-K/AKT (DOLCETTI e MASUCCI, 2003). A ativação da AKT (também conhecida como proteino-quinase B - PKB) leva a fosforilação de várias proteínas, dentre elas a Bad (pró-apoptótica), contribuindo para a sobrevivência celular (ALBERTS *et al.*, 2004).

1.3.7. EBERs

Como mencionado anteriormente, os EBERs constituem dois transcritos virais (EBER1 e EBER2), codificados por seqüências presentes na região BamHI-N do genoma viral e separadas por 161pb. Ambos são transcritos pela RNA-polimerase III para a direita, de acordo com o mapa de restrição do genoma viral (YOUNG *et al.*, 2000). O EBER1 e EBER2 possuem respectivamente 167 e 172 nucleotídeos de extensão e apresentam elevada similaridade entre suas estruturas secundárias (figura 4). Esses dois RNAs virais são abundantemente expressos nos quatro tipos de latência descritos, atingindo a ordem de 10^6 transcritos por célula. Ambos apresentam uma taxa de transcrição equivalente, mas devido ao rápido “turnover” do EBER2, os níveis de EBER1 são cerca de 10 vezes mais elevados (TAKADA e NANBO, 2001). Curiosamente, os EBERs não são poli-adenilados, o que impede a saída destes do núcleo da célula hospedeira, tornando-os um excelente alvo de detecção por hibridação *in situ*, considerando também a alta taxa de expressão.

No núcleo, os EBERs permanecem em complexos ribonucleoprotéicos. Foi demonstrado, que a proteína ribossomal L22 (outrora denominada, *EBER associated protein* – EAP) liga-se ao EBER1, sugerindo que essa interação contribua para transformação celular, pelo fato do gene da L22 estar envolvido nas translocações cromosômicas em pacientes com leucemia (TOCZYSKI e STREITZ, 1991). Os EBERs também se ligam a proteino-quinase ativada por RNA fita dupla (PKR), uma quinase que atua inativando o fator de iniciação de síntese protéica eIF-2, em função de estímulos antivirais de interferon (IFN) α e β . Normalmente, esses efeitos variam desde inibição temporária da síntese protéica da célula hospedeira até apoptose (SHARP *et al.*, 1993; ALBERTS *et al.*, 2004).

A inserção dos genes EBERs em linhagens de células Akata (de linfoma de Burkitt) EBV-negativas, revelaram que os mesmos são responsáveis pela restituição da tumorigenicidade em camundongos SCID, pelo crescimento em *soft agar* (agar semi-sólido), pela resistência a estímulos apoptóticos e pelo aumento na expressão de BCL-2 (KOMANO *et al.*, 1999). Tem sido demonstrado que os EBERs podem induzir a expressão de interleucina-10 (IL-10) em linhagens de linfoma de Burkitt, sugerindo que os referidos transcritos virais possam promover uma supressão do sistema imune do hospedeiro mediada por IL-10. Niller

et al. (2003), demonstraram uma região 130pb logo acima do gene viral EBER1, contendo uma seqüência consenso para a ligação da proteína c-MYC.

Assim, baseado nos dados acima, os EBERs devem contribuir na tumorigênese e certamente para o quadro de latência, considerando que são expressos nos quatro tipos de latência descritos (ver tabela 1) e suprimidos durante a replicação viral (RAAB-TRAUB, 2002).

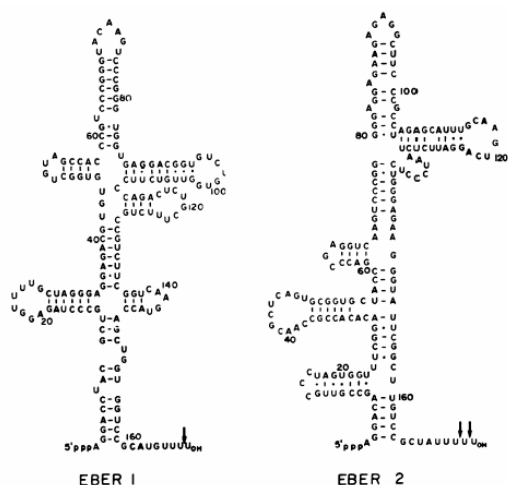


FIGURA 4 - Representação esquemática das possíveis estruturas secundárias dos EBERs. Retirado de Takada e Nanbo (2001).

1.3.8. BARF1

Como o próprio nome sugere, o BARF1 é um gene localizado no fragmento *Bam*HI-A, que codifica uma proteína de 33 kDa. Diferente dos demais genes latentes o BARF1 é descrito como gene latente exclusivamente em neoplasias de origem epitelial, tais como carcinoma de nasofaringe e gástrico, sendo descrito como um gene lítico precoce nas infecções de linfócitos-B (SETO *et al.*, 2005). Foi demonstrado que o produto protéico é um homólogo do receptor do fator estimulador de colônia humano 1 (CSF-1) (STROCKBINE *et al.*, 1998), o qual está relacionado com a indução da proliferação de macrófagos e neutrófilos (ALBERTS *et al.*, 2004). Contudo, tem sido relatado que o BARF1 neutraliza os efeitos proliferativos acima mencionados (SHENG *et al.*, 2003). Tem sido demonstrado que essa proteína imortaliza células epiteliais primárias humanas *in vitro* e induz um fenótipo tumoral em linhagens de fibroblastos (ZUR HAUSEN *et al.*, 2000), sendo também, capaz de ativar a expressão de BCL-2 em fibroblastos de roedores, através de sua região N-terminal (SHENG *et al.*, 2001). Recentemente, Wang *et al.* (2005a) demonstraram uma elevada expressão BCL-2 em linhagens transgênicas de câncer gástrico expressando BARF1, o que reforça os achados prévios quanto à possibilidade dessa proteína viral promover a sobrevivência celular.

1.4. Técnicas de Detecção do EBV

As técnicas utilizadas para demonstrar o EBV em espécimes tumorais e que permitiram analisar a participação do vírus no desenvolvimento das várias neoplasias associadas, incluem: amplificação de seqüências conservadas do genoma viral através de reação em cadeia da polimerase (PCR); RT-PCR (Transcriptase reversa – PCR); hibridação *in situ* (HIS), utilizando sondas complementares tanto à seqüência do genoma viral, quanto a segmentos de RNAm viral; imuno-histoquímica; imunofluorescência; Western blotting; e Southern blot (RAAB-TRAUB *et al.*, 1991; TSUCHIYA, 2002; AMBINDER e MANN, 1994; SUGAWARA *et al.*, 1999).

É importante ressaltar, que a hibridação *in situ* utilizando sondas específicas para os EBERs é considerada “padrão ouro” na detecção de EBV, pois o alvo da técnica é expresso em elevada quantidade e em diversos tecidos. Além disso, permite ao investigador identificar quais células abrigam o EBV no contexto histopatológico ou mesmo citopatológico. O que não é possível utilizando outras técnicas, tais como PCR ou RT-PCR, que segundo Gulley (2001), podem amplificar seqüências nucleotídicas oriundas de outras células, tais como linfócitos infectados infiltrados no tecido.

A técnica de Southern blot é empregada essencialmente para avaliar a clonalidade do EBV encontrado nas neoplasias, a presença de infecção lítica ou a ocorrência de integração do genoma viral ao genoma da célula hospedeira (AMBINDER e MANN, 1994; LEE *et al.*, 1995). Através dessa técnica o material genético é submetido à ação da enzima de restrição *Bam*HI e após separação eletroforética e transferência para membrana de nylon ou nitrocelulose, o material é então, submetido a hibridação utilizando sonda complementar a uma seqüência adjacente a região TR, localizada nas extremidades do genoma viral. A clonalidade do vírus é constatada através da manutenção do número de repetições de 500pb da região TR. Dentro deste conceito, a verificação de uma única banda maior ou igual a 8,0 Kpb, indica a presença de episômos com mesmo número de TR, sugerindo um padrão monoclonal do genoma viral. Contrariamente, a constatação de bandas maiores que 8,0 Kpb dispostas em escada e separadas por 500pb, apontam para um padrão policlonal (GULLEY, 2001; TSUCHIYA, 2002). Adicionalmente, a demonstração de bandas de cerca de 4,0 Kpb, indica a presença de genoma linear e subseqüentemente infecção lítica, enquanto que, a demonstração de bandas maiores que 12Kpb indica integração do genoma viral (RAAB-TRAUB *et al.*, 1991; AMBINDER e MANN, 1994).

1.5. EBV em Tumores Sólidos

Os relatos da presença do vírus em neoplasias sólidas têm se tornado cada vez mais frequentes. Como já mencionado, o Carcinoma de Nasofaringe (CNF) foi a primeira neoplasia de origem epitelial a ser associada ao EBV. Foi relatada por Wolf *et al.* em 1973 e desde então, tem sido vastamente estudada no mundo. O padrão de latência neste tipo tumoral é bem estabelecido, sendo incluído no tipo II. Virtualmente, todos os casos de CNF indiferenciados (também descrito como do tipo linfoepitelial ou linfoepitelioma) são EBV positivos. Além da elevada frequência de associação, o caráter monoclonal do genoma viral e a presença do vírus em quase todas as células tumorais, são três indícios importantes concernentes à relação causal do referido vírus (RAAB-TRAUB *et al.*, 1991; RAAB-TRAUB, 2002).

O EBV também tem sido descrito em carcinoma linfoepitelial pulmonar, carcinoma oral, carcinoma de glândula salivar, carcinoma de glândula lacrimal, carcinoma intracervical, leiomiossarcomas em pacientes imunossuprimidos, câncer testicular, câncer prostático carcinoma hepatocelular e carcinoma de mama (para revisão, veja LIMA e RABENHORST, 2006). Curiosamente, nestes dois últimos tipos tumorais, alguns estudos verificaram uma característica comum: a presença de EBNA-1 e ausência de EBERs, apontando para a possibilidade do EBV estabelecer uma infecção latente com padrão diferente de todos os quatro padrões estabelecidos. Esse fato denota a complexidade da infecção pelo EBV e o risco de utilizar somente a técnica de HIS-EBER, no rastreamento de novos tecidos infectados.

Além das neoplasias mencionadas acima, tem sido descrito que o EBV possui papel relevante nos tumores gástricos do tipo linfoepitelial e mais recentemente, dentro da complexa via tumorigênica dos adenocarcinomas gástricos, em várias regiões do mundo.

1.6. Câncer Gástrico

1.6.1. Epidemiologia do Câncer Gástrico

O câncer de estômago é atualmente a quarta neoplasia maligna mais frequente e também, a segunda maior causa de morte por câncer no mundo, registrando aproximadamente 934 mil novos casos e 700 mil mortes a cada ano. Cerca de dois terços dos casos são registrados em países em desenvolvimento e segundo a *International Agency for Research on Cancer* - IARC, o Japão detém a maior incidência de câncer de estômago no mundo, com índice de 44,1 por 100 mil habitantes, seguido da China, Europa Oriental e América do Sul (figura 6) (PARKIN *et al.*, 2005). Estudos realizados nos Estados Unidos (EUA) revelaram índices mais elevados em homens negros (STADTLÄNDER *et al.*, 1999).

O câncer gástrico acomete duas vezes mais homens que mulheres, demonstrando frequência progressivamente maior em idades avançadas (para ambos os sexos) (CÉSAR *et*

al., 2002; VERDECCHIA *et al.*, 2004). O prognóstico deste tipo tumoral é ruim, com uma média de sobrevivência após 5 anos de 28% e 18%, respectivamente em países desenvolvidos e em desenvolvimento (INCA, 2004). No Brasil, de acordo com os dados do Instituto Nacional do Câncer – INCA, o câncer gástrico é o sexto tumor maligno mais frequente no país, sendo estimado para o ano de 2005, cerca de 23.145 novos casos em todo país, perfazendo uma taxa de 12,57 por 100 mil habitantes. Dentre os estados brasileiros, o Ceará segue em sexto lugar em número de casos, sendo estimado 1.080 novos casos, correspondendo a uma taxa de 13,34/100.000, que sobrepuja a incidência geral do país.

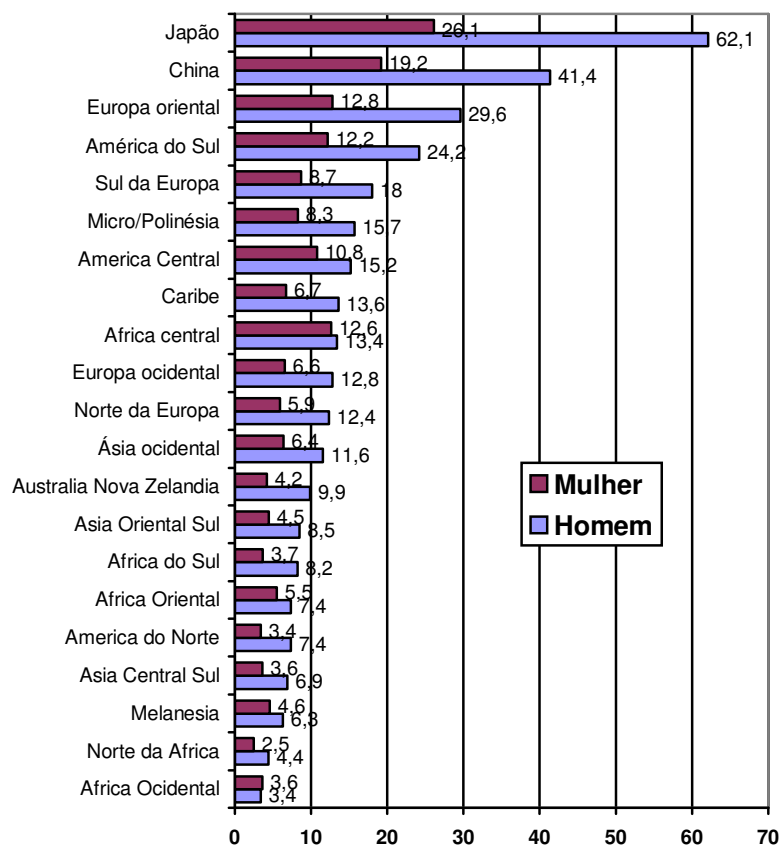


FIGURA 5 - Incidência de Câncer Gástrico em várias regiões do mundo, distribuído quanto ao sexo, 2002.

Fonte: International Agency for Research on Câncer – IARC, 2005.

* Incidência calculada por 100.000 habitantes.

**Regiões estabelecidas pela IARC

1.6.2. Classificações Clínico-Histológicas do Câncer Gástrico

Com base no aspecto macroscópico, de modo geral, os tumores podem ser classificados em quatro tipos distintos: polipóide e vegetante (Borrmann I); lesão ulcerada com bordas elevadas (Borrmann II); lesão ulcerada infiltrando a parede gástrica (Borrmann

III); lesões difusamente infiltrativas, também denominada “linite plástica” (Borrmann IV); tumor não-classificável (Borrmann V) (BORRMANN, 1926; ESPEJO e NAVARRETE, 2003). Atualmente, essa classificação é descrita utilizando números arábicos. No que se refere à localização anatômica do tumor, cerca de 50 a 60 % são observados no piloro e antro, 25% na cárdia e os demais no corpo e fundo (figura 7) (COTRAN, 2000).

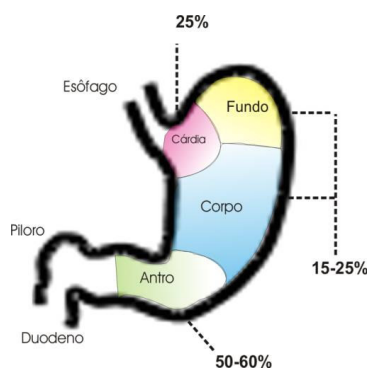


FIGURA 6 – Regiões anatômicas do estômago e a frequência de tumores correspondentes (COTRAN, 2000).

Quanto ao aspecto histopatológico, dentre os tumores malignos do estômago, o adenocarcinoma, que tem origem epitelial, é o mais frequente, correspondendo a cerca de 90 a 95% do total, logo em seguida verificam-se os linfomas com cerca de 4 a 5%. Os demais tipos incluem tumores gástricos de células neuroendócrinas (carcinóides) e tumores de origem mesenquimal, tais como leiomiossarcoma e tumores estromais gastro-intestinais – GIST (do inglês, *Gastrointestinal stromal tumors*) (COTRAN, 2000). Existe ainda, uma variante pouco frequente do adenocarcinoma, apresentando um proeminente infiltrado linfocitário, sendo denominado de “adenocarcinoma do tipo linfo-epitelial”, com padrão histológico muito semelhante ao carcinoma de nasofaringe indiferenciado (WATANABE *et al.*, 1976; OSATO e IMAI, 1996; TSUCHIYA, 2002). Assim como outras neoplasias, os adenocarcinomas gástricos podem ser classificados quanto ao grau de diferenciação, isto é, quanto ao nível de semelhança morfológica com as células normais maduras do tecido de origem, que inclui as seguintes designações: (1) indiferenciado ou anaplásico; (2) pouco diferenciado; (3) moderadamente diferenciado; e (4) bem diferenciado (COTRAN, 2000).

Devido à diversidade de arranjos histológicos, diferentes classificações baseadas em morfologias foram propostas para os adenocarcinomas gástricos, dentre elas destacam-se as classificações da Organização Mundial de Saúde – OMS e a de Låuren (1965), sendo esta última a mais utilizada no ocidente. De acordo com a OMS, os adenocarcinomas são classificados em cinco subtipos histológicos: Papilar, Tubular, Anel-de-Sinete, Indiferenciado

e Mucinoso (ESPEJO e NAVARRETE, 2003). Já Làuren (1965), dividiu-os em dois subtipos: o (1) tipo intestinal, que compreendem tumores diferenciados, com células apresentando núcleos grandes e irregulares, as quais ainda apresentam coesão celular a ponto de permitir a formação de estruturas tubulares do tipo glandular semelhantes às do adeocarcinoma de cólon, exibindo ainda, um padrão de crescimento expansivo; e o (2) tipo difuso, que em geral, incluem tumores pouco diferenciados, constituído 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”, de modo geral, demonstrando um padrão de crescimento infiltrativo. Pode ser observado com menos freqüência, uma forma intermediária denominada de “padrão misto” (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 ao *H. pylori*. Quanto ao tipo difuso, diferente do anterior, se origina sem a presença de lesões pré-neoplásicas (CÉSAR *et al.*, 2002). Em geral, apresenta uma evolução clínica mais agressiva, podendo prosseguir para metástase precoce (STADTLÄNDER *et al.*, 1999; COTRAN *et al.*, 2000; WERNER *et al.*, 2001).

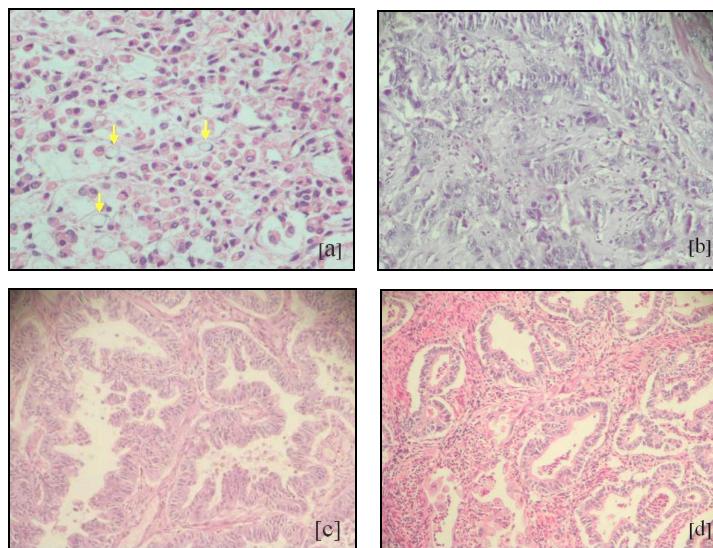


FIGURA 7 – Histopatologia dos adenocarcinomas gástricos do tipo difuso [a, b] e intestinal [c, d] (HE, 400X). [a] Caso nº 40 – Adenocarcinoma do tipo difuso pouco diferenciado: apresenta células pequenas difusamente dispersas, algumas em “anel-de-sinete” (setas amarelas). [b] Caso nº 18 – Adenocarcinoma do tipo difuso indiferenciado. [c] Caso nº 37 – Adenocarcinoma do tipo intestinal moderadamente diferenciado: nota-se a presença de estruturas papilares. [d] Caso nº 27 – Adenocarcinoma do tipo intestinal moderadamente diferenciado: verifica-se uma arquitetura tumoral esboçando arranjos tubulares, infiltrando a camada muscular.

O estadiamento tumoral pode ser clínico ou patológico. O primeiro é realizado com base na extensão do tumor, que é estabelecida através de exame físico auxiliado por exames radiográficos, endoscópicos e histológicos. O patológico é efetuado pela avaliação macro e microscópica do espécime clínico proveniente de ressecção cirúrgica, visando analisar a profundidade da invasão do tumor na parede gástrica, possível acometimento de estruturas adjacentes, presença de linfonodos comprometidos e a presença de metástase a distância, sendo definido pela classificação “pTNM” (tabela 2). Por conseguinte, o estadiamento tumoral é estabelecido com base no resultado do pTNM (tabela 3) (AJCC, 2002) e é diretamente relacionado ao prognóstico.

Tabela 2: Definição do TNM patológico

Tumor Primário (pT)	
TX	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Sem evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor invade a lâmina própria ou submucosa
T2	Tumor invade a muscular própria ou subserosa
T2a	Tumor invade a muscular própria
T2b	Tumor invade subserosa
T3	Tumor invade a serosa sem invadir estruturas adjacentes
T4	Tumor invade estruturas adjacentes
Linfonodos Regionais (pN)	
NX	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Sem metástase para linfonodos regionais
N1	Metástase em 1 a 6 linfonodos regionais
N2	Metástase em 7 a 15 linfonodos regionais
N3	Metástase em mais de 15 linfonodos regionais
Metástase à distância (pM)	
MX	Presença de metástase a distância não pode ser avaliada
M1	Sem metástase à distância
M2	Com metástase à distância

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

Tabela 3: Agrupamento por Estadiamento

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

Retirado de *Cancer Staging Handbook* (AJCC, 2002).

1.6.3. Etiologia do Câncer Gástrico

Os fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de estômago incluem o elevado consumo de sal e de alimentos em conserva contendo compostos nitrogenados, o baixo consumo de frutas e vegetais, cirurgia gástrica e lesões benignas prévias. O fumo também é aceito como fator de risco (CÉSAR *et al.*, 2002; CORREA, 2003). A história familiar tem peso relevante já que o risco entre os membros de uma família com um caso de câncer gástrico é 2 a 3 vezes maior quando comparado à população em geral. Estudos relacionando o tipo sangüíneo demonstraram que os indivíduos do tipo sangüíneo “A” são mais freqüentemente associados ao câncer gástrico (STADTLÄNDER *et al.*, 1999).

Não obstante, a infecção pela bactéria *Helicobacter pylori* é considerada um dos principais fatores associados à etiologia do câncer gástrico, sendo desde 1994, considerado pela IARC como um agente carcinogênico do grupo I (STADTLÄNDER *et al.*, 1999; NIEDOBITEK, 1999). A associação do vírus Epstein-Barr com tumores gástrico vem sendo demonstrada desde a última década e as várias evidências da participação do EBV no desenvolvimento desta neoplasia levou a IARC a também considerá-lo, em 1997, como agente carcinogênico do grupo I.

1.6.4. EBV & Adenocarcinoma Gástrico

O primeiro estudo a demonstrar a presença do EBV em carcinoma gástrico foi conduzido por Burke *et al.* (1990), que utilizando a técnica de PCR obtiveram positividade em um caso diagnosticado como adenocarcinoma do tipo-linfoepitelial. No ano seguinte, Min *et al.* (1991) relataram positividade em mais três casos com a mesma histologia. Contudo, não

se podia afirmar até então, quais células albergavam o vírus. Neste mesmo ano, Shibata *et al.* (1991) confirmaram a presença do EBV em células tumorais utilizando técnica de hibridação *in situ*. Estudos que se seguiram revelaram um elevado percentual (77,8 a 100%) de associação nesses tumores (PITTALUGA *et al.*, 1992; ROWLANDS *et al.*, 1993; ODA *et al.*, 1993; NAKAMURA *et al.*, 1994; MATSUNOU *et al.*, 1996). Posteriormente, Shibata e Weiss (1992), utilizando as técnicas de PCR, hibridação *in situ* para o DNA viral e para o RNA viral EBER1, demonstraram o EBV em quase todas as células tumorais de 22/138 (16%) casos de adenocarcinoma, provenientes dos Estados Unidos. Nesse estudo, o vírus também foi observado em células de epitélio displásico e ausente em células da mucosa normal, linfócitos infiltrados e lesões não-neoplásicas, tais como metaplasia intestinal e gastrite atrófica. No ano seguinte, Tokunaga *et al.* (1993a) analisaram uma elevada quantidade de casos oriundos do Japão, obtendo positividade em 67/999 (6,9%), o que aumentou o interesse na associação EBV-carcinoma gástrico. Seguidamente, diversos estudos foram conduzidos e diferente do tipo-linfoepitelial, o adenocarcinoma apresentou um percentual menor de associação com o EBV, variando de 1,3 a 19,3% conforme a região mundial estudada (figura 9). Sendo estimado anualmente, mais de 50 mil casos de carcinoma gástrico EBV-positivos (TAKADA, 2000).

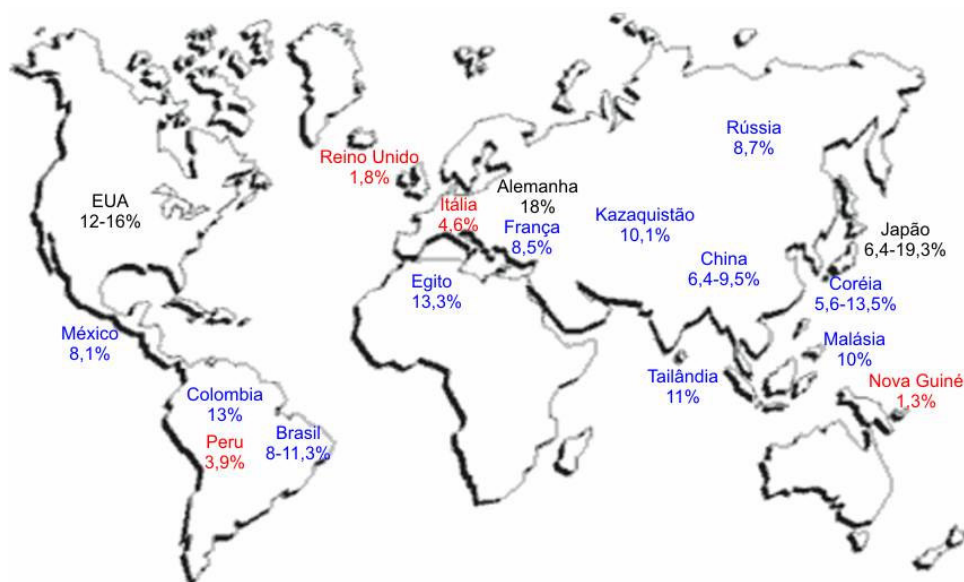


FIGURA 8 – Incidências de EBV em adenocarcinoma gástrico verificadas em estudos de diversas partes do mundo.

De acordo com diversos estudos, os casos de carcinoma gástrico EBV-positivos são predominantes em homens (SHIBATA e WEISS, 1992; TOKUNAGA *et al.*, 1993a; HARN *et al.*, 1995; GALETSKY *et al.*, 1997; ODA *et al.*, 2003). Quanto ao sítio anatômico, apesar

da elevada incidência de tumores antrais, a associação com o vírus é mais freqüente em tumores localizados nas regiões da cárdia e corpo (SHIBATA e WEISS, 1992; TOKUNAGA *et al.*, 1993b; OSATO e IMAI, 1996; GALETSKY *et al.*, 1997; TAKADA, 2000; ODA *et al.*, 2003; KIJIMA *et al.*, 2003; CARRASCAL *et al.*, 2003).

No que diz respeito à associação do EBV aos padrões histológicos, parece não haver uma diferença significativa quanto aos tipos intestinal e difuso (SHIBATA e WEISS, 1992; TOKUNAGA *et al.*, 1993a; TAKADA, 2000; CARRASCAL *et al.*, 2003; KORIYAMA *et al.*, 2004). Contudo, quanto ao grau de diferenciação, é relatada uma maior freqüência em tumores pouco e moderadamente diferenciados (LEONCINI *et al.*, 1993; GALETSKY *et al.*, 1997; TAKANO *et al.*, 1999; LEE *et al.*, 2004).

Ainda não está totalmente esclarecida a via de infecção das células do epitélio gástrico. Osato e Imai (1996) sugerem a possibilidade de infecção do epitélio gástrico por vírus livres presentes na saliva deglutida, podendo estes, perderem a infectividade devido à fragilidade estrutural por serem envelopados, o que explicaria a menor freqüência do EBV em tumores gástricos distais e ausência em tumores intestinais (YUEN, *et al.*, 1994; CHO *et al.*, 2001; MOREWAYA *et al.*, 2004). Além da possibilidade de infecção direta por vírus livres, outros autores propõem uma via de infecção mediada por linfócitos B, através de um mecanismo de transmissão célula-a-célula. Estudos envolvendo cultura de células de vários carcinomas, incluindo o gástrico, têm revelado a possibilidade de transmissão através desse mecanismo (IMAI *et al.*, 1998; TAKADA, 2000). Não obstante, sabe-se que as células epiteliais gástricas são desprovidas de receptores CD21, sendo sugerido a existência de outro receptor que viabilize a penetração viral (YOSHIYAMA *et al.*, 1997). De acordo com alguns estudos, o EBV é detectado em linfócitos infiltrados em vários casos de carcinoma gástrico, sustentando a hipótese supracitada (TOKUNAGA *et al.*, 1993a; FUKAYAMA *et al.*, 1994; YUEN *et al.*, 1994; SELVES *et al.*, 1996; ODA *et al.*, 2003). Contudo, alguns autores têm demonstrado linfócitos infectados em carcinomas EBV-negativos de várias partes do trato gastrointestinal (esôfago, ampola de Vater e cólon), as quais estariam similarmente expostas aos linfócitos, mas apenas carcinomas gástricos foram positivos (YUEN *et al.*, 1994; CHO *et al.*, 2001; MOREWAYA *et al.*, 2004). De acordo com alguns trabalhos, o EBV também pode ser verificado em células displásicas, levando Yuen *et al.* (1994), a sugerirem que a infecção ocorra durante a fase displásica e que esse evento favoreça a transformação celular.

Inicialmente, acreditava-se que o padrão de expressão viral em carcinoma gástrico fosse semelhante ao observado em carcinoma de nasofaringe EBV-positivo (Latência II), devido à origem epitelial de ambas as neoplasias. Entretanto, SUGIURA *et al.* (1996) demonstraram através da técnica de RT-PCR, a expressão de RNAm de EBNA1, de

transcritos da região BamHI-A e de EBERs nos sete casos analisados e de RNAm de LMP2A em três dos sete casos, mas não verificaram a expressão de RNAm de LMP1 e de LMP2B em todos os casos estudados. Outros autores já haviam relatado, à nível proteômico, a ausência de LMP1 e outros membros da família EBNA em carcinomas gástricos EBV-positivos (ROWLANDS *et al.*, 1993; FUKAYAMA *et al.*, 1994; OTT *et al.*, 1994; HARN *et al.*, 1995; SHIN *et al.*, 1996; SELVES *et al.*, 1996). Devido à estreita relação com o padrão de genes latentes virais expressos no linfoma de Burkitt, com exceção da expressão de LMP2A, o adenocarcinoma gástrico foi enquadrado no padrão de latência do tipo I (tabela 1).

1.6.5. Papel do EBV na Oncogênese Gástrica

Dentre os diversos estudos, parece existir um consenso quanto à presença do EBV em quase todas as células tumorais, constatada através da extensa marcação obtida por hibridação *in situ* (TOKUNAGA *et al.*, 1993b; OTT *et al.*, 1994; SHIN *et al.*, 1996; TAKADA, 2000; CHO *et al.*, 2001; KIJIMA *et al.*, 2003; ODA *et al.*, 2003; LOPES *et al.*, 2004; YOSHIWARA *et al.*, 2005). Takada (2000), vai além e afirma que 100% das células tumorais são EBV-positivas. Somado a esse fato, a demonstração da monoclonalidade do genoma viral, reforça a hipótese da participação viral no processo de transformação tumoral, sugerindo que a infecção viral tenha precedido o processo tumorigênico e que as células tumorais tenham se originado a partir da proliferação clonal de uma célula primária infectada (IMAI *et al.*, 1994; OTT *et al.*, 1994; FUKAYAMA *et al.*, 1994; HARN *et al.*, 1995; GULLEY *et al.*, 1996). Outra evidência nesse sentido, refere-se a presença do EBV tanto no sítio primário quanto em células neoplásicas metastáticas (SHIBATA e WEISS, 1992; YUEN *et al.*, 1994; KIJIMA *et al.*, 2003; LOPES *et al.*, 2004).

Apesar dos diversos estudos conduzidos atualmente, concernentes à associação do EBV ao carcinoma gástrico, os mecanismos moleculares envolvidos na carcinogênese induzida pelo vírus ainda não estão esclarecidos. Alguns estudos têm associado a presença do EBV, com a elevada frequência de metilação de regiões promotoras de genes reguladores do ciclo celular (*p14*, *p15* e *p16*), genes de reparo e proteção do DNA (*GSTPi*, *MGMT*), genes de adesão celular (*E-caderina*) e de apoptose (*DAPK*) (KANG *et al.*, 2002; OSAWA *et al.*, 2002; CHONG *et al.*, 2002; SUDO *et al.*, 2004). Paradoxalmente, Chong *et al.* (2003), demonstraram uma elevada frequência de metilação dos genes mencionados, associada à supressão da expressão de DNA metiltransferases (enzima celular responsável pela metilação), sugerindo uma via alternativa do vírus para metilação desses genes.

Foi demonstrado que, linhagens de carcinoma gástrico infectadas por EBV apresentam um perfil de expressão semelhante ao observado *in vivo*, demonstrando uma

proliferação acelerada e um fenótipo maligno (TAKADA, 2000). Estes achados, corroboram as sugestões apontadas nos primeiros estudos quanto ao papel do EBV na gênese do tumor gástrico.

Recentemente, foi demonstrado através da técnica de RT-PCR, a expressão BHRF1 em casos de carcinoma gástrico EBV-positivos. O BHRF1 é um expresso lítico precoce homólogo à BCL-2, todavia, é possível que o mesmo tenha sido expresso por outras células, que não as tumorais (LUO *et al.*, 2005). No entanto, se o BHRF1 realmente for expresso por células neoplásicas, esse evento poderia favorecer o processo tumoral, além de configurar um novo gene latente em linhagens epiteliais.

Acredita-se que os expressos latentes virais sejam os elementos centrais no complexo processo de transformação celular. Como mencionado previamente, o EBV é capaz de immortalizar linfócitos B primários e que as oncoproteínas virais LMP1 e EBNA2 têm papel essencial nesse processo. Porém, as mesmas não são expressas no carcinoma gástrico, gerando uma dúvida quanto ao papel tumorigênico do vírus nesse tipo tumoral. Por outro lado, o EBNA1 deve desempenhar um importante papel, considerando a sua expressão em três tipos de latência (I, II, III), seus efeitos immortalizantes sobre linfócitos B de camundongos transgênicos e seu mecanismo de escape do sistema de imuno-vigilância. Tem sido sugerido ainda, que o EBNA1 possa favorecer o aumento da expressão do oncogene *c-MYC* (AMBINDER e MANN, 1994; DROTAR *et al.*, 2003). Ademais, a BARF1 (também expresso em carcinoma gástrico), que exerce efeitos immortalizantes em células epiteliais *in vitro*, está associada com a expressão de BCL-2, podendo indicar uma via alternativa na oncogênese de carcinomas gástricos, já que a LMP1 não é expressa (ZUR HAUSEN *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2005a). A proteína LMP2A também deve contribuir, visto que está relacionada com a sobrevivência celular. Por fim, os EBERs estão associados, entre outros efeitos, a um aumento na expressão de BCL-2, adicionalmente, o EBER1 é possivelmente transativado pela oncoproteína *c-MYC* (KOMANO *et al.*, 1999; NILLER *et al.*, 2003).

Esses dados sugerem uma via tumorigênica do EBV, onde uma superexpressão do gene *c-MYC*, induzida ou não pelo EBNA1, promoveria a expressão de EBER1, o qual por sua vez induziria, em conjunto com o BARF1, a expressão de BCL-2 que atuaria inibindo a apoptose propiciando um efeito sinérgico entre as oncoproteínas *c-MYC* e BCL-2, impelindo as células à um fenótipo tumoral (figura 9).

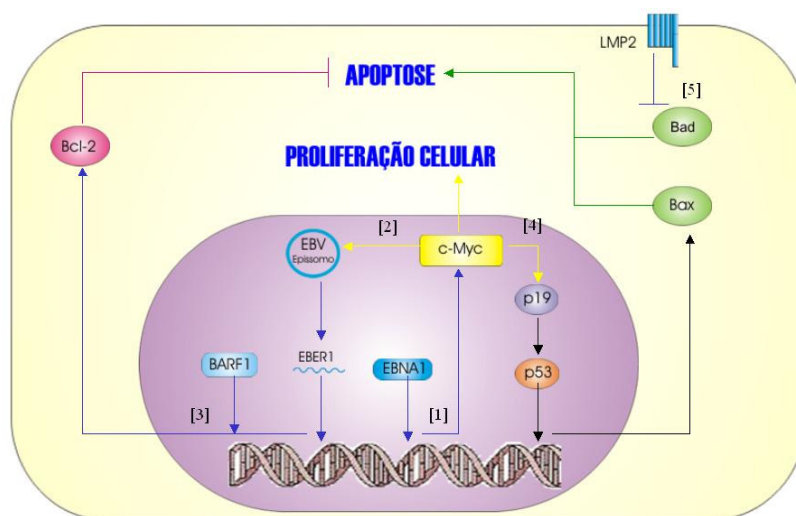


FIGURA 9 - Representação esquemática de possíveis vias tumorigênicas do EBV em carcinoma gástrico. [1] Expressão de c-MYC induzida pela proteína viral EBNA1 ou por outro estímulo, pode promover [2] a transativação de EBER1 que possivelmente induz, em cooperação com a BARF1, [3] a expressão de BCL-2 favorecendo a sobrevivência celular. [4] A c-MYC também induz a expressão da proteína BAX, através da ativação da via p19^{ARF}/p53, resultando em estímulo apoptótico. [5] Inativação da proteína pró-apoptótica Bad pela proteína viral LMP2A.

1.7. Oncoproteínas e Vias de Sinalização Celulares Relacionadas ao EBV

1.7.1. Família BCL-2

A extensa família BCL-2 inclui genes codificadores de proteínas celulares e virais, que participam na regulação da morte celular programada (apoptose). As mesmas podem ser agrupadas em: (1) proteínas indutoras de apoptose, tais como Bax, Bak, Bcl-x_S, Bad, Bid, Bik, Hrk, Bim e Bok; e (2) inibidoras, assim como Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Bfl-1, Brag-1, Mcl-1, A1, E1, B19K, LMW5-HL e o BHRF1 [um expresso lítico do EBV]. Essas proteínas compartilham pelo menos um dos quatro domínios altamente conservados (BH1-BH4). Dentre eles, o domínio BH3 parece ser essencial para a função de membros pró-apoptóticos e dispensável para os anti-apoptóticos (ZÖRNIG *et al.*, 2001).

O gene *bax* localizado no *locus* 19q13.3-q13.4, codifica a proteína homônima Bax (de *bcl-2 associated protein X*), que é considerada protótipo das proteínas envolvidas na promoção da apoptose (ANTONSSON e MARTINO, 2000; PATROCÍNIO *et al.*, 2005). A Bax é capaz de formar dímeros, através do domínio BH3, com diversos membros da família Bcl-2 (heterodímeros) ou com proteínas homólogas (homodímeros) (FARIA, 2005). Tem sido sugerido que o destino celular, ou seja, se a célula tende a sobreviver ou a morrer, depende diretamente do balanço entre homodímeros pró-apoptóticos, homodímeros anti-apoptóticos e heterodímeros (COTRAN, 2000).

O gene *bcl-2* localiza-se no cromossomo 18q21, sendo constituído de três exons. Seu produto protéico, a proteína Bcl-2, considerada modelo dos membros anti-apoptóticos, foi demonstrada primeiramente em linfoma folicular de células B (do inglês, *B-cell lymphoma 2*), sendo superexpresso em aproximadamente 85% dos casos, devido a uma translocação cromossômica característica t(14;18)(q32; q21), que insere o *bcl-2* no locus da cadeia pesada da imunoglobulina (KORSMEYER, 1992). A Bcl-2 pode ser encontrada na membrana externa mitocondrial, no retículo endoplasmático e na membrana nuclear (HOCKENBERY *et al.*, 1990; COTRAN, 2000).

Um evento crucial no processo de apoptose é a liberação do citocromo c das mitocôndrias no citoplasma. Esse evento não está totalmente esclarecido, sendo provavelmente mediado pela oligomerização de proteínas Bax, em resposta a estímulos apoptóticos, levando a formação de canais na membrana mitocondrial, fenômeno denominado como MOMP (do inglês, *mitochondrial-outer membrane permeabilization*) (ZÖRNIG *et al.*, 2001). O citocromo c liberado se liga à duas proteínas citoplasmáticas, a APAF-1 (do inglês, *apoptotic protease activating factor 1*) e a procaspase-9, formando um complexo chamado de “apoptossomo”. Na presença de ATP ou ADP, a caspase-9 é ativada (do inglês, *cysteine aspartyl protease 9*), prosseguindo com a ativação proteolítica da cascata de caspases efetoras, incluindo as caspases-2, -3, -6, -7, -8, -10, resultando em apoptose (PELENGARIS *et al.*, 2002). Em contrapartida, a Bcl-2 inibe o fenômeno MOMP, possivelmente pela heterodimerização com membros pró-apoptóticos (FARIA, 2005).

1.7.2. Proto-oncogene c-MYC

O gene *myc* foi inicialmente identificado como *v-myc* (*viral-myc*) em um retrovírus associado com o desenvolvimento de mielocitomatose aviária (do inglês, *myelocytomatosis*) (GRANDORI *et al.* 2000). Posteriormente, o *c-MYC* foi identificado como homólogo celular, sendo sua expressão alterada em diversos tumores humanos e animais (MELKOUMIAN *et al.*, 2002).

O proto-oncogene *c-MYC* é localizado no cromossomo 8q24, sendo constituído de três exons, podendo ser transcrito a partir de três promotores distintos, codificando três isoformas chamadas de Myc-1 (com 67 kDa), Myc-2 (64 kDa) e Myc-3, também denominada Myc-S (do inglês *Short*, por ser a menor das três isoformas). Ulteriormente, dois outros genes homólogos ao *c-MYC* foram demonstrados em cânceres humanos, o *N-MYC*, amplificado em Neuroblastomas e o *L-MYC* em carcinoma pulmonar de pequenas células (do inglês, *Lung*). O conjunto desses genes é genericamente descrito como *família de oncogenes myc* (GARDNER *et al.*, 2002; FARIA e RABENHORST, 2006).

Após sua tradução a proteína c-MYC é rapidamente transportada para o núcleo, onde atua como fator transcricional. Para tanto, a c-MYC necessita heteromerizar com outra proteína constitutivamente expressa, denominada Max. Essa dimerização é viabilizada por seqüências conservadas presentes na região C-terminal de ambas as proteínas, designadas *helix-loop-helix* (HLH) e *leucine zipper* (LZ). Os heterodímeros Myc/Max se ligam em regiões específicas do DNA que contenham a seqüência CACGTG (conhecida como E-box) e ativam a transcrição de promotores adjacentes (AMATI *et al.*, 1998). A proteína Max pode ainda formar homodímeros ou heterodímeros com proteínas da família Mad, suprimindo os efeitos induzidos pelo dímero Myc/Max. Esse efeito é associado à ausência de domínios de transativação (TAD), que contenham *Myc boxes* I e II (MbI e MbII) (MELKOUMIAN *et al.*, 2002). O dímero Myc/Max pode também interagir com várias proteínas, uma delas inclui a TRRAP, que participa da acetilação de histonas, promovendo uma alteração na estrutura da cromatina, permitindo o acesso de fatores transcricionais ao DNA. Em contraste, esse efeito é antagonizado pelo complexo Mad/Max, através do recrutamento de desacetilases de histonas (GARDNER *et al.*, 2002).

A expressão de *c-MYC* em células humanas é extremamente controlada, ocorrendo normalmente durante fases específicas do ciclo celular. Todavia, a expressão desregulada desse gene pode acarretar alterações celulares, promovendo uma transformação neoplásica. Isso fica bem exemplificado em casos de linfoma de Burkitt, onde se observa uma superexpressão do *c-MYC* devido a uma translocação entre os cromossomos 8 e 14, que justapõem o lócus do *c-MYC* sob o controle do promotor da cadeia pesada de imunoglobulina, que é altamente expressa (KLUMB, 2001).

Sabe-se que a expressão desregulada de *c-MYC* pode favorecer a transição da fase G1 para fase S do ciclo celular, mesmo na ausência de estímulos mitóticos. Esse efeito está possivelmente relacionado à indução de ciclinas A, D1, D2, E e CDK4 (quinase ciclina-dependente 4), *cdc25A* (uma fosfatase que ativa CDK2 e CDK4) e a inibição da atividade dos supressores tumorais *p15^{ink4b}*, *p16^{ink4a}*, *p21^{cip1}* e *p27^{Kip1}* (GARDNER *et al.*, 2001; ELENDE e EILERS, 1999; LUTZ *et al.*, 2002; AMATI *et al.*, 1998; MELKOUMIAN *et al.*, 2002). A inibição da atividade do *p27*, deve-se em parte ao seqüestro mediado pelo complexo ciclina E/CDK2 e a indução de Cul-1, que promove a sua degradação (LUTZ *et al.*, 2002).

A proliferação desordenada induzida pela superexpressão de c-MYC, transpondo pontos de checagem do ciclo celular e subseqüentemente a atividade de mecanismos de reparo do DNA, pode culminar em instabilidade genômica, resultando em novas mutações e aberrações numéricas e estruturais cromossômicas (GARDNER *et al.*, 2001).

Estudos têm demonstrado que a c-MYC também está associada ao crescimento celular, metabolismo, inibição de diferenciação, imortalização, angiogênese e apoptose (GRANDORI *et al.* 2000; GARDNER *et al.*, 2001; LUTZ *et al.*, 2002; PELENGARIS *et al.*, 2002). Tem sido sugerido que a transposição dos pontos de checagem induzida pela c-MYC, possa atuar como gatilho no processo apoptótico (HERMEKING e EICK, 1994). Segundo Grandori *et al.* (2000), a c-MYC pode ativar indiretamente a p53 através da indução da expressão do p19^{ARF}, que atuaria reprimindo o MDM-2 um modulador negativo da p53, promovendo a transcrição da proteína Bax. Tem sido demonstrado também, que pode sensibilizar a célula para estímulos apoptóticos providos por receptores CD95 (HUEBER *et al.*, 1997).

Essas evidências sugerem que um possível efeito sinérgico entre a expressão de c-MYC e a inibição da apoptose, poderia contribuir no processo tumorigênico. Essa conjectura fica bem exemplificada em casos de linfoma, onde têm sido verificado que a co-expressão das proteínas BCL-2 e c-MYC pode induzir um rápido desenvolvimento do mesmo, sendo esse sinergismo originado devido a ação efetiva da BCL-2 na supressão da apoptose induzida pela proteína c-MYC, sem interferir nos efeitos proliferativos desta última (ZÖRNIG *et al.*, 2001). Ademais, sinais mediados pelo receptor IGF-1 (do inglês, *Insulin-like growth-factor 1*) e/ou RAS-ativada podem ativar a serina/treonina quinase AKT, que fosforila a proteína Bad, resultando no sequestro e inativação desta, pelas proteínas citoplasmáticas 14-3-3, efeito que também pode inibir a apoptose induzida pela c-MYC (PELENGARIS *et al.*, 2002).

1.8. Perspectivas de Estudos Moleculares

Poucos estudos correlacionam a infecção pelo EBV em carcinomas gástricos com a desregulação de genes celulares envolvidos na tumorigênese (supressores tumorais, oncogenes e/ou genes reguladores da apoptose). De forma que, não se conhece bem os mecanismos virais responsáveis pela transformação tumoral neste tipo neoplásico, denotando a importância de novos estudos visando esclarecer essa vertente, investigando possíveis alterações nas vias de sinalização e processos celulares, permitindo não apenas a compressão da participação do vírus na oncogênese, mas também, abrindo caminho para o desenvolvimento de medidas profiláticas e/ou terapias alvo-direcionadas.

2.Objetivos

2.1. Objetivo Geral

- Verificar a presença do vírus Epstein-Barr (EBV) em adenocarcinomas gástricos, através da técnica de Hibridação *in situ* e PCR, correlacionando com a presença das proteínas celulares c-MYC, BCL-2 e BAX.

2.2. Objetivos Específicos

- Implantar a técnica de Hibridação *in situ* para detecção de EBV no Laboratório de Genética do Departamento de Patologia e Medicina Legal;
- Comparar os resultados das técnicas de Hibridização *in situ* e de PCR;
- Avaliar a associação do vírus Epstein-Barr aos adenocarcinomas gástricos, correlacionando com dados clínicos e histopatológicos;
- Verificar a expressão das proteínas celulares c-MYC, BCL-2 e BAX, demonstradas através da técnica de imunohistoquímica, correlacionando com os dados clínicos e histológicos;
- Correlacionar a presença de EBV com expressão das proteínas c-MYC, BCL-2 e BAX;
- Detectar a frequência da deleção de 30pb no gene da LMP1 dos EBV encontrados nos adenocarcinomas gástricos, correlacionando com os dados clínicos e histológicos.

3. Materiais e Métodos

3.1. Casuística

Foram obtidos tumores gástricos de 100 pacientes submetidos à gastrectomias totais ou parciais nos hospitais: Hospital Universitário Walter Cantídeo (HUWC) e Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza (SCMF). De todos os casos, foram obtidos espécimes clínicos previamente fixados em formalina e subseqüentemente incluídos em bloco de parafina, oriundos dos serviços de patologia dos referidos hospitais. Admitiram-se como critérios de inclusão: (1) diagnóstico de adenocarcinoma (2) a existência de mais de um bloco contendo amostra tumoral; (3) a representatividade de células tumorais no bloco de escolha; e (4) o bom estado de conservação do material. Para tanto, foram realizados cortes histológicos de 5 µm de espessura, corados com Hematoxilina-Eosina (HE), e reavaliados pela patologista da equipe. Somente após esse processo de seleção, os espécimes foram submetidos às técnicas de Hibridação *in situ* e Imuno-histoquímica.

Para a realização da extração de DNA destinado às análises moleculares 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 nitrogênio líquido, até o momento da extração de DNA. Antes de cada extração, foram realizados cortes histológicos de cada fragmento ainda congelado, em micrótomo criostato, com uma espessura de aproximadamente 5 µm, os quais foram corados com Hematoxilina-Eosina para avaliação do percentual de células tumorais. A extração foi realizada apenas quando o fragmento apresentava no mínimo 70% de células tumorais. Devido aos critérios mencionados, dos 100 casos estudados apenas 61 foram extraído DNA.

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 o protocolo nº 199/04 Of. Nº 712/04 (APÊNDICE 2), respeitando, dessa forma,

as recomendações advindas 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 da pesquisa (APÊNDICE 3).

3.3. Instrumentos e Procedimentos de Coleta de Dados

Os dados clínico-patológicos foram registrados em fichas contendo os dados clínico-patológicos obtidos através de entrevista e através de consulta de prontuários (APÊNDICE 4). Os dados histopatológicos tais como subtipo tumoral, grau de diferenciação, profundidade da invasão, acometimento de linfonodos e/ou metástases à distância foram extraídos dos laudos patológicos, presentes nos respectivos prontuários.

3.4. Avaliação Histopatológica

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. Hibridação *in situ*

O método utilizado neste estudo foi adaptado do descrito por Bacchi *et al* (1996). A sonda utilizada, descrita por Shibata *et al* (1991), apresenta uma seqüência oligonucleotídica de 30 pb, biotilada na extremidade 3' (5'-AGACACCGTCCTCACCACCCGGGACTTGTA-3'), complementar ao RNA viral EBER1. De forma sucinta, o método segue os seguintes passos:

1. Cortes histológicos de 5 µm foram fixados em lâminas de vidro devidamente limpas e tratadas com silano a 4%;
2. Passagem das lâminas em estufa pré-aquecida a 65°C, durante 120 minutos;
3. Desparafinação e hidratação em gradiente xileno-álcool-água;
4. Bloqueio da peroxidase endógena, em peróxido de hidrogênio a 3%, por 20 min;
5. Digestão enzimática com proteinase K (concentração final de 0,02µg/µL), por 13 min;
6. Lavagem em água com DEPC 0,1%;
7. Desidratação em gradiente de água-álcool;
8. Incubação com solução de pré-hibridação (Solução de Denhardt [3,5X]; SSC [4,5X]; EDTA [0,0075M]; SDS [0,35%]; DNA desnaturado de esperma de salmão

[75µg/mL]; NaH₂PO₄ [0,75M]; Sulfato de Dextrano [10%]), por 60 min em estufa à 37°C;

9. Incubação com solução de hibridação (Solução de Denhardt [2X]; Formamida [50%]; Sulfato de Dextrano [2%]; NaH₂PO₄ [0,002M]; sonda na concentração de 0,3ng/µL, por 16 horas em estufa à 37°C;
10. Incubação das lâminas com anticorpo anti-biotina (DakoCytomation[®]) (diluição 1:20), por 30 minutos;
11. Incubação com anticorpo anti-imunoglobulina (DakoCytomation[®]) (diluição 1:100), por 45 minutos;
12. Incubação com o complexo estreptoavidina-biotina-peroxidase (DakoCytomation[®]), por 45 minutos;
13. Revelação com o cromógeno DAB líquido (3,3'-diaminobenzidine) (DakoCytomation[®]), preparado conforme recomendações do fabricante;
14. Contra-coloração com Hematoxilina de Harris a 40%;
15. Desidratação em gradiente de água-álcool-xileno;
16. Montagem com lamínulas e Bálsamo do Canadá.

Em cada bateria de reação, foi adicionado como controle-positivo, um caso de carcinoma de nasofaringe indiferenciado sabidamente positivo pelo EBV.

3.6. Hibridação *in situ* com o sistema GenPoint[®]

Para avaliar a sensibilidade da técnica de hibridação *in situ* convencional, vinte e nove casos foram submetidos ao sistema Genpoint[®] (sendo 28 negativos e 1 positivo pelo método anterior). Este é um sistema enzimático que utiliza a biotil tiramida para catalisar a reação amplificando o sinal de marcação. Para a realização da técnica, seguiram-se as recomendações do fabricante. Foi utilizado também, um caso de carcinoma de nasofaringe indiferenciado como controle-positivo.

3.7. Imuno-histoquímica

Realizou-se o método imuno-histoquímico da estreptoavidina-biotina-peroxidase adaptado de Hsu *et al.* (1981), para a detecção das proteínas celulares BCL-2, BAX e c-MYC, conforme descrito a seguir:

1. Cortes histológicos de 5 µm foram fixados em lâminas de vidro devidamente limpas e tratadas com silano a 4%;
2. Passagem das lâminas em estufa pré-aquecida a 65°C, durante 120 minutos;
3. Desparafinação e hidratação em gradiente xileno-álcool-água;

4. Recuperação antigênica em forno de microondas utilizando tampão citrato 10mM pH=6,0 (\pm 99°C), por 15 minutos;
5. Bloqueio da peroxidase endógena, em peróxido de hidrogênio a 3%, por 15 min;
6. Incubação das lâminas com o anticorpo primário (DakoCytomation®) (diluição BCL-2 1:80; BAX 1:300; c-MYC 1:60), em geladeira (4-8°C) por 16 horas;
7. Detecção pelo sistema LSAB+ (DakoCytomation®), seguindo as recomendações do fabricante;
8. Revelação pelo sistema DAB+ (3,3'-diaminobenzidine) (DakoCytomation®), seguindo as recomendações do fabricante;
9. Contra-coloração com Hematoxilina de Harris a 40%;
10. Desidratação em gradiente de água-álcool-xileno;
11. Montagem com lamínulas e Bálsamo do Canadá.

Em cada bateria de imuno-histoquímica, foi incluído um espécime clínico sabidamente positivo para cada proteína, como controle positivo das reações. A escolha do espécime foi realizada seguindo recomendações do fabricante, previamente testados, de forma que: para a oncoproteína BCL-2 utilizou-se um linfonodo reativo; para a BAX um caso de adenocarcinoma de cólon; e para a proteína c-MYC, um caso de linfoma de Burkitt.

3.8. Critérios para Análise das Lâminas

Admitiu-se como marcação a presença de uma coloração marrom característica, adquirida pelo cromógeno após oxidação, situadas nas regiões celulares previstas para cada alvo avaliado (tabela 4) em contraste com o azul/violeta conferido pela hematoxilina, constatada por microscopia óptica.

Tabela 4: Regiões celulares de expressão dos alvos das técnicas empregadas e os respectivos clones dos anticorpos.

Técnica	Alvo	Região celular de expressão	Clone
Hibridação <i>in situ</i>	EBER1	Nuclear	
Imuno-histoquímica	BCL-2	Citoplasmático	clone 124
	BAX	Citoplasmático	policlonal
	c-MYC	Nuclear e Citoplasmático	clone 9E10.3

No caso da hibridação *in situ*, considerou-se positivo qualquer marcação nuclear em células tumorais, independente do percentual de células marcadas.

Quanto a imuno-histoquímica, o índice de marcação LI (do inglês, *Labelling index*), foi estimado através de contagem manual utilizando microscopia óptica (LANDBERG e ROSS, 1993). Foram selecionados campos aleatórios (magnificação de 400X), com representativa quantidade de células tumorais. Um mínimo de 1.000 células foram contadas e o índice de marcação foi calculado com base na seguinte fórmula:

$$LI = (\text{Total de células marcadas}) / (\text{Total de células contadas}) \times 100$$

Foi definido como critério de positividade a existência de um mínimo de 5% de células tumorais marcadas ($LI \geq 5$).

A intensidade de marcação também foi avaliada, calculada com base no trabalho de McCarty *et al.* (1985): admitiu-se os valores: 0 (ausência de marcação), 1+ (fraca), 2+ (moderada), 3+ (intensa), com base na intensidade observada. Estes valores configuram índices aos quais foram multiplicados os valores percentuais (%) da fração de células que representam a respectiva categoria de intensidade, sendo calculado o *H-Score*, seguindo a fórmula descrita abaixo:

$$H = (\% 0) * 0 + (\% 1+) * 1 + (\% 2+) * 2 + (\% 3+) * 3$$

Nas reações de hibridação *in situ* e imuno-histoquímica, foram avaliados ainda, os perfis de marcação no tecido tumoral, considerando como: (1) marcação focal, a constatação de ilha(s) de células tumorais marcadas; ou (2) marcação difusa, a constatação de células tumorais marcadas dispersas em todo o tecido analisado.

3.9. Extração do DNA de Espécimes Congelados

DNA genômico de alto peso molecular foi obtido dos tecidos tumorais previamente analisados, através da técnica de extração com uso do detergente CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide), adaptado do protocolo descrito por Foster e Twell (1996), conforme apresentado a seguir:

1. Fragmentos de aproximadamente 0,5g, foram macerados com auxílio de bastão de vidro esterilizado, em tubo Falcon de 15mL;
2. Após a maceração foi adicionado tampão de extração (2% CTAB, 1,4M de NaCl, 20mM EDTA, 100mM Tris-HCl pH 8,0 , 0,2% 2-Mercaptoetanol), na proporção de 6mL para cada 0,5g e incubado sob agitação à temperatura ambiente, por 16 horas;

3. Para purificação, foi adicionado clorofórmio-álcool isoamílico (24/1) e centrifugado a 2000 rpm por 15 min;
4. A fase superior foi transferida para tubo estéril de 15mL e o DNA foi precipitado com isopropanol à 100%, centrifugado a 2000rpm por 5 min;
5. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuscitado com NaCl 1M, para liberação do complexo DNA-CTAB;
6. O DNA foi precipitado com etanol 100% gelado e centrifugado a 2000 rpm por 5 minutos;
7. O sedimento foi lavado com etanol 70% e colocado para secar à 37°C;
8. Depois de seco, o DNA foi ressuscitado com água Milli-Q estéril com DEPC 0,1% e armazenado em freezer à -14°C;

Para avaliar a qualidade o DNA, cada amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, verificado sob transiluminador de luz ultravioleta.

3.10. Reação da Polimerase em Cadeia (PCR)

3.10.1. Detecção do EBV

A presença de EBV nas amostras estudadas foi detectada pela amplificação por PCR de uma região do gene que codifica a proteína EBNA1, com os oligonucleotídeos iniciadores *sense* 5'- GTC ATC ATC ATC CGG GTC TC -3' e *anti sense* 5'- TTC GGG TTG GAA CCT CCT TG -3' (TELENTI *et al*, 1990). A extensão esperada para o produto desta reação foi 269 pb. Em 25 µL, a mistura para PCR era composta por: tampão de PCR 1x (Tris-HCl 20 mM [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 MgCl₂, 0,4 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e 100 ng de DNA. A mistura foi submetida a uma desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos (desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 01 minuto, extensão a 72°C por 2 minutos) e extensão final a 72°C por 7 minutos.

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 células da linhagem *Daudi* EBV-positiva (de linfoma de Burkitt).

3.10.2. Deleção de 30pb do gene da LMP1

A ocorrência de deleção, nas amostras EBV positivas, foi analisada através de amplificação por PCR, de uma região do gene viral LMP1, com os oligonucleotídeos

iniciadores que flanqueiam o local característico da deleção, previamente descritos por Lee *et al.* (2004): 5' - CGG AAG AGG TTG AAA ACA AA - 3' e 5' - GTG GGG GTC GTC ATC ATC TC - 3'. A mistura para PCR, foi preparada igualmente a da detecção do EBV, diferindo apenas nas condições de amplificação, que ocorreu sob desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguido de 50 ciclos (desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 61°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto) e extensão final a 72°C por 7 minutos, como descrito por Takano *et al.* (1999). O produto de amplificação comum apresenta 161pb de extensão, enquanto àquele com a deleção, apresenta 131pb. A visualização dos produtos também foi realizada em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio sob transluminador de luz ultravioleta.

3.11. Análise Estatística

Os dados clínico-patológicos, assim como os resultados das técnicas de hibridação *in situ*, imuno-histoquímica e PCR, foram demonstrados através de gráficos e tabelas como auxílio do programa Microsoft Excel[®] 2000. A correlação das variáveis observadas foi realizada através do programa estatístico EPINFO[®] versão 6.04d e SPSS[®] 12.0, utilizando-se o Teste do Qui-quadrado (χ^2), Teste Exato de Fisher, Teste de Mann-Whitney, Correlação Linear de Spearman e o Índice de Concordância Kappa (κ). Foram considerados estatisticamente significantes, valores de $p < 0,05$.

3.12. Programas Computacionais

Microsoft Excel 2000 (Microsoft[®], EUA)

Microsoft Word 2000 (Microsoft[®], EUA)

EPINFO 6.04d (CDC[®], EUA)

SPSS 12.0 (SPSS[®], EUA)

Corel Draw 11 (Corel[®], EUA)

4. Resultados

4.1. Análise Clínico-Epidemiológica

A procedência dos 100 casos de adenocarcinoma gástrico utilizados neste estudo, foi predominantemente do município de Fortaleza (46%), enquanto os demais eram provenientes de municípios da região metropolitana de Fortaleza e do interior do Estado (figura 10), destacando-se os municípios de Caucaia, Maracanaú e Aracati com 5 (5%), 4 (4%) e 3 (3%) casos, respectivamente. A respeito da atividade profissional dos pacientes, não foi possível a obtenção desse dado em dez dos cem casos investigados, mesmo assim, verificou-se que a amostra era constituída predominantemente de agricultores (26/90 [28,9%]) e indivíduos aposentados (22,2%), seguido das seguintes atividades: do lar e pedreiro com 15 (16,7%) e 5 (5,6%), respectivamente. Apenas um indivíduo (1,1%), apresentava nível superior completo.

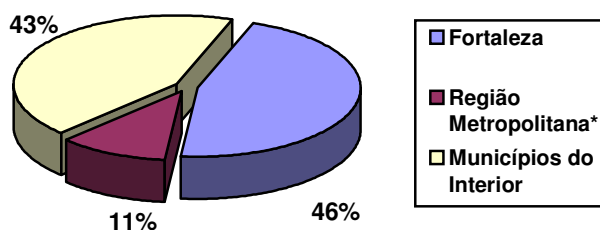


FIGURA 10 – Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos segundo a procedência dos pacientes (n=100).

*Região definida pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).

Quanto à distribuição por sexo, 67 (67%) pacientes pertenciam ao sexo masculino e 33 (33%) ao sexo feminino (figura 11), perfazendo uma razão masculino/feminino de 2,03. 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 nossa amostra. A média de idade foi de 61,2, variando entre 23 e 90 anos. Não foram registrados casos pertencentes ao intervalo 0-14 anos. Verificou-se que 46% dos pacientes possuíam idade superior a 64 anos e apenas 9,0% eram adultos jovens (idade variando de 23 a 44 anos). Observou-se ainda, uma nítida correlação entre a elevação progressiva da idade e do número de casos nos indivíduos do sexo masculino, alcançando valores mais elevados por volta dos 70 anos de idade (figura 12). Os indivíduos do sexo masculino acima de 65 anos representaram 35% do total de casos estudados, quanto ao sexo feminino houve um equilíbrio entre as três últimas faixas etárias. No que diz respeito à cor da pele, 75 (75%) indivíduos eram pardos (figura 13), sendo que destes 51 (76,1%) eram do sexo

masculino ($p=0,029$). Os indivíduos brancos e negros representaram 17% e 8%, respectivamente.

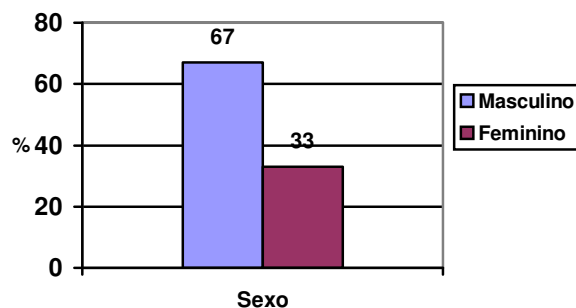


FIGURA 11 – Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto ao sexo dos pacientes (n=100).

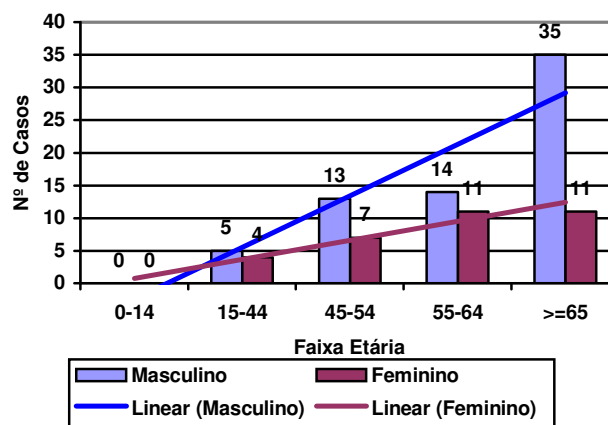


FIGURA 12 – Número de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos segundo o sexo e faixa etária dos pacientes (n=100). Faixa etária padronizada pela IARC.

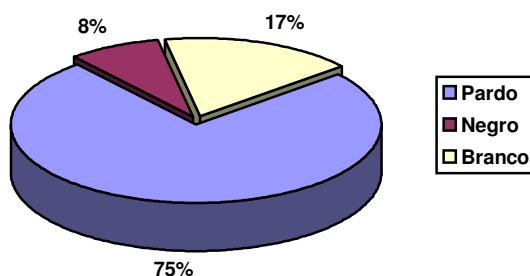


FIGURA 13 – Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto à cor dos pacientes (n=100).

Em 57 casos foi possível obter o tipo sanguíneo, sendo constatado que os tipos A+ e O+ foram os mais frequentes, correspondendo respectivamente a 45,6% e 40,4% (figura 14). Nota-se ainda, que apenas 7,1% dos casos possuíam fator Rh negativo.

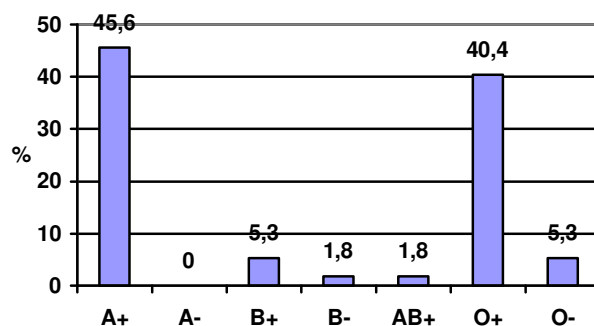


FIGURA 14 – Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto ao tipo sanguíneo dos pacientes (n=57).

Dentre os casos os quais foi possível obter dados acerca dos fatores de risco para o desenvolvimento de câncer, verificou-se que 32/86 (37,2%) pacientes apresentavam história familiar de algum tipo de câncer em parentes de até segundo grau (figura 15). Enquanto que, 62/89 (69,7%) eram tabagistas por mais de 15 anos, destacando-se o sexo masculino com 67,7% dos casos. Com relação ao consumo de bebidas alcoólicas, 49/88 (55,7%) foram definidos como etilistas, dos quais 85,7% eram homens ($p < 0,001$). Constatou-se ainda que, 11 pacientes apresentavam os três fatores concomitantemente, sendo que 10 (90,9%) destes, eram homens com média de idade de 63,9 anos. Em contrapartida, 13 indivíduos não apresentavam nenhum dos fatores risco relacionados, não havendo diferenças entre os sexos, sendo a média geral de idade desse grupo de 58 anos.

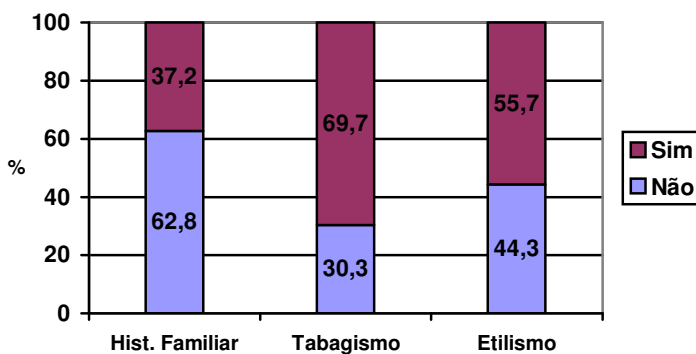


FIGURA 15 – Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto à presença de fatores de risco (história familiar de câncer [n=86], tabagismo [n=89] e etilismo [88]).

Quanto à localização anatômica dos tumores, pouco mais da metade situavam-se na região do antro (54%), sendo que as regiões da cárdia e corpo apresentaram percentuais equivalentes de casos (figura 16). Dentre os casos os quais foi possível obter a classificação de Borrmann, 50/85 (58,8%) apresentaram tumores com aspecto macroscópico ulcerado e infiltrativo, sendo classificado como Borrmann tipo III.

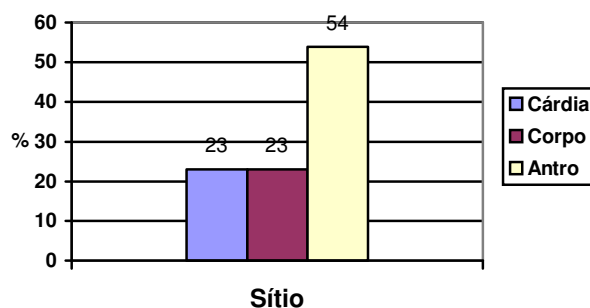


FIGURA 16 – Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto à localização anatômica dos tumores (n=100).

4.2. Análise Histopatológica

A análise histopatológica dos tumores não revelou diferença estatística entre os tipos intestinal e difuso, embora tenha sido observado uma maior frequência no tipo intestinal (59%). Em relação à faixa etária, houve um notável aumento do número de tumores do tipo intestinal em função da idade ($p=0,0064$), notadamente na faixa mais avançada, enquanto que, o tipo difuso se apresentou de forma similar em praticamente todas as faixas etárias, mas se sobrepôs ao tipo intestinal no grupo mais jovem (15-44 anos) (figura 17).

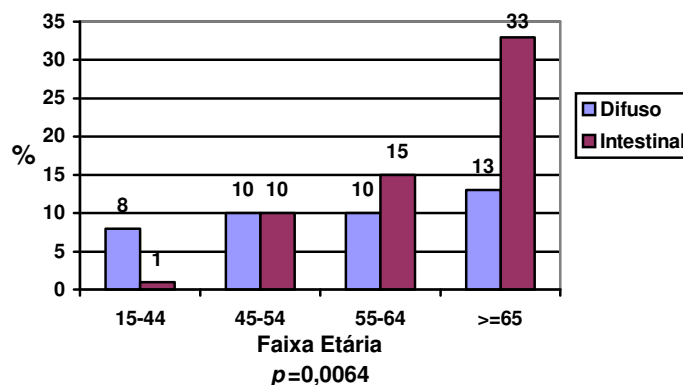


FIGURA 17 – Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos segundo a classificação de Låuren e a faixa etária dos pacientes (n=100).

Embora não tenha sido estatisticamente significante, verificou-se uma maior frequência dos tumores do tipo intestinal com o sexo masculino (44/59 [74,6%]), sendo que destes, 26 casos apresentaram idades acima de 65 anos. Quanto ao tipo difuso, 23/41 (56,1%) casos acometeram homens e 18/41 (43,9%) acometeram mulheres.

A tabela 5 relaciona os dados referentes à profundidade de invasão, acometimento de linfonodos periféricos e metástases, dos tumores estudados. Observa-se por esta tabela, que em mais da metade dos casos (55%), a neoplasia invade a serosa (pT3) e em 13% invade estruturas adjacentes (pT4). Em 21% dos casos houve a presença de metástase à distância (M).

Tabela 5 – Casos de carcinoma gástrico estudados distribuídos segundo a definição da profundidade da invasão tumoral (pT), comprometimento de linfonodos regionais (pN) e presença de metástases à distância (pM) (n=100).

INVASÃO (pT)		LINFONODOS (pN)		METÁSTASE (pM)				
	Nº de casos	%		Nº de casos	%		Nº de casos	%
T1	3	3,0	N0	26	26,0	M0	79	79,0
T2	29	29,0	N1	45	45,0	M1	21	21,0
T3	55	55,0	N2	23	23,0			
T4	13	13,0	N3	6	6,0			
Total	100	100,0	Total	100	100,0	Total	100	100,0

Quanto ao estadiamento (figura 18), nota-se um aumento progressivo de casos em função do estadiamento, à exceção do estadiamento IIIB que demonstrou um inesperado percentual inferior. No geral, houve um predomínio dos tumores de estadiamentos mais avançados. Houve uma importante elevação do número de tumores do tipo intestinal no estadiamento IIIA, correspondendo a uma razão intestinal/difuso de 2,12. A relação entre faixa etária e estadiamento, embora não tenha sido constatada diferença estatisticamente significante ($p=0,414$), demonstrou que os indivíduos com idades variando entre 15-44 anos, apresentaram tumores predominantemente avançados (figura 19). A correlação do estadiamento tumoral com fatores de riscos demonstrou significância apenas para o tabagismo ($p=0,028$), apresentando elevada associação com tumores mais malignos.

Quanto ao grau de diferenciação, quase todos os casos foram definidos como pouco ou moderadamente diferenciados (figura 20).

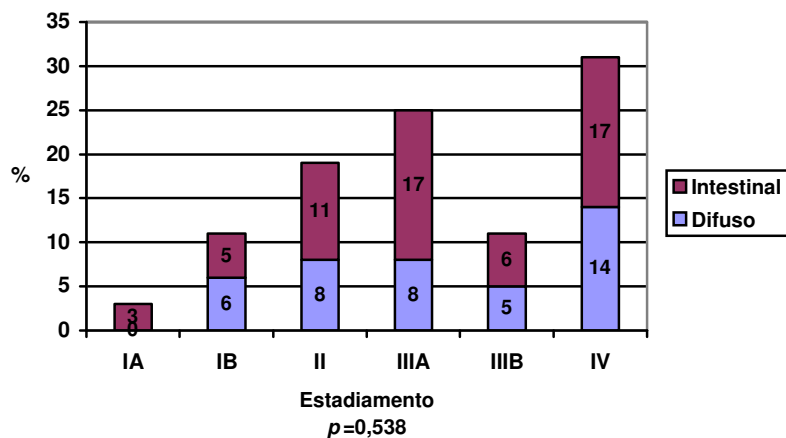


FIGURA 18 – Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto ao estadiamento tumoral e a classificação de Lãuren (n=100).

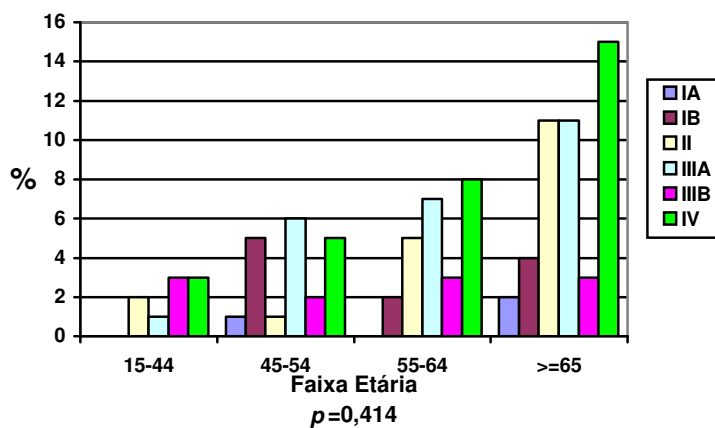


FIGURA 19 – Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto ao estadiamento tumoral e a faixa etária dos pacientes (n=100).

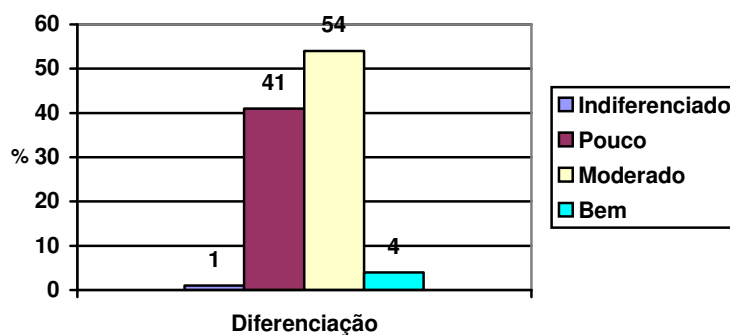


FIGURA 20 – Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto ao grau de diferenciação dos tumores (n=100).

4.3. Análise Imuno-Histoquímica

A análise da expressão das proteínas celulares BCL-2, BAX e c-MYC nuclear e citoplasmática através da técnica de imuno-histoquímica, revelou um baixo percentual de casos positivos (positividade) para BCL-2 (5%), os quais com baixíssimas médias de escores (LI e H-score). Em contrapartida, mais da metade dos casos foram positivos para BAX (53%), apresentando médias de escores mais elevadas. Quanto à proteína c-MYC presente nos núcleos de células tumorais, os resultados foram similares àqueles obtidos para proteína BAX, com 43% de casos positivos. Já a marcação citoplasmática da c-MYC demonstrou índices mais baixos, aproximadamente metade dos valores verificados na expressão nuclear da mesma (figura 21).

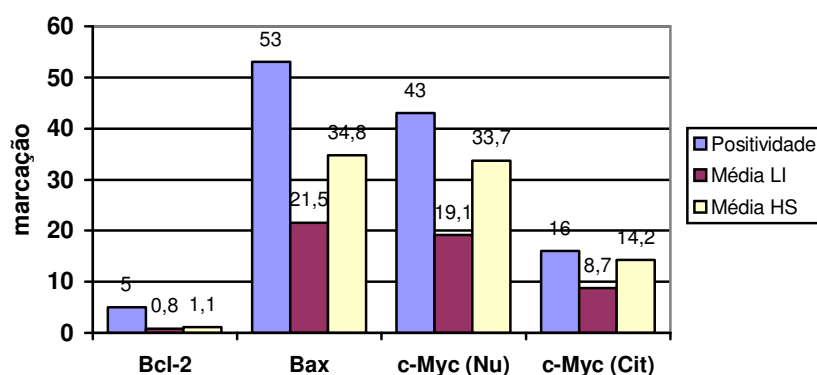


FIGURA 21 – Percentual de casos positivos (positividade) e média dos escores de LI e H-score, referentes à expressão das oncoproteínas BCL-2, BAX, c-MYC (nuclear e citoplasmático).

A detecção imuno-histoquímica das proteínas supracitadas é retratada na figura 22. No que se refere ao padrão de marcação imuno-histoquímica, isto é, a característica da distribuição das células tumorais imuno-positivas no tecido analisado, constatou-se que as proteínas BAX e c-MYC (nuclear e citoplasmática) apresentaram marcação predominantemente difusa, enquanto que a BCL-2, apresentou um percentual menor de casos com marcação difusa (44,4%) (figura 23).

A correlação entre expressão destas proteínas e a localização anatômica dos tumores, revelou números mais elevados para as proteínas BAX e c-MYC (nuclear e citoplasmática) no antro gástrico. Todavia, estes achados refletem a distribuição global dos casos estudados (figura 16), indicando, portanto, que houve uma distribuição equivalente entre os três sítios anatômicos. Entretanto, no caso da BCL-2, pôde-se verificar um percentual de positividade mais elevado na cárdia, equiparando-se à positividade do antro gástrico (figura 24).

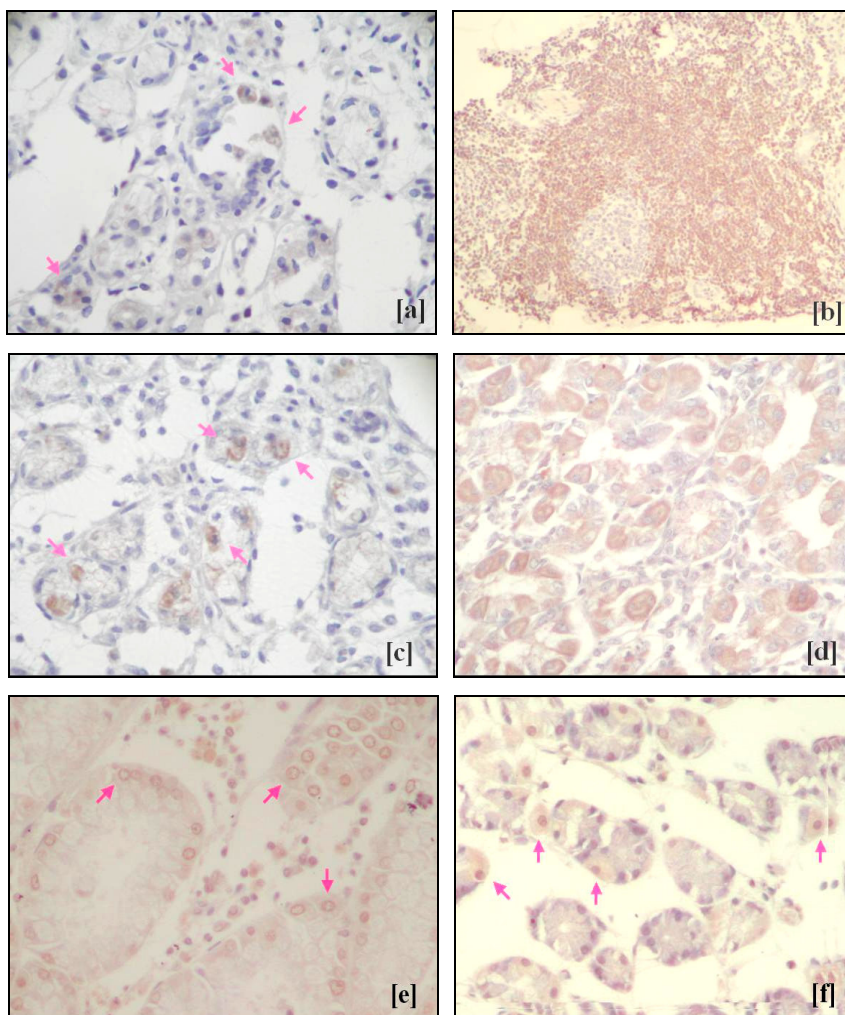


FIGURA 22 – Expressão das oncoproteínas celulares BCL-2 [a, b], BAX [c, d] e c-MYC [e, f] detectada através da técnica de imuno-histoquímica (400X). [a] Caso nº 16 – Adenocarcinoma do tipo difuso pouco diferenciado: [a] marcação citoplasmática moderada para BCL-2 (setas); [b] Caso nº 31 – Folículo linfóide intensamente marcado para BCL-2; [c] Caso nº 16 - marcação citoplasmática intensa e moderada para BAX (setas); [d] Caso nº 35 – Adenocarcinoma do tipo difuso pouco diferenciado: marcação intensa e difusa para BAX; [e] Caso nº 59 – Adenocarcinoma do tipo intestinal moderadamente diferenciado: marcação nuclear moderada para c-MYC (setas); [f] Caso nº 33 – Adenocarcinoma do tipo intestinal moderadamente diferenciado: marcação citoplasmática e nuclear concomitante para c-MYC (setas).

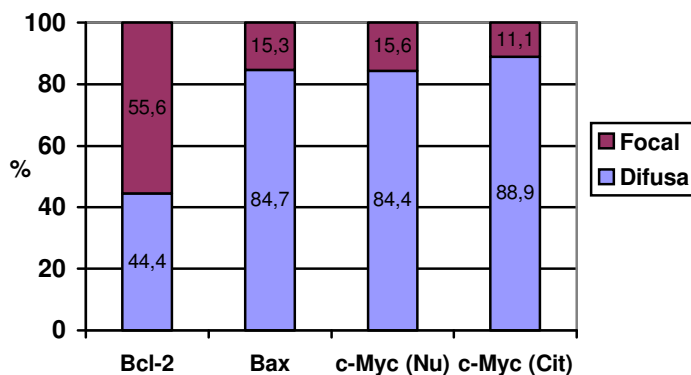


FIGURA 23 – Perfil de marcação das oncoproteínas BCL-2, BAX, c-MYC (nuclear e citoplasmático) no tecido tumoral, verificado através da técnica de imuno-histoquímica.

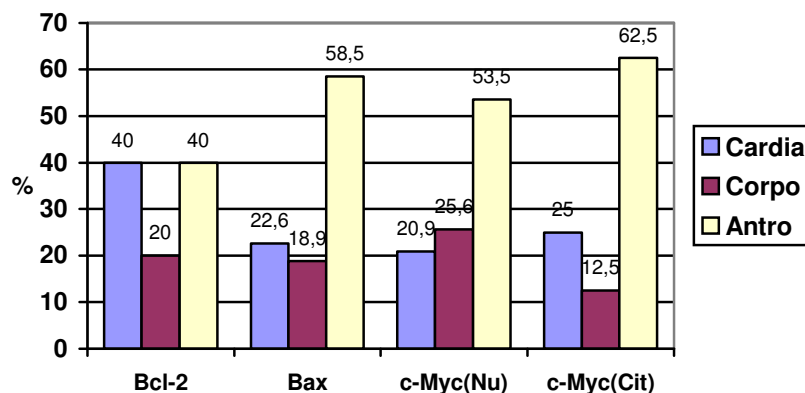


FIGURA 24 - Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto à localização do tumor e a expressão das proteínas BCL-2, BAX, c-MYC (nuclear e citoplasmático) (n=100).

Quanto à classificação de Lauren, apenas para a proteína BCL-2, houve uma tendência de marcação nos tumores do tipo difuso (80%). Verificou-se também uma maior positividade da proteína c-MYC citoplasmática nos tumores do tipo intestinal (figura 25).

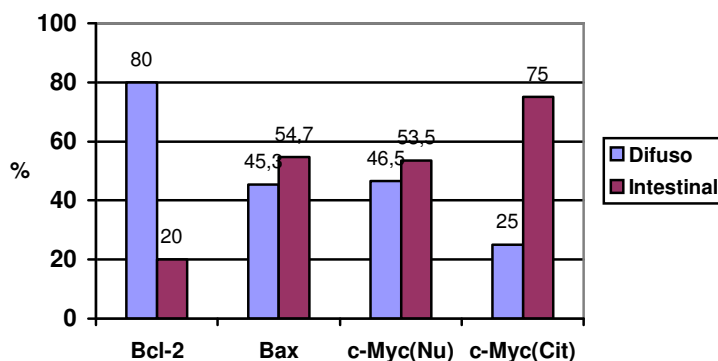


FIGURA 25 - Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto à classificação de Låuren e a expressão das proteínas BCL-2, BAX, c-MYC (nuclear e citoplasmático) (n=100).

Concernente ao grau de diferenciação dos tumores (figura 26), de modo geral houve uma tendência de distribuição da marcação de acordo com a frequência dessa classificação na amostra estudada, excetuando a imuno-marcação da proteína Bcl2, com frequência superior nos tumores pouco diferenciados (80%) e uma maior associação da c-MYC citoplasmática com tumores moderadamente diferenciados (75%). Ambas marcações não foram constatadas nos graus de diferenciação extremos (indiferenciados e bem diferenciados).

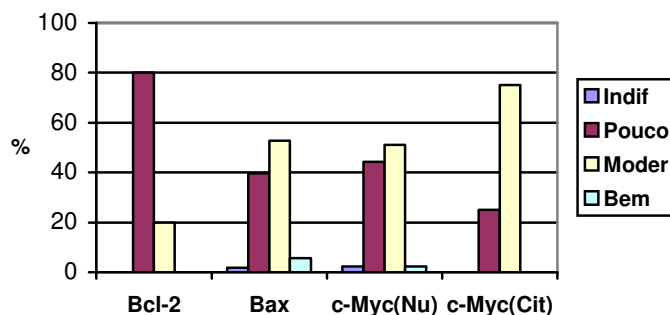


FIGURA 26 - Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto ao grau de diferenciação tumoral e a expressão das proteínas BCL-2, BAX, c-MYC (nuclear e citoplasmático) (n=100).

A correlação entre a imuno-marcação e o estadiamento dos tumores (figura27), demonstrou que a proteína BCL-2 era expressa em tumores mais avançados, especialmente no estadiamento IIIA, estando ausente no dois primeiros (IA e IB). Já as proteínas BAX, c-MYC nuclear e citoplasmática, foram observadas em todos os estadiamentos retratando a distribuição geral dos tumores analisados. É interessante notar a ausência da marcação da c-MYC citoplasmática no estágio inicial IA e uma maior associação com o estágio IIIA.

Considerando os dados de TNM, dentre as proteínas consideradas, apenas a c-MYC nuclear demonstrou significância estatística com a presença de metástase à distância ($p=0,014$), exibindo imuno-marcação em 14/21 (66,7%) casos com metástase.

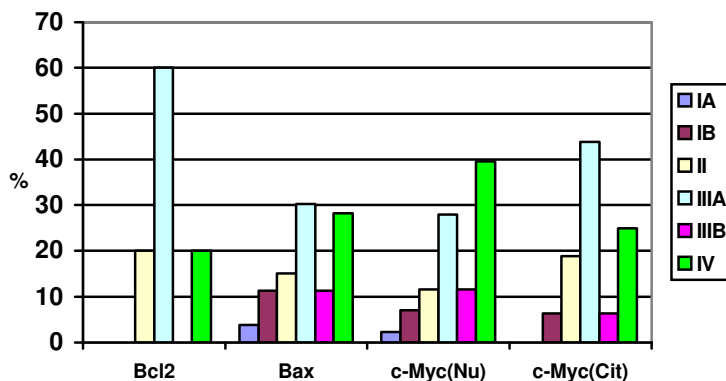


FIGURA 27 - Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto ao estadiamento tumoral e a expressão das proteínas BCL-2, BAX, c-MYC (nuclear e citoplasmático) (n=100).

A tendência celular à apoptose, definida pela relação entre a proteína BCL-2 e a proteína BAX, demonstrou que mais da metade dos casos estudados (58%) apresentavam tendência a apoptose e apenas 3% a sobrevida. Nos demais casos estudados (39%), ambas as proteínas não foram detectadas configurando um equilíbrio (figura 28).

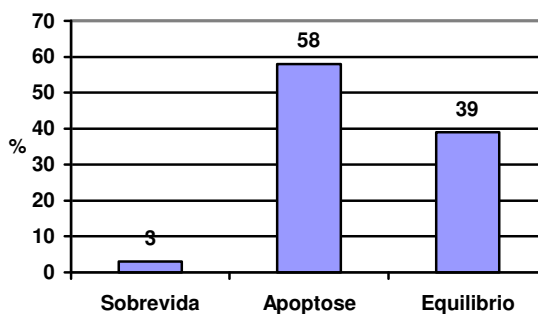


FIGURA 28 - Distribuição percentual dos casos de carcinoma gástrico, segundo a tendência celular (sobrevida, apoptose, equilíbrio), estimada através da relação dos índices de marcação (LI) de BCL-2/BAX, verificados por imuno-histoquímica (n=100).

A relação entre a marcação da proteína c-MYC nuclear e citoplasmática (figura 29) revelou que em 9% dos casos estudados houve positividade concomitante (+/+) e em 34% dos casos a proteína c-MYC mostrou-se presente apenas no núcleo das células tumorais, exibindo uma maior associação com o estadiamento IV. A presença restrita ao citoplasma ocorreu em

7% dos casos, estando todos estes relacionados à tumores de estadiamentos avançados (IIIA, IIIB e IV). Em 50% não foi verificada nenhuma marcação (-/-)

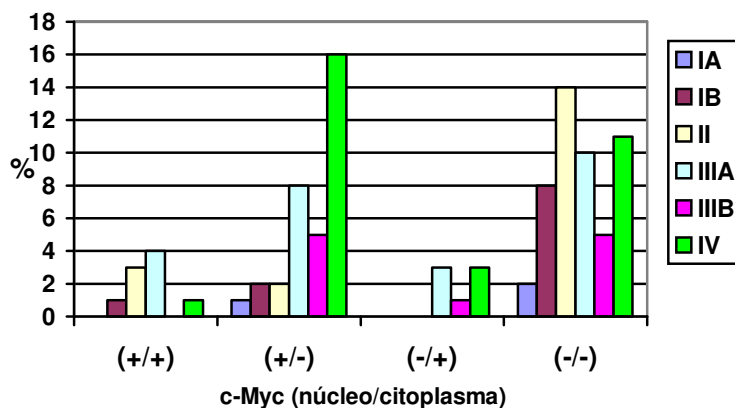


FIGURA 29 – Percentuais de concomitância (+/+), concordância (-/-) e discordâncias (+/- ou -/+) entre as marcações nuclear e citoplasmática da oncoproteína c-MYC, distribuídos segundo o estadiamento tumoral (n=100).

Devido à relação da proteína c-MYC na transativação de BAX, foi verificada a associação entre essas proteínas. A correlação entre a presença de c-MYC nuclear e positividade da proteína BAX, não demonstrou diferença estatisticamente significativa através do Teste Exato de Fisher ($p=0,545$) (figura 30). Contudo, constatou-se que em 48,8% dos casos c-MYC (nuclear) imuno-positivos a proteína BAX também foi detectada. Por outro lado, a BAX também foi constatada em 56,1% dos casos c-MYC negativos. O padrão dos escores de marcação da proteína BAX (LI e H-score) demonstrou equivalência entre ambos os grupos (c-MYC positivo e negativo). Não obstante, de acordo com a correlação linear de Spearman, não foi verificada associação linear entre os escores de ambas as proteínas (LI $p=0,426$; H-score $p=0,439$).

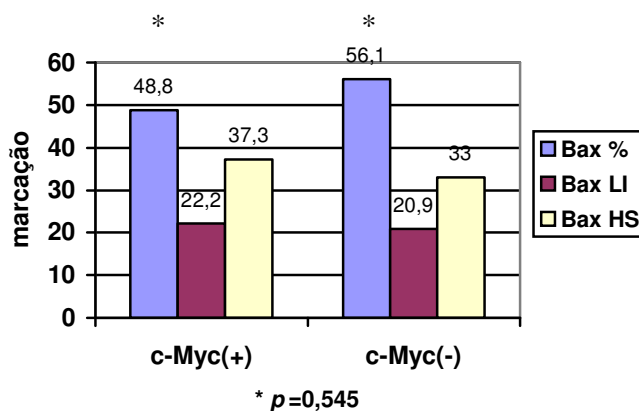


FIGURA 30 - Percentual de casos positivos (positividade) e média dos escores de LI e H-score para BAX, distribuídos quanto à expressão c-MYC nuclear.

4.4. Detecção do Vírus Epstein-Barr

4.4.1. Detecção do EBV por Hibridação *in situ*

A análise dos 100 casos estudados através da técnica de hibridação *in situ*, demonstrou positividade para o EBV em 8 (8%) casos, todos eles apresentando núcleos de células tumorais intensamente marcados. Em 6/8 (75%) casos a marcação apresentou-se de forma difusa, abrangendo quase todo tecido tumoral, enquanto nos dois outros casos, observou-se marcações de carácter focal (tabela 7). Dos 100 casos investigados, apenas 2 (2%) apresentaram linfócitos positivos em meio a folículos linfóides presentes no tumor, concomitantes à marcação das células tumorais sendo um deles de marcação tumoral focal (casos n°43 e n°46). É importante mencionar que, a quantidade de linfócitos marcados frente ao proeminente infiltrado linfocitário, foi muito pequena.

Para a confirmação da sensibilidade da técnica utilizada, vinte e nove casos (28 negativos e 1 positivo) foram submetidos à técnica de hibridação *in situ* utilizando o sistema de amplificação de sinal através de biotilil-tiramida (kit GenPoint®). Os resultados por essa técnica foram idênticos aos obtidos pela técnica convencional.

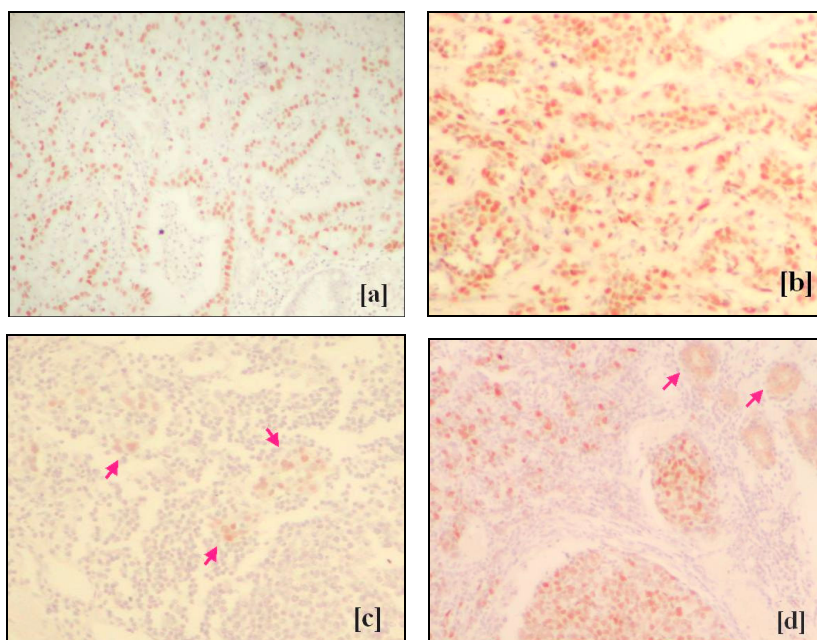


FIGURA 31 – Presença de EBV em carcinoma gástrico detectada pela técnica de Hibridação *in situ* (400X). [a] Caso n° 46 – Carcinoma do tipo intestinal moderadamente diferenciado: intensa marcação nuclear [b] Caso n° 43 - Carcinoma difuso moderadamente diferenciado: verifica-se uma marcação nuclear intensa e difusa; [c] Caso n° 46: observa-se uma marcação nuclear em linfócitos de em um folículo linfóide presente no tumor (setas); [d] Caso n° 74 – Carcinoma do tipo intestinal moderadamente diferenciado: nota-se uma intensa marcação nuclear em células tumorais e presença de marcação citoplasmática inespecífica em algumas glândulas não tumorais (setas).

4.4.2. Correlação dos Resultados da Hibridação *in situ* com os Dados Clínico-patológicos

A correlação dos resultados da hibridação *in situ* com os dados clínico-patológicos são apresentados abaixo. Acerca do sexo dos indivíduos, apesar de não serem estatisticamente significantes ($p=0,265$), os resultados revelaram uma maior associação do EBV com o sexo masculino (87,5%) (figura 32). No que diz respeito à cor dos indivíduos estudados (figura 33), não houve diferença estatisticamente significativa entre os casos positivos e negativos da hibridação *in situ* ($p=0,694$), ambos refletindo a distribuição geral dos casos analisados. Quanto à distribuição entre as faixa-etárias (figura 34), notou-se uma redução percentual dos casos positivos para o EBV entre o intervalo 55-64 anos. A média de idade dos casos EBV positivos mostrou-se um pouco inferior (59,7) a dos casos não infectados (61,3).

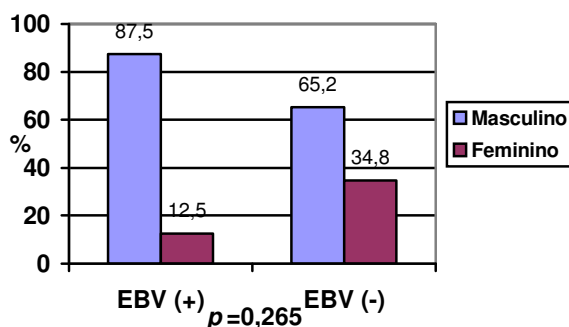


FIGURA 32 - Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto ao sexo dos pacientes e a presença de EBV detectado por hibridação *in situ* (n=100).

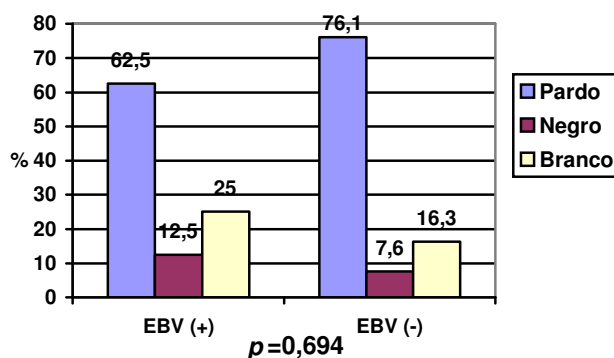


FIGURA 33 - Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos segundo à cor dos pacientes e a presença de EBV detectado por hibridação *in situ* (n=100).

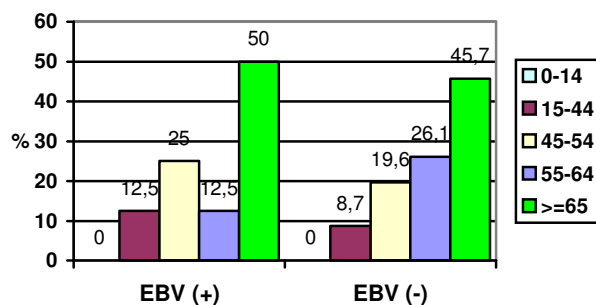


FIGURA 34 - Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos segundo à faixa etária dos pacientes e presença de EBV detectado por hibridação *in situ* (n=100).

Dentre os 57 casos analisados quanto ao tipo sangüíneo, pôde-se constatar uma elevação importante de casos EBV positivos no tipo B+. Adicionalmente, todos os casos positivos para o EBV acometeram pacientes com fator Rh positivo (figura 35). A correlação com a localização anatômica dos tumores não apresentou significância estatística ($p=0,549$) (figura 36), mesmo assim, percebeu-se uma maior freqüência de casos EBV positivos na região da cárdia, quando comparado com o grupo EBV negativo, ou mesmo, com a própria distribuição global dos casos estudados.

A positividade para EBV mostrou-se mais freqüente nos tumores mais agressivos (estadiamento IIIB e IV), especialmente naqueles classificados como IIIB, considerando o aumento percentual de cerca de duas vezes, quando comparado com o grupo de casos EBV negativos (figura 37). Apesar desse achados, o EBV não demonstrou relação com a ocorrência de metástases à distância ($p=0,673$) (figura 38). Quanto à classificação de Låuren, verificou-se uma maior associação do EBV com tumores do tipo intestinal (87,5%), contudo, os resultados não foram estatisticamente significantes ($p=0,136$) (figura 39). Observou-se ainda, um predomínio nos carcinomas moderadamente diferenciados (75%), não estando presente nos tumores bem diferenciados e indiferenciados (figura 40).

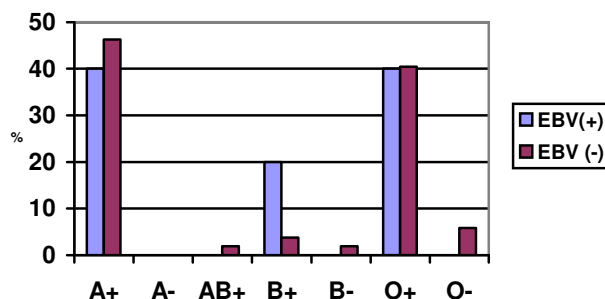


FIGURA 35 - Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto ao tipo sangüíneo dos pacientes e a presença de EBV detectado por hibridação *in situ* (n=100).

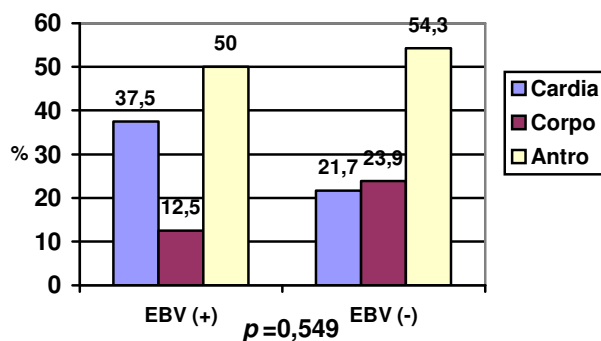


FIGURA 36 - Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto à localização do tumor e a presença de EBV detectado por hibridação *in situ* (n=100).

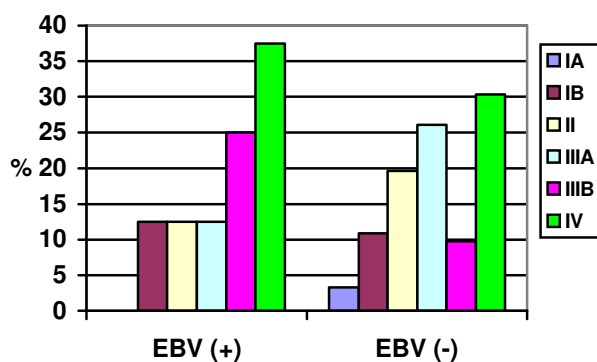


FIGURA 37 - Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto ao estadiamento tumoral e a presença de EBV detectado por hibridação *in situ* (n=100).

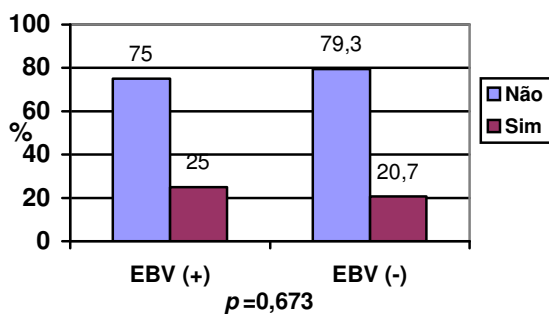


FIGURA 38 - Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto à ocorrência de metástase à distância e a presença de EBV detectado por hibridação *in situ* (n=100).

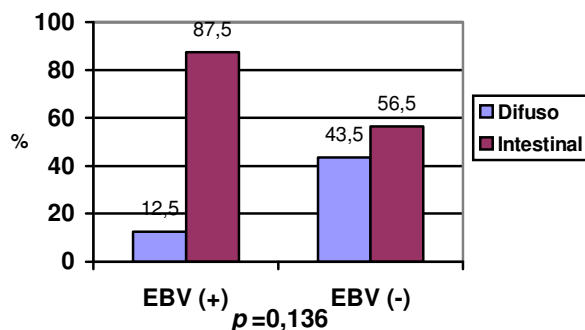


FIGURA 39 - Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto à classificação de Lãuren e a presença de EBV detectado por hibridação *in situ* (n=100).

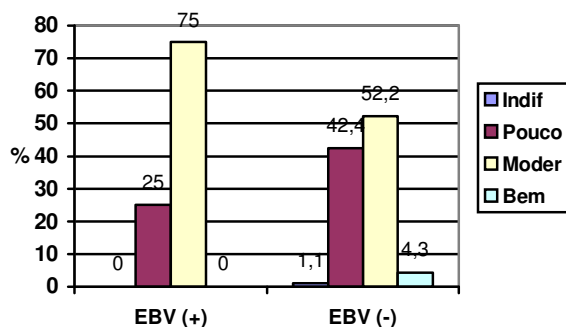


FIGURA 40 - Percentual de casos de carcinoma gástrico estudados, distribuídos quanto ao grau de diferenciação tumoral e a presença de EBV detectado por hibridação *in situ* (n=100).

4.4.3. PCR x Hibridação *in situ*

De 61 casos analisados através das técnicas de PCR e hibridação *in situ*, observou-se que 57,4% dos casos foram positivos pela técnica de PCR, enquanto apenas 9,8% pela técnica de hibridação *in situ* (HIS) (figura 41). Importante notar que, por ambas as técnicas empregadas somente 4,9% dos casos foram diagnosticados como positivos e 37,7% como negativos, ocorrendo concordância em 42,6%, com baixo índice de concordância Kappa, $\kappa = -0,026 (\pm 0,069)$ (tabela 6).

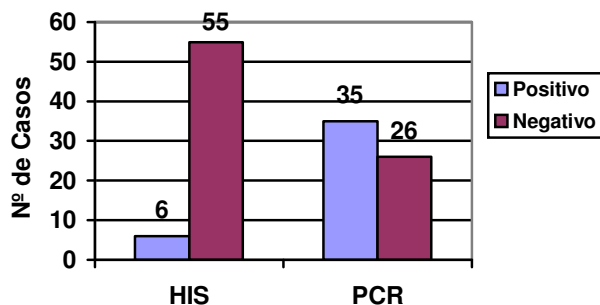


FIGURA 41 - Relação entre as técnicas de Hibridação *in situ* e PCR quanto à detecção do EBV em carcinomas gástricos (n=61).

TABELA 6 – Correlação entre os resultados das técnicas de Hibridação *in situ* e PCR para detecção do EBV em carcinoma gástrico (n=61).

PCR EBV	HIS EBER1		TOTAL
	Positivo	Negativo	
Positivo	3 (4,9%)	32 (52,5%)	35 (57,4%)
Negativo	3 (4,9%)	23 (37,7%)	26 (42,6%)
TOTAL	6 (9,8%)	55 (90,2%)	61 (100%)

Índice de Kappa $\kappa = -0,026 (\pm 0,069)$

4.4.4. Deleção de 30pb do Gene Viral da LMP1

Foi realizado ainda, a investigação da deleção de 30pb do gene viral da LMP1 em 24 dos 35 casos positivos pela técnica de PCR, constatando-se um discreto predomínio dos vírus que não apresentaram a deleção (45,8%). Coinfecção foi observada em 16,7% dos casos (figura 43). Dentre os 24 casos, não houve associação entre a existência ou não da deleção com o estadiamento tumoral ou com metástase à distância. Dos seis casos positivos pela hibridação *in situ* apenas um foi analisado, constatando-se a existência da deleção.

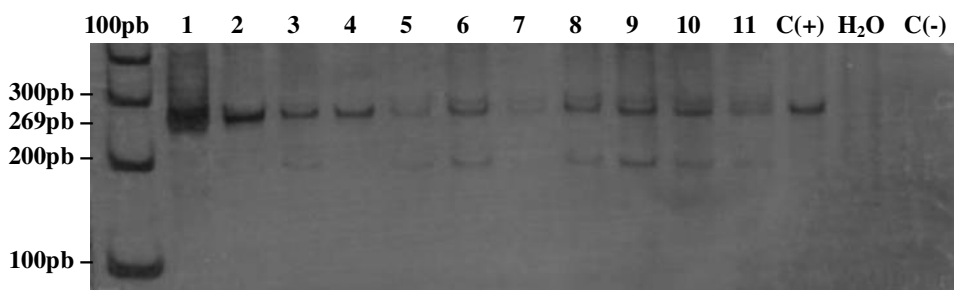


FIGURA 42 – Gel de agarose após corrida eletroforética dos produtos de amplificação do gene EBNA1. Nota-se bandas de 269pb em todos os casos testados (linhas 1-11), representando casos positivos. Linhas 5,7 e 11 apresentam bandas mais fracas. 100pb, marcador de peso molecular; C(+), controle positivo; H₂O, água; C(-), controle negativo.

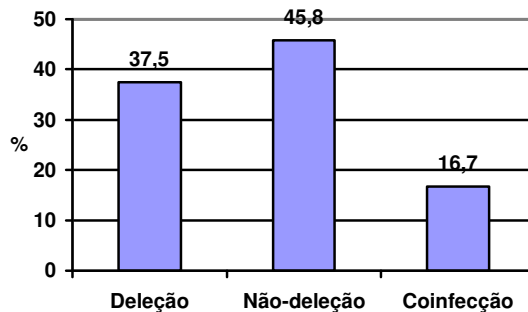


FIGURA 43 – Percentual de casos de carcinoma gástrico PCR-positivos para o EBV, distribuídos quanto à ocorrência da deleção de 30pb do gene da LMP1 (n=24).

4.5. Correlação do EBV com as Oncoproteínas Celulares

A relação entre a presença do EBV e a imuno-marcação da proteína BCL-2, demonstrou que nenhum dos casos validados como positivos pela técnica de hibridação *in situ* (HIS), apresentaram positividade para BCL-2. Já a análise feita pela técnica de PCR, revelou um pequeno percentual de positividade para BCL-2 (8,6%) nos casos EBV positivos, embora similar ao grupo PCR-EBV negativo. Não houve diferenças estatisticamente significantes quanto à distribuição dos escores obtidos, na presença ou ausência do vírus (figura 44).

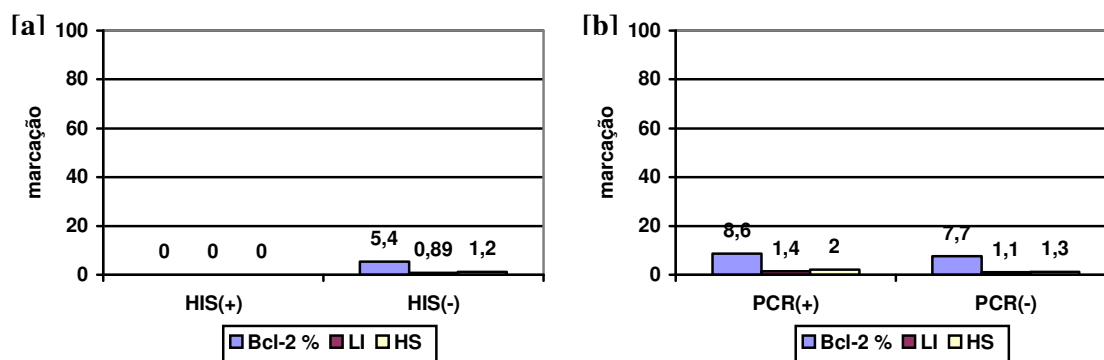


FIGURA 44 - Percentual de casos positivos (positividade) e média dos escores de LI e H-score para BCL-2, distribuídos quanto à presença de EBV detectado por hibridação *in situ* (n=100) e PCR (n=61). [a] Hibridação *in situ*: Teste de Mann-Withney LI $p=0,357$ e H-Score $p=0,357$; [b] PCR: Teste de Mann-Withney LI $p=0,332$ e H-Score $p=0,320$.

Quanto à proteína BAX, percebeu-se nos casos EBV positivos pela técnica de hibridação *in situ*, uma discreta redução tanto no índice de positividade quanto nos escores de marcação da BAX. Por outro lado, a análise efetuada pela PCR resultou em um percentual mais elevado de positividade para BAX nos casos PCR-EBV positivos. No entanto, a distribuição dos escores de marcação foram similares entre os grupos PCR-positivos e negativos (figura 45).

A correlação entre a expressão da proteína c-MYC (nuclear) com a presença do EBV detectado pela técnica de hibridação *in situ*, evidenciou um baixo índice de positividade dessa proteína (12,5%), atrelado a baixíssimos escores de marcação (LI=1,2; H-Score=2,8), que expressaram claramente a disparidade em relação aos casos EBV negativos e apresentaram significância estatística (LI, $p=0,039$ e H-Score, $p=0,045$). A respeito da técnica de PCR, os resultados obtidos (positividade e escores) foram similares aos casos PCR-EBV negativos, não havendo significância estatística (figura 46).

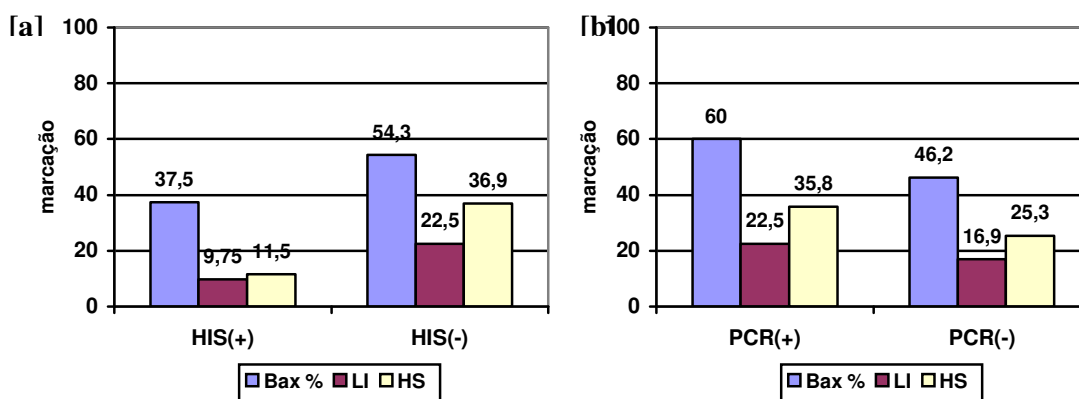


FIGURA 45 - Percentual de casos positivos (positividade) e média dos escores de LI e H-score para BAX, distribuídos quanto à presença de EBV detectado por hibridação *in situ* (n=100) e PCR (n=61). [a] Hibridação *in situ*: Teste de Mann-Whitney LI $p=0,140$ e H-Score $p=0,103$; [b] PCR: Teste de Mann-Whitney LI $p=0,260$ e H-Score $p=0,290$.

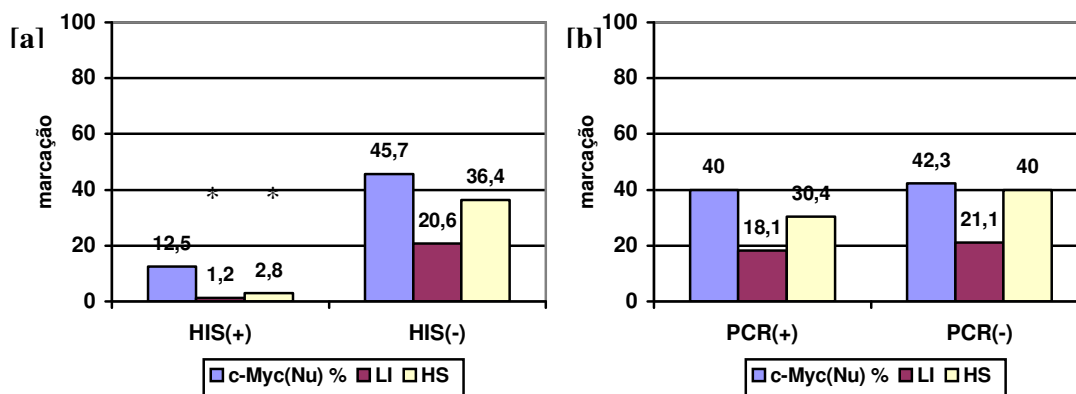


FIGURA 46 - Percentual de casos positivos (positividade) e média dos escores de LI e H-score para c-MYC nuclear, distribuídos quanto à presença de EBV detectado por hibridação *in situ* (n=100) e PCR (n=61). [a] Hibridação *in situ*: Teste de Mann-Whitney (*) LI $p=0,039$ e (*) H-Score $p=0,045$; [b] PCR: Teste de Mann-Whitney LI $p=0,650$ e H-Score $p=0,593$.

Quando se considera a análise da marcação citoplasmática da proteína c-MYC frente à detecção do EBV por hibridação *in situ*, esta demonstrou sutis aumentos dos valores de positividade e escores de c-MYC (citoplasmático) nos casos EBV positivos, ainda que não tenha sido constatada diferença estatisticamente significativa. Importante mencionar, que nenhum destes casos apresentaram marcação nuclear concomitante. Já com a técnica de PCR, os casos EBV positivos demonstraram valores (positividade e escores) inferiores aos observados pela hibridação *in situ*, no entanto, similares aos casos PCR negativos (figura 47).

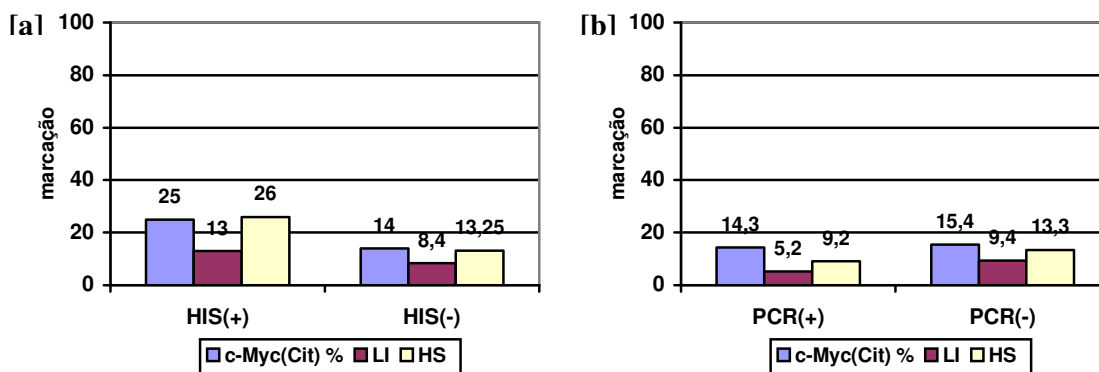


FIGURA 47 - Percentual de casos positivos (positividade) e média dos escores de LI e H-score para c-MYC citoplasmático, distribuídos quanto à presença de EBV detectado por hibridação *in situ* (n=100) e PCR (n=61). [a] Hibridação *in situ*: Teste de Mann-Whitney LI $p=0,194$ e H-Score $p=0,158$; [b] PCR: Teste de Mann-Whitney LI $p=0,556$ e H-Score $p=0,572$.

TABELA 7 – Perfil patológico e de expressão das proteínas BCL-2, BAX, c-MYC (nuclear e citoplasmático), dos casos EBV-positivos detectados pela técnica de Hibridação *in situ* (n=8).

Hibridação <i>in situ</i>	PCR	Imuno-Histoquímica												Histopatológico									
		BCL-2				BAX				c-MYC (Nu)				c-MYC (Cit)				Lauren	Difer.	Estad.			
Caso	R	M	Inf.	R	R	LI	H	M	R	LI	H	M	R	LI	H	M	R	LI	H	M			
Nº03	+	F	-	-	-	0	0		-	0	0		-	0	0		+	61	143	D	Intestinal	Moder.	IV
Nº43	+	D	+	+	-	0	0		+	25	25	D	-	0	0		-	0	0		Difuso	Moder.	IIIB
Nº46	+	F	+	-	-	0	0		-	0	0		-	0	0		-	3	3	D	Intestinal	Moder.	IB
Nº63	+	D	-	-	-	0	0		-	0	0		-	0	0		-	0	0		Intestinal	Pouco	II
Nº70	+	D	-	+	-	0	0		-	0	0		+	10	23	F	-	0	0		Intestinal	Pouco	IV
Nº74	+	D	-	+	-	0	0		-	0	0		-	0	0		-	0	0		Intestinal	Moder.	IV
Nº76	+	D	-		-	0	0		+	17	17	D	-	0	0		-	0	0		Intestinal	Moder.	IIIB
Nº85	+	D	-		-	0	0		+	36	50	D	-	0	0		+	40	62	D	Intestinal	Moder.	IIIA

R, resultado; **M**, marcação; **F**, focal; **D**, difusa; **LI**, *Labelling index*; **H**, *H-score*.

5. Discussão

5.1. Análise Clínico-Epidemiológica

Dados do INCA (2004) estimavam para o ano de 2005, 1.080 novos casos de câncer gástrico no Estado do Ceará, sendo estimados 340 casos só em Fortaleza. Essas projeções colocavam o Estado do Ceará em sexto lugar em números de casos de câncer gástrico, estando logo atrás dos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Paraná e Rio Grande do Sul, ao mesmo tempo em que situavam Fortaleza em quarto lugar em número de casos entre as capitais do país, atrás apenas de São Paulo (SP), Rio de Janeiro (RJ) e Belo Horizonte (MG). Esses dados revelam a magnitude desta neoplasia no Estado do Ceará e a importância de melhorias na assistência através da implementação de programas de rastreamento precoce, facilitação do acesso à assistência de saúde e investimentos em outros centros de referência no Estado.

No presente estudo, apesar da maioria dos casos terem sido procedentes de Fortaleza (46%), verificou-se também a existência de casos procedentes da região metropolitana (11%) e de municípios do interior do Estado do Ceará (43%). Considerando a inclusão aleatória de casos, esses dados devem refletir a real demanda de atendimento no Hospital Universitário Walter Cantídeo e na Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza e denotam a relevância desses serviços como referência no Estado.

Vale ressaltar que durante a coleta de casos outros tipos de neoplasias gástricas foram obtidos, tais como linfomas, leiomiossarcomas, GIST's, tumores carcinóides, entre outros. Entretanto, somente os casos de adenocarcinomas foram analisados, os quais demonstraram frequência similar à descrita na literatura, variando entre 90-95% do total de tumores de estômago (CÉSAR *et al.*, 2002; SHANG e PEÑA, 2005).

No que se refere à atividade profissional dos indivíduos estudados, o predomínio de profissões tais como agricultor, do lar, pedreiro, entre outras, em detrimento de profissões de nível superior, indica que a maioria desses indivíduos pertencia a uma classe socioeconômica pobre. No entanto, esse achado é possivelmente decorrente da obtenção de casos em hospitais que atendem essencialmente através do Sistema Único de Saúde – SUS, impedindo de concluir algo a respeito. Todavia, tem sido relatado que dois terços dos casos de câncer de estômago ocorrem em países em desenvolvimento (INCA, 2004; PARKIN *et al.*, 2005), sugerindo, assim como em outros estudos, que a situação socioeconômica possa estar relacionada (CIPRIANI *et al.*, 1991; RODER, 2002; ALBERTS *et al.*, 2003), talvez pelas diferenças nos padrões alimentares e de conservação de alimentos, pela dificuldade de acesso a saúde ou ainda, pela prevalência de *Helicobacter pylori* que segundo Parkin *et al.* (2005), é mais elevada em adultos de países em desenvolvimento.

Quanto à distribuição da neoplasia pelo sexo dos pacientes na amostra estudada, os homens foram aproximadamente duas vezes mais acometidos que as mulheres, o que reproduz os achados da literatura mundial e do Brasil (DE STEFANI *et al.*, 1990; CIPRIANI *et al.*, 1991; CHRISTIAN *et al.*, 1999; CÉSAR *et al.*, 2002; RODER, 2002; ALBERTS *et al.*, 2003; PARKIN *et al.*, 2005; CUNNINGHAM *et al.*, 2005). Segundo dados do INCA (2004), no Brasil eram previstos para o ano de 2005 cerca de 15.170 novos casos de câncer gástrico entre o sexo masculino e 7.975 entre o sexo feminino, correspondendo a taxas de 16,73/100.000 e 8,62/100.000, respectivamente. Na região nordeste (sem considerar os tumores de pele não-melanoma) o câncer de estômago é a segunda neoplasia mais freqüente entre os homens e quarta entre as mulheres. Dentre a referida região destaca-se o Estado do Ceará, para o qual eram estimados no ano de 2005, 680 novos casos entre o sexo masculino e 400 entre o sexo feminino, perfazendo taxas de 17,31/100.000 e 9,7/100.000, respectivamente.

Neste estudo, os casos de carcinomas gástricos foram mais freqüentes em indivíduos de idades avançadas estando de acordo com a revisão feita por César *et al.* (2002), que afirmam que o câncer de estômago acomete principalmente a terceira idade, apresentando freqüência baixa aos 40 anos que aumenta progressivamente com a idade, atingindo valores mais elevados em torno dos 70 anos. O aumento gradativo apresentou-se de forma mais evidente no sexo masculino, com idade acima de 65 anos. Além disso, não foi verificado nenhum caso com idade inferior a 23 anos, reafirmando o caráter tardio desta neoplasia.

Quanto à cor dos indivíduos, estudos realizados nos Estados Unidos da America demonstram que os valores mais elevados de incidência e mortalidade concentram-se em indivíduos negros do sexo masculino (CHRISTIAN *et al.*, 1999) No entanto, esse achado não foi verificado no presente estudo, no qual houve um predomínio de indivíduos pardos, sendo os indivíduos negros responsáveis pela minoria dos casos. Esse achado na realidade reproduz a distribuição racial da população do Ceará. A grande diferença étnica entre os dois povos mencionados e a carência de informações sobre outras regiões do mundo, dificulta qualquer comparação. No mais, a correlação entre a raça e o sexo dos pacientes estudados indica que o grupo mais acometido inclui homens pardos com idade acima de 65 anos, devendo provavelmente refletir o perfil predominante de casos de câncer de estômago no Estado do Ceará.

Alguns autores têm demonstrado uma associação entre tipo sanguíneo “A” e a suscetibilidade ao desenvolvimento de carcinoma gástrico, estando mais relacionado com carcinoma do tipo difuso. No presente estudo, dentre os pacientes os quais foi possível obter tal informação, a análise do tipo sanguíneo, revelou os tipos A+ e O+ como os mais

freqüentemente associados à carcinomas gástricos. Contrariamente a literatura, verificou-se uma maior associação do tipo sangüíneo “A” com carcinomas do tipo intestinal. Notou-se ainda, que 92,9% dos casos apresentavam fator Rh positivo, podendo indicar um outro fator de risco para o câncer de estômago, até então negligenciado.

Diversos autores relacionam a existência de história familiar de câncer gástrico, o tabagismo e o etilismo como fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de estômago (DE STEFANI *et al.*, 1990; CIPRIANI *et al.*, 1991; TRÉDANIEL *et al.*, 1997; TERRY *et al.*, 2002; ALBERTS *et al.*, 2003; SHANG e PEÑA, 2005; LYNCH, *et al.*, 2005). Quanto a história familiar, no presente estudo investigou-se a ocorrência indiscriminada de cânceres em parentes de até segundo grau. Dentre os casos que apresentavam história familiar, apenas quatro casos incluíam especificamente câncer de estômago, que de acordo com pesquisas recentes, seriam mais importantes do ponto de vista etiológico (de risco). Atualmente, vários estudos vêm sendo conduzidos no intuito de identificar alterações genéticas que possam estar relacionadas a um maior risco de desenvolvimento de câncer gástrico em membros de uma mesma família. Resultados promissores vêm sendo observados nos carcinomas do tipo difuso, quanto a mutações no gene da E-caderina, que predis põem outros membros da família que portem a mesma alteração (ZHENG *et al.*, 2004; LYNCH *et al.*, 2005).

Outro fator de risco associado a alguns tipos de câncer é o tabagismo. No câncer gástricos de acordo com Trédaniel *et al.* (1997), os indivíduos fumantes apresentam risco de 1,5-2,5 vezes mais elevado de desenvolver câncer de estômago. No atual estudo, constatou-se um importante percentual de pacientes fumantes (69,7%). À julgar pelo expressivo percentual de fumantes e a elevada associação com tumores mais malignos, isto é, de estadiamento avançado, o fumo certamente deve contribuir para a malignidade. Adicionalmente, o fato de que os fumantes mantinham o hábito por pelo menos 15 anos, alguns por mais de 50 anos, denotam o longo período de exposição pela mucosa gástrica aos fatores carcinogênicos do tabaco. A quantidade diária de cigarros não foi considerada, contudo, de acordo com achados de De Stefani *et al.* (1990), a exposição prolongada parece ser mais importante que a quantidade diária de cigarros no desenvolvimento de carcinoma gástrico. Estes autores verificaram ainda, correlações mais significativas acerca do tabagismo e alcoolismo, em indivíduos do sexo masculino, o que também foi constatado no presente estudo, sobretudo com relação ao alcoolismo. No que se refere ao consumo de bebidas alcoólicas, uma fração significativa dos casos apresentados (55,7%) possuía esse fator de risco, sendo que a cachaça representou a principal bebida consumida entre os indivíduos pesquisados. À despeito da escassa literatura no tocante a influência da bebida alcoólica, os resultados de De Stefani *et al.* (1990), sugerem que o tipo de bebida também possa influenciar no grau de risco, constatando

que os indivíduos que bebiam vinho apresentaram risco seis vezes mais elevado, comparado àqueles que bebiam apenas licor.

Embora os três referidos fatores de risco (história familiar, tabagismo e etilismo) representem fatores de confusão na investigação da etiologia de diversas neoplasias, os mesmos não foram correlacionados nas análises seguintes relativas ao EBV e às oncoproteínas celulares. Tal fato deveu-se a não obtenção dos dados de todos os casos pesquisados e, a exemplo do tabagismo, nenhum dos pacientes definidos como não fumantes estavam relacionados com o EBV (detectado por hibridação *in situ*), o que impediria qualquer análise isolada.

A distribuição dos casos quanto à localização anatômica dos tumores, mostrou-se de acordo com a literatura, exibindo um predomínio da região antral (TOKUNAGA *et al.*, 1993b; SHANG e PEÑA, 2005). Ademais, tais achados reproduziram de modo fidedigno os dados obtidos em alguns países da Europa, tais como Itália, Espanha, Estônia e Suíça (VERDECCHIA *et al.*, 2004). Estes pormenores atestam a representatividade da amostra estudada e subseqüentemente, a fidedignidade dos resultados.

5.2. Análise Histopatológica

A análise dos subtipos de adenocarcinoma demonstrou um modesto predomínio dos tumores do tipo intestinal de Låuren. No entanto, parece não haver ainda um consenso na literatura mundial, sobre a existência ou não de um tipo predominante. Neste contexto, alguns autores apontam o tipo intestinal como preponderante (SHIBATA e WEISS, 1992; RODER, 2002; OLUWASOLA e OGUNBIYI, 2003; LOPES *et al.*, 2004), enquanto outros apontam o tipo difuso (ODA *et al.*, 2003; CUNNIGHAN *et al.*, 2005).

De fato, o tipo intestinal demonstra uma maior associação com indivíduos do sexo masculino e/ou idosos (CÉSAR *et al.*, 2002; RODER, 2002; NARDONE, 2003; SHANG e PEÑA, 2005), confirmado no presente estudo. Notou-se também, que o tipo difuso se sobrepõe ao intestinal nos grupos mais jovens (15-44 anos), corroborando CÉSAR *et al.* (2002) e SHANG e PEÑA (2005). Alguns autores relatam ainda, uma relação dos tumores difuso com o sexo feminino (CÉSAR *et al.*, 2002; NARDONE, 2003). Considerando a baixa frequência geral de indivíduos do sexo feminino verificado neste estudo, o significativo percentual de carcinomas do tipo difuso acometendo mulheres (43,9%) indica que a relação acima mencionada também seja observada no grupo étnico aqui estudado.

Em geral, as neoplasias investigadas demonstraram caráter mais maligno, com 55% dos casos invadindo a camada serosa (pT3) e 13% acometendo estruturas adjacentes (pT4), esses dados denotam ainda, o padrão invasivo e expansivo da maioria dos tumores estudados.

Entretanto, faz-se necessário mencionar que durante a busca de casos, verificou-se que muitos pacientes encaminhados para cirurgia, não puderam ser submetidos à gastrectomia devido ao estágio neoplásico por demais avançado, com comprometimento de diversas estruturas anatômicas, que inviabilizavam o processo cirúrgico. Diante disso, pode-se afirmar que a grande maioria dos casos submetidos às intervenções cirúrgicas representavam tumores pT3 e pT4, o que certamente leva a uma subestimativa das frequências dos graus avançados e denota a ineficiência da assistência de saúde, no que se refere ao rastreamento/identificação precoce de novos casos.

O predomínio de neoplasias mais agressivas é novamente percebido pela distribuição dos casos quanto ao estadiamento, demonstrando um aumento gradativo de casos em função da progressão tumoral. O súbito decréscimo nos tumores classificados como IIIB, talvez possa ser explicado pelo próprio critério de classificação empregado, que é baseado em combinações dos resultados do TNM patológico. Tal classificação se mostra limitada por permitir apenas uma combinação (pT3, pN2, pM0) para o estadiamento IIIB (ver tabela 3), enquanto apresenta mais de uma combinação para os demais, com exceção do estadiamento IA. Na tabela 9, estão apresentados os resultados obtidos em estudos de diferentes partes do mundo. Para efeito de comparação, os estadiamentos dos casos analisados no presente estudo foram agrupados (I, II, III, IV), dessa forma, pôde-se notar uma similaridade percentual com os resultados de estudos realizados nos EUA e na Inglaterra, demonstrando predomínio do estadiamento III. Decerto, o elevado percentual de tumores de estadiamento I observado no Japão, reflete o eficiente sistema de rastreamento/identificação precoce de neoplasias gástricas.

Tabela 8 – Distribuição quanto ao estadiamento tumoral, observada em pesquisas de diversas partes do mundo, incluindo o presente estudo.

AUTOR	PAÍS	TOTAL	ESTADIAMENTO			
			I	II	III	IV
			n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
LIMA, 2006	Brasil	100	14 (14)	19(19)	36(36)	31(31)
CUNNINGHAM <i>et al.</i> , 2005	Inglaterra	430	85 (20)	83 (19)	145 (34)	117 (27)
LEE <i>et al.</i> , 2004	Coréia	350	153 (43,7)	72 (20,5)	78 (22,2)	47 (13,4)
KIJIMA <i>et al.</i> , 2003	Japão	327	193 (59,0)	51 (15,6)	58 (17,7)	25 (7,6)
ALBERTS <i>et al.</i> , 2003	EUA	11267	2004 (17,8)	1976 (17,5)	3945 (35)	3342 (29,7)
	Japão	3176	1453 (45,7)	377 (11,9)	693 (21,8)	653 (20,6)

A correlação entre estadiamento tumoral e a faixa etária demonstrou que os adultos jovens (15-44 anos), apresentaram neoplasias mais avançadas, vale salientar que 88,9% dos casos pertencentes a este intervalo apresentaram adenocarcinomas do tipo difuso, que segundo a literatura (COTRAN *et al.*, 2000; WERNER *et al.*, 2001), apresentam um decurso clínico mais agressivo, podendo ser a explicação para tal achado.

Dentre os fatores de risco estudados, apenas o tabagismo demonstrou significância estatística quando correlacionado com o estadiamento tumoral, indicando que os indivíduos fumantes apresentam tumores mais agressivos.

Apesar de poucos estudos reportarem o grau de diferenciação tumoral, os estudos de Lee *et al.* (2004) e Takano *et al.* (1999) verificaram um predomínio de tumores pouco diferenciados, neste último, além do grau predominante (52,2%), constatou-se uma equivalência entre os casos moderadamente e bem diferenciados (22,0% e 25,7%, respectivamente). No atual estudo, os tumores bem diferenciados somaram apenas 4% do total. Em função da carência de dados na literatura mundial a respeito do grau de diferenciação, pouco se pode concluir. Nota-se apenas, que de acordo com o presente estudo e os acima mencionados, os tumores indiferenciados demonstram-se muito pouco frequentes. As discrepâncias entre os resultados podem ser decorrentes dos diferentes grupos étnicos estudados. Contudo, não se pode desconsiderar que as discrepâncias possam ser decorrentes do caráter subjetivo da determinação deste atributo (pela análise histopatológica), considerando que características por vezes tênues definem o grau de diferenciação.

5.3. Análise Imuno-Histoquímica

Tem sido sugerido que o bloqueio da apoptose promovido pela expressão desregulada da oncoproteína BCL-2, possa estar associada ao desenvolvimento dos adenocarcinomas gástricos (KOMATSU *et al.*, 1996). Esse mecanismo anti-apoptótico, assegura a sobrevivência das células neoplásicas, além de permitir o acúmulo de danos genéticos, que favorecem o processo tumorigênico (ALBERTS *et al.*, 2004). Apesar do mecanismo sugerido, o presente estudo constatou uma baixa positividade da proteína BCL-2 (5%), que embora inferior, se aproxima dos resultados obtidos em duas grandes séries de estudos, de Lee *et al.* (2004) e de Muller *et al.* (1998). Já, Van der Woude *et al.* (2005), não observaram positividade em nenhum dos 19 casos analisados, podendo este resultado, no entanto, ser decorrente do pequeno número de casos incluídos. Em contrapartida, outros autores verificaram altos valores de positividade (LAWERS *et al.*, 1995, KRAJEWSKA *et al.*, 1996; INADA *et al.*, 1998; ISHII *et al.*, 2001). A tabela 10 resume os dados da literatura quanto à detecção de BCL-2 e as demais proteínas estudadas.

A baixa positividade da proteína BCL-2 aqui verificada, não deve ser decorrente de variações da técnica empregada, considerando que em 37% dos casos, observou-se presença de folículos linfóides intra-tumorais intensamente positivos para BCL-2 (ver figura 22b), representando “controles internos” da reação de imuno-histoquímica, que validam os resultados obtidos.

Tabela 9 – Percentuais de positividade das proteínas BCL-2, BAX, c-MYC (nuclear e citoplasmática), observados em diversas referências, incluindo o presente estudo.

AUTORES	N	PROTEÍNAS			
		BCL-2	BAX	c-MYC (nu)	c-MYC (cit)
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
LIMA, 2006	100	5 (5)	53 (53)	43 (43)	16 (16)
VAN DER WOUDE <i>et al.</i> , 2005	19	0 (0)	18 (94,7)		
LEE <i>et al.</i> , 2004	343	36(10,4)			
ISHII <i>et al.</i> , 2002	109			24 (22,0)	
ISHII <i>et al.</i> , 2001	119	29 (24,3)		29 (24,3)	
KOZMA <i>et al.</i> , 2001	23			6 (26,0)	
MULLER <i>et al.</i> , 1998	413	47 (11,4)			
INADA <i>et al.</i> , 1998	201	84 (41,7)			
KRAJEWSKA <i>et al.</i> , 1996	48	26 (54,1)	44 (91,6)		
LAWERS <i>et al.</i> , 1995	64	46 (71,8)			
SPANDIDOS <i>et al.</i> , 1991	88			48 (54,5)	
NINOMIYA <i>et al.</i> , 1991	213			50 (23,5)	
YAMAMOTO <i>et al.</i> , 1987	167				51 (30,5)

Não há relatos quanto à relação da expressão de BCL-2 e a localização anatômica tumoral. No entanto, neste estudo verificou-se que os tumores localizados na cárdia apresentaram positividade equivalente àqueles presentes no antro. Considerando a distribuição global de casos quanto ao sítio tumoral (figura 17), tal achado indica que os tumores da cárdia estejam mais relacionados com superexpressão de BCL-2.

Apesar dos poucos casos positivos para BCL-2, pôde-se constatar que 4/5 eram constituídos de tumores do tipo difuso e de grau pouco diferenciado. Esses dados concordam apenas com Komatsu *et al.* (1996), que relatam a associação da superexpressão de BCL-2 com tumores pouco diferenciados. Entretanto, diferem de outros estudos que reportam o tipo intestinal de Làuren e os tumores de grau bem a moderadamente diferenciados, como os mais associados com a expressão de BCL-2 (LAWERS *et al.*, 1995; MULLER *et al.*, 1998). Demais estudos, não observaram diferenças entre os tipos difuso ou intestinal (SAEGUSA *et*

al., 1995; INADA *et al.*, 1998). A respeito do estadiamento tumoral, Ishii *et al.* observaram uma expressão mais elevada de BCL-2 em tumores precoces. Em contraste, no presente estudo verificou-se uma maior associação com tumores avançados, notavelmente no estadiamento IIIA, não sendo constatada em tumores de estadiamento inicial IA e IB, indicando que os tumores que expressam BCL-2 são mais malignos.

Quanto à expressão da proteína BAX, pouco mais da metade dos casos foram positivos (53%), demonstrando médias de escores (LI, H-score) mais elevadas que as observadas para BCL-2. Apesar dos poucos estudos investigando a expressão de BAX, em geral, estes demonstram positividade elevada, ultrapassando 90% dos casos (KRAJEWSKA *et al.*, 1996; VAN DER WOUDE *et al.*, 2005) (ver tabela 9). Considerando a sensibilidade do método imuno-histoquímico empregado, comprovada pela marcante positividade das lâminas-controle e pelos elevados escores de marcação demonstrado na maioria dos casos positivos, sugere-se que a divergência entre os resultados reflita a diversidade de mecanismos moleculares envolvidos na tumorigênese gástrica. Embora Krajewska *et al.* (1996) tenham relatado uma maior positividade de BAX em tumores do tipo intestinal, no atual estudo não foi verificada diferença quanto ao tipo histológico de Lauren. Também não houve correlação com estadiamento ou grau de diferenciação dos tumores, visto que estes esboçaram nitidamente o perfil de distribuição dos casos estudados.

A análise do balanço entre as proteínas BCL-2 e BAX, determinado pelo percentual de células imuno-positivas (LI), realizado no intuito de explorar a tendência das células tumorais, demonstrou que 58% dos casos apresentavam padrão eminentemente pró-apoptótico devido à expressão predominante de BAX, enquanto apenas 3% exibiam orientação à sobrevivência celular (figura 28). De acordo com esses dados, a inibição da apoptose relacionada a BCL-2, parece não representar uma via tumorigênica importante nos carcinomas gástricos. No entanto, vale lembrar que o processo apoptótico envolve diversas outras proteínas da família BCL-2, tais como Bcl-xL, Bak, Bad, Bid, entre outras (ZÖRNIG *et al.*, 2001). Dessa forma, a investigação dessas proteínas pode contribuir para a maior compreensão deste mecanismo em carcinomas gástricos. Dentre os poucos estudos envolvendo outros membros da família BCL-2 em carcinomas gástricos, têm-se constatado uma elevada positividade da proteína Bcl-xL (anti-apoptótica) [85% (KRAJEWSKA *et al.*, 1996) e 57,8% (VAN DER WOUDE *et al.*, 2005)] e da proteína Bak (pró-apoptótica) [88% (KRAJEWSKA *et al.*, 1996)].

A respeito da proteína c-MYC nuclear, aproximadamente metade dos casos (43%) foram positivos, demonstrando médias de escores significativas. Estes achados assemelham-se aos resultados reportados por Spandidos *et al.* (1991), tanto no que se refere à positividade

quanto à intensidade de marcação. Esses dados indicam que a superexpressão de c-MYC exerce um papel relevante na tumorigênese dos adenocarcinomas gástricos. As correlações com os parâmetros clínico-histopatológicos mostraram-se concordantes com os achados de Kozma *et al.* (2001), apresentando associação apenas com a presença de metástases à distância, enquanto as demais correlações reproduziram as respectivas distribuições de casos.

A detecção da proteína c-MYC no citoplasma das células tumorais, ainda é motivo de controversia na literatura mundial, não apenas nos carcinomas gástricos, mas em diversos outros tipos neoplásicos. A maioria dos autores não considera a marcação citoplasmática, já que a proteína c-MYC exerce a sua atividade funcional no núcleo (ORIAN *et al.*, 1992). Por outro lado, alguns autores têm demonstrado um aumento da expressão citoplasmática em função da progressão maligna em carcinomas gástricos (YAMAMOTO *et al.*, 1987), de cólon (ROYDS *et al.*, 1992) e tumores astrocíticos (FARIA, 2005). Não obstante, Faria (2005) defende a hipótese do aprisionamento desta proteína no citoplasma através de alterações nos mecanismos de transporte da membrana nuclear, como um recurso empregado pelas células tumorais na tentativa de conter os efeitos oncogênicos da mesma, frente à expressão desregulada do gene que a codifica.

Instigado por pesquisas prévias, o presente estudo também analisou a marcação citoplasmática da proteína c-MYC, constatando uma baixa positividade (16%), inferior a observada por Yamamoto *et al.* (1987) (30,5%), contudo, demonstrando expressivas médias de escores. Adicionalmente, observou-se um predomínio nos tumores do tipo intestinal e de grau moderadamente diferenciado.

A elevada concordância (59%) entre a expressão nuclear e citoplasmática (+/+ ou +/-) (figura 29), sugere que a presença da proteína c-MYC no citoplasma reflete os níveis nucleares da mesma. Quanto à presença restrita ao citoplasma (7%), Faria (2005) sugere que possíveis mecanismos celulares utilizados para impedir a entrada da c-MYC e/ou para exportá-la do núcleo, possam ser potencializados nos tumores mais agressivos, o que explicaria sua constatação apenas em tumores de estadiamento avançado. É bom que se diga que ambas explicações são apenas conjecturas, necessitando ainda de muitos estudos para elucidar tais questões.

Tem sido relatada que a proteína c-MYC pode induzir a expressão de BAX, através da ativação do supressor tumoral p53 (GRANDORI *et al.* 2000). No entanto, no contexto dos carcinomas gástricos esta via não se mostrou de forma notória (figura 30). Considerando os complexos processos celulares aos quais a proteína c-MYC está envolvida, admite-se que ao menos em 21/53 (39,6%) casos, a positividade de BAX possa ser explicada pela expressão de c-MYC.

5.4. Detecção do Vírus Epstein-Barr

5.4.2. Detecção do EBV por Hibridação *in situ*

A análise dos 100 casos de adenocarcinoma através da técnica de hibridação *in situ*, revelou que 8% foram positivos, estando dentro dos valores reportados pela literatura mundial que variam de 1,3 a 19,3%, demonstrando maior proximidade com as frequências observadas em estudos realizados no Japão, China, Rússia, França, México e Brasil, mais precisamente no Estado de São Paulo, mas inferior aos resultados obtidos nos Estados Unidos da América (16%) e Alemanha (18%) (ver tabela 10). Ademais, notou-se positividade exclusivamente em células tumorais, não sendo constatada marcação em células pertencentes à mucosa normal ou lesões pré-neoplásica, tais como metaplasia intestinal e displasia, sugerindo uma das seguintes explicações: (1) que o EBV não infecte epitélio normal/pré-neoplásico; ou (2) que a infecção ocorra, mas sem a expressão do RNA viral EBER1 (alvo da técnica empregada).

Tabela 10: Associação do EBV com adenocarcinoma gástrico

Ano	País	Técnicas	Freq.	%	Tipo de Carcinoma	Tipo celular marcado	Autores
1990	EUA	PCR	1/1	100	Linfoepitelial	–	BURKE <i>et al.</i>
1991	EUA	PCR	3/3	100	Linfoepitelial	–	MIN <i>et al.</i>
1992	EUA	PCR HIS-DNA HIS-EBER1	22/138	16	não linfo-epit	Células tumorais Epitélio displásico	SHIBATA e WEISS
1993	Japão	HIS-EBER1	14/18	77,8	Linfoepitelial	Células tumorais	ODA <i>et al.</i>
1993	Reino Unido	HIS-EBER1	3/168 6/6	1,8 100	não linfo-epit Linfoepitelial	Células tumorais	ROWLANDS <i>et al.</i>
1993	Itália	PCR HIS-EBER1	4/65 3/65	6,1 4,6	não linfo-epit	Células tumorais	LEONCINI <i>et al.</i>
1993a	Japão	HIS-EBER1	67/999	6,9	não linfo-epit	Células tumorais Linfócitos infiltrados	TOKUNAGA <i>et al.</i>
1993b	Japão	HIS-EBER1	120/1795	6,7	não linfo-epit	Células tumorais Linfócitos infiltrados	TOKUNAGA <i>et al.</i>
1994	Japão	PCR HIS-EBER1	8/72	11	não linfo-epit	Células tumorais Linfócitos infiltrados Epitélio ã-neoplásico	FUKAYAMA <i>et al.</i>
1994	Japão	HIS-EBER1	82/99 4/42	83 9,5	Linfoepitelial não linfo-epit	Células tumorais	NAKAMURA <i>et al.</i>
1994	China	HIS-EBER1	7/74	9,5	não linfo-epit	Células tumorais Epitélio displásico Linfócitos infiltrados	YUEN <i>et al.</i>
1994	Alemanha	HIS-EBER1	7/39	18	não linfo-epit	Células tumorais	OTT <i>et al.</i>

Tabela 10: Associação do EBV com adenocarcinoma gástrico (Continuação)

Ano	País	Técnicas	Freq.	%	Tipo de Carcinoma	Tipo celular marcado	Autores
1994	Inglaterra	HIS-EBER1	0/17	0	não linfo-epit	–	SHOUSA <i>et al.</i>
1995	Tailândia	PCR HIS-EBER1	6/55	11	não linfo-epit	Células tumorais Epitélio displásico	HARN <i>et al.</i>
1996	Japão	HIS-EBER1	22/26	84,6	Linfoepitelial	Células tumorais	MATSUNOU <i>et al.</i>
1996	Coréia	HIS-EBER1	12/89	13,5	não linfo-epit	Células tumorais	SHIN <i>et al.</i>
1996	França	HIS-EBER1	5/59	8,5	não linfo-epit	Células tumorais Linfócitos infiltrados	SELVES <i>et al.</i>
1996	EUA	HIS-EBER1	11/95	12	não linfo-epit	Células tumorais Epitélio displásico	GULLEY <i>et al.</i>
1997	Rússia	HIS-EBER1	18/206	8,7	não linfo-epit	Células tumorais	GALETSKY <i>et al.</i>
1999	Japão	HIS-EBER1	33/513	6,4	não linfo-epit	Células tumorais Linfócitos infiltrados	TAKANO <i>et al.</i>
1999	México	HIS-EBER1	11/135	8,1	não linfo-epit	Células tumorais	HERRERA <i>et al.</i>
2001	Brasil	HIS-EBER1	24/300	8	não linfo-epit	Células tumorais	KORIYAMA <i>et al.</i>
2001	Japão	HIS-EBER1	23/119	19,3	não linfo-epit	Células tumorais	ISHII <i>et al.</i>
2001	Coréia	HIS-EBER1	17/306	5,6	não linfo-epit	Células tumorais Linfócitos infiltrados	CHO <i>et al.</i>
2003	Colombia	HIS-EBER1	23/178	13	não linfo-epit	Células tumorais	CARRASCAL <i>et al.</i>
2003	Japão	PCR HIS-EBER1	21/97 5/97	21,6 5,2	não linfo-epit	Células tumorais Linfócitos infiltrados	ODA <i>et al.</i>
2003	Japão	HIS-EBER1	28/417	6,7	não linfo-epit	Células tumorais	KIJIMA <i>et al.</i>
2003	Malásia	HIS-EBER1	5/50	10	não linfo-epit	Células tumorais	KARIM e PALLESEN
2004	Brasil	HIS-EBER1	6/53	11,3	não linfo-epit	Células tumorais	LOPES <i>et al.</i>
2004	Coréia	HIS-EBER1	63/1127	5,6	não linfo-epit	Células tumorais	LEE <i>et al.</i>
2004	Nova Guiné	HIS-EBER1	2/150	1,3	não linfo-epit	Células tumorais	MOREWAYA <i>et al.</i>
2004	China	PCR HIS-EBER1	13/185	7	não linfo-epit	Células tumorais	WANG <i>et al.</i>
2005	China	HIS-EBER1	11/172	6,4	não linfo-epit	Células tumorais	LUO <i>et al.</i>
2005	Kazaquistão	HIS-EBER1	14/139	10,1	não linfo-epit	Células tumorais	ALIPOV <i>et al.</i>
2005	Peru	HIS-EBER1	10/254	3,9	não linfo-epit	Células tumorais	YOSHIWARA <i>et al.</i>

Durante as análises dos casos à microscopia óptica, percebeu-se eventualmente uma marcação de cor marrom, característica do cromógeno empregado (diaminobenzidina), presente no citoplasma de células não-neoplásicas dispostas em arranjos glandulares (figura 34d). Em alguns desses casos, a repetição da técnica foi realizada omitindo a aplicação do anticorpo anti-biotina (que se liga a molécula repórter da sonda oligonucleotídica), persistindo

os resultados iniciais. Destarte, concluiu-se que o referido achado tratava-se de marcação inespecífica, que segundo Gulley *et al.* (2002), pode ser decorrente de reação cruzada com mucina.

De acordo com Gulley *et al.* (2002), resultados falso-negativos podem ocorrer em consequência da degradação de RNA. Baseado nessa possibilidade pressupôs que, condições adversas desde a coleta até o processamento e inclusão do tecido em parafina oferecem riscos para o RNA celular, podendo resultar em casos falso-negativos com consequente subestimativa da frequência encontrada. Diante disso, 29 casos foram submetidos à técnica de hibridação *in situ* utilizando sistema de detecção mais sensível (kit GenPoint[®]) à base de biotínil-tiramida, a qual é capaz de catalisar a biotina tecidual amplificando o sinal da marcação. Esse sistema é comprovadamente sensível para detecção de HPV (Papilomavírus humano) por hibridação *in situ*, o qual é comercializado como sistema capaz de detectar até uma cópia do genoma viral (LIZARD *et al.*, 2001; EVANS *et al.*, 2003). Os resultados obtidos com essa técnica foram idênticos aos da técnica usual, diferindo apenas na constatação eventual de marcação citoplasmática em granulócitos, provavelmente relacionada a uma produção mais intensa de peróxido de hidrogênio por estas células, resultando em marcação inespecífica. Assim, o valor encontrado neste trabalho reflete a real frequência de EBV em carcinomas gástricos da população estudada expressando EBER1.

Dentre os oito casos positivos, seis demonstraram um padrão de marcação intenso e difuso, acometendo praticamente todas as células tumorais observáveis do tecido seccionado, enquanto que os outros dois casos exibiram um padrão focal de marcação. De acordo com Takada (2000), a presença do vírus na maioria, senão em todas as células tumorais, indica que o EBV exerce um papel importante no desenvolvimento destes tumores. Entretanto, a presença do vírus em uma porção de células tumorais sugere que a infecção tenha ocorrido após a transformação neoplásica (LUO *et al.*, 2005).

A correlação entre a presença do EBV e o sexo dos indivíduos, demonstrou um acometimento predominante no sexo masculino, concordando com os resultados da maioria dos estudos (SHIBATA e WEISS, 1992; TOKUNAGA *et al.*, 1993b; HARN *et al.*, 1994; OSATO e IMAI, 1996; GALETSKY *et al.*, 1997; TAKANO *et al.*, 1999; ISHII *et al.*, 2001; CARRASCAL *et al.*, 2003; ODA *et al.*, 2003; KORIYAMA *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2004; ZUR HAUSEM *et al.*, 2004; LOPES *et al.*, 2004; ALIPOV *et al.*, 2005). Não foi observada associação com a cor dos pacientes, sugerindo que a infecção ocorra indiscriminadamente entre os indivíduos, contudo, não foram encontrados estudos investigando tal variável e, além disso, a elevada miscigenação da população estudada representaria outro fator que dificultaria a confrontação de estudos. A respeito das faixa-etárias, notou-se uma redução no intervalo 55-

64 anos, contudo, é importante ressaltar que o pequeno número de casos EBV positivos (8) pode ser responsável por essas variações. Apesar disso, a média de idade dos casos EBV positivos mostrou-se similar aos resultados obtidos por Takano *et al.* (1999), Oda *et al.* (2003) e Lopes *et al.* (2004), respectivamente 60,2, 59,4 e 59.

Embora alguns autores relacionem o tipo sanguíneo com o desenvolvimento de câncer de estômago, não há relatos da associação com o EBV em carcinomas gástricos. No presente estudo dois achados chamaram a atenção, primeiro, a elevação significativa do tipo B+ nos casos EBV positivos, considerando que os pacientes com esse tipo sanguíneo corresponderam a uma pequena parcela. Segundo, que todos os casos EBV positivos acometeram indivíduos com fator Rh positivo. Esses dados podem indicar uma maior predisposição dos indivíduos com fator Rh+, sobretudo àqueles do tipo B+, a desenvolver carcinomas infectados pelo EBV.

Quanto à localização anatômica das neoplasias, notou-se uma elevação percentual dos tumores EBV positivos localizados na cárdia. Esse dado condiz com os achados de estudos realizados em diversas partes do mundo (CARRASCAL *et al.*, 2003; TAKANO *et al.*, 1999; ZUR HAUSEM *et al.*, 2004; KIJIMA *et al.*, 2000). Outros autores apontam a cárdia e o corpo, como os sítios anatômico mais relacionados com a presença do EBV, não apresentando diferenças entre ambos (TOKUNAGA *et al.*, 1993b; FUKAYAMA *et al.*, 1994; OSATO e IMAI, 1996; GALETSKY *et al.*, 1997; TAKADA, 2000; KORIYAMA *et al.*, 2004; YOSHIWARA *et al.*, 2005). Contudo, no atual estudo a região do corpo gástrico exibiu uma leve redução. Poucos estudos relatam à predominância da região antral com tumores EBV positivos e como demonstrado neste trabalho, não houve diferença quando comparado ao grupo de casos não infectados (LOPES *et al.*, 2004; HERRERA-GOEPFERT *et al.*, 1999).

No que se refere ao estadiamento neoplásico, observou-se uma maior associação do EBV com tumores mais avançados, destacando-se o estadiamento IIIB, que apresentou um importante aumento em relação aos casos EBV negativos. Entretanto, alguns autores relatam que, em geral os indivíduos que apresentam carcinomas EBV positivos demonstram um melhor prognóstico (KIJIMA *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2004). Concordando com esses relatos, neste estudo não foi verificada associação entre a presença do EBV e o desenvolvimento de metástases à distância. Assim, baseado nos resultados apresentados e os dados da literatura, acredita-se que o vírus possa influenciar na progressão maligna, possivelmente através da desregulação de genes celulares envolvidos na proliferação celular e/ou apoptose, não devendo estar relacionado com alterações em genes envolvidos na adesão celular, mecanismo o qual favoreceria o desenvolvimento de metástases à distância.

O envolvimento do EBV quanto ao tipo histológico de Lâuren ainda é muito controverso, alguns autores corroboram o predomínio, como aqui observado, de carcinomas do tipo intestinal (YUEN *et al.*, 1994; HARN *et al.*, 1994; ZUR HAUSEM *et al.*, 2004). Entretanto, vários outros observaram predomínio de tumores do tipo difuso (TOKUNAGA *et al.*, 1993b; KORIYAMA *et al.*, 2001; ODA *et al.*, 2003; KORIYAMA *et al.*, 2004; ALIPOV *et al.*, 2005) ou até mesmo, uma equivalência entre ambos os tipos (SHIBATA e WEISS, 1992; TAKADA, 2000; CARRASCAL *et al.*, 2003). Adicionalmente, Kijima *et al.* (2003), relatam que indivíduos com carcinomas do tipo intestinal EBV positivos apresentam pior prognósticos, comparado àqueles pacientes com carcinomas do tipo difuso. O que explicaria o predomínio observado de casos EBV positivos de estadiamentos avançados.

Apesar da associação do EBV ao grau de diferenciação se apresentar nos graus mais freqüentes da amostra estudada, a sua presença exclusiva nos tumores pouco e moderadamente diferenciados, sobretudo neste último, vai de encontro à literatura. A maioria dos estudos que avaliam tal critério histopatológico, também observam o predomínio dos dois referidos graus de diferenciação (LEONCINI *et al.*, 1993; GALETSKY *et al.*, 1997; TAKANO *et al.*, 1999; YOSHIWARA *et al.*, 2005), apenas alguns apontam o grau pouco diferenciado como preponderante (LEE *et al.*, 2004; ZUR HAUSEM *et al.*, 2004).

5.4.1. PCR x Hibridação *in situ*

Embora a maioria dos estudos não considere os resultados da PCR, utilizando-a apenas no rastreamento inicial para subsequente aplicação da hibridação *in situ* nos casos PCR positivos (SHIBATA e WEISS, 1992; FUKAYAMA *et al.*, 1994; HARN *et al.*, 1995; WANG *et al.*, 2004; LUO *et al.*, 2005), por esta técnica obter na maioria das vezes elevados resultados, que é justificado por muitos autores pela possibilidade de amplificação de material genético viral oriundo de linfócitos infiltrados, neste estudo ambas as técnicas foram consideradas. Dessa forma, a presente investigação consitiuiu uma das poucas análises da presença do EBV nas mesmas amostras, realizada pelas duas referidas técnicas de forma independente. A freqüência encontrada para detecção do EBV pela técnica de PCR concorda com os achados de Nakamura *et al.* (1994), que obtiveram 50% de positividade e discordaram dos dados de Leoncini *et al.* (1993) e Oda *et al.* (2003), que demonstraram positividade inferior (6,1% e 21,6%, respectivamente).

A freqüência superior de casos positivos pela reação de PCR, comparado aos resultados da técnica de hibridação *in situ* (9,8%) (figura 31), é justificada por alguns autores pela elevada sensibilidade da técnica de PCR, que poderia amplificar seqüências gênicas virais oriundas de linfócitos infiltrados no tecido tumoral, explicando assim, a ocorrência de

casos PCR positivos em tumores com hibridação *in situ* negativa (GULLEY, 2001; TSUCHIYA, 2002). Por conseguinte, esclarecer-se-ia também o elevado índice de discordância observado entre ambas as técnicas. No entanto, dentre todos os casos analisados apenas dois (nº43 e nº46) apresentaram linfócitos positivos através da hibridação *in situ* e ainda assim, um deles (nº46) foi PCR negativo, colocando em xeque a hipótese acima mencionada (ver tabela 7). Vale salientar que os dois referidos casos exibiram positividade também em células neoplásicas. Inicialmente, pensou-se que devido à diminuta quantidade de linfócitos circulantes infectados, a utilização de apenas um espécime poderia dificultar a detecção através de hibridação *in situ*. Por essa razão, em quatro casos PCR positivos, os quais foi possível a obtenção de mais de um espécime incluído em bloco de parafina, a hibridação *in situ* foi realizada, no entanto, não foi constatada a presença de linfócitos marcados. Outra possibilidade levantada referia-se a uma expressão reduzida de EBER1 em linfócitos, a níveis não detectáveis pela técnica usual. Contudo, o emprego da sensível técnica de hibridação pelo GenPoint® sem evidências de marcação em linfócitos, descartou esta última hipótese.

A discordância entre as duas técnicas é também observada pela presença de 3 casos HIS(+) e PCR(-). Dentre eles, dois casos (nº03, nº46) demonstraram padrão focal de marcação através da hibridação *in situ*, sugerindo nesta situação, que a distribuição focal de células tumorais EBV positivas, possivelmente escassa ou ausente no fragmento tecidual submetido à extração de DNA, inviabilizaram a detecção do vírus através da técnica de PCR, culminando em resultado falso-negativo. Por outro lado, o terceiro caso mencionado (nº63) apresentou um padrão de marcação difuso, tornando incabível a explicação anterior para este caso, de modo a conduzir a uma das seguintes hipóteses: (1) falha durante o experimento; (2) degradação do material genético analisado; (3) ausência ou perda do genoma viral no fragmento tecidual submetido à extração de DNA. Diante desse evento a repetição da técnica foi procedida, reafirmando o resultado primário. Adicionalmente, com o objetivo de avaliar a qualidade do material genético, todos os 61 casos foram submetidos à amplificação do quinto exon do gene celular *p53*, obtendo resultados satisfatórios em todos eles. Dessa forma, admitiu-se que a negatividade da PCR neste caso em particular, tenha decorrido da terceira hipótese sugerida, indicando que o vírus não estava presente em todo tumor.

Os achados demonstrados no presente estudo acerca dos resultados da PCR suscitam a seguinte questão: Como explicar a elevada positividade do vírus através da técnica de PCR, frente ao baixo número de linfócitos EBV positivos infiltrados no tecido tumoral? Neste contexto, Oda *et al.* (2003) analisando separadamente os casos com células tumorais EBV negativas por hibridação *in situ*, obtiveram: 14 casos PCR negativos, com presença de

linfócitos positivos por hibridação *in situ*; e 10 casos PCR positivos, mas sem evidências de linfócitos infectados pelo EBV. Esses achados sugerem que o resultado da PCR, pelo menos em parte, não esteja relacionado com a presença de linfócitos no tecido gástrico. Além disso, diversos trabalhos têm demonstrado a presença do EBV em células de tecido displásico localizado na periferia dos tumores, através de hibridação *in situ* direcionada aos EBERs (SHIBATA e WEISS, 1992; YUEN *et al.*, 1994; HARN *et al.*, 1995; GULLEY *et al.*, 1996; ARIKAWA *et al.*, 1997). Não obstante, alguns autores têm demonstrado a presença do vírus até mesmo em células da mucosa gástrica normal que cercam os tumores (FUKAYAMA *et al.*, 1994; SHOUSA e LUQMANI, 1994). Curiosamente, Yanai *et al.* (1997) constataram em dois casos de gastrite atrófica crônica, a presença de EBV em células do epitélio displásico, somente quando utilizaram a hibridação *in situ* direcionada ao genoma viral, não observando positividade através da técnica convencional que tem como alvo o RNA viral EBER1.

Essa compilação de achados leva o presente estudo a sugerir que a infecção pelo EBV possa ocorrer no epitélio gástrico normal e que possivelmente nos estágios iniciais o vírus apresente um comportamento distinto, isto é, um padrão de latência diferente do que é observado nas células neoplásicas, caracterizado talvez pela ausência de EBERs. Isso explicaria os resultados de Yanai *et al.* (1997), referentes à detecção de EBV no epitélio displásico exclusivamente pela hibridação *in situ* para o genoma viral. Também esclareceria a elevada positividade da técnica de PCR, sem evidências de células tumorais e/ou linfócitos marcados através da hibridação *in situ* usual, vale lembrar que os espécimes do presente estudo, dos quais foi extraído DNA, não eram constituído exclusivamente de células tumorais (>70%), apresentando por vezes tecido pré-neoplásico e/ou normal. Dessa forma, admite-se que em alguns casos o EBV não esteja presente nas células tumorais, talvez por não estar diretamente envolvido na tumorigênese, mas a presença do genoma viral no tecido periférico (normal e/ou pré-neoplásico), resulta em amplificação através da técnica de PCR.

Frente a essa incógnita, o seguimento proposto para a complementação desse estudo é a realização de estudos utilizando técnicas mais sensíveis de hibridação *in situ*, com sondas complementares à seqüências do genoma viral, preferencialmente da região amplificada ou das regiões de repetição, tais como região BamHI W, que permitam aumentar a acurácia do experimento, objetivando dessa forma, atestar a hipótese sugerida.

A despeito da expressão dos EBERs nos quatro padrões de latência estabelecidos (tabela 1), alguns autores já relataram a ausência destes RNAs virais em outras neoplasias associadas ao EBV, é o caso do carcinoma hepatocelular (SUGAWARA *et al.*, 1999; CHU *et al.*, 2001) e o carcinoma de mama (BONNET *et al.*, 1999; GINSTEIN *et al.*, 2002),

demonstrando que o vírus é capaz de silenciar tais genes durante infecções latentes, reforçando assim a hipótese proposta no presente estudo.

Por outro lado, alguns trabalhos têm demonstrado a expressão de determinados genes líticos (BcLF1, BHRF1, BZLF1), através da técnica de RT-PCR (WANG *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2005b; LUO *et al.*, 2005). Nestes estudos, também não se tem conhecimento de quais células os transcritos são provindos, podendo talvez ser oriundos das células epiteliais normais/pré-neoplásicas do tecido peri-tumoral. Essa possibilidade também se mostra coerente, pois durante as infecções líticas os EBERs não são transcritos (RAAB-TRAUB, 2002). Adicionalmente, o BHRF1 um homólogo da proteína BCL-2, pode representar vias alternativas do EBV, para a promoção da transformação tumoral.

Decerto, a constatação do EBV no epitélio normal e em lesões pré-neoplásicas, aliado ao caráter monoclonal do genoma viral observado nos adenocarcinomas gástricos EBV positivos (IMAI *et al.*, 1994; OTT *et al.*, 1994; FUKAYAMA *et al.*, 1994; HARN *et al.*, 1995; GULLEY *et al.*, 1996), reforçam a tese da infecção precoce da mucosa gástrica e a participação do mesmo no desenvolvimento neoplásico, sugerindo que estas neoplasias sejam decorrentes da proliferação clonal a partir de uma célula primária previamente infectada.

Uma das características gênicas que diferenciam o EBV é a presença da deleção de 30pb do gene viral da LMP1. Neste estudo, observou-se um discreto predomínio das cepas que não apresentaram a deleção (45,8%) e em 16,7% dos casos constatou-se a existência de co-infecção. Nos estudos de Takano *et al.* (1999) e Lee *et al.* (2004), observou-se um predomínio das cepas com a referida deleção (87,5% e 92,7%, respectivamente), no entanto, foram analisados apenas os casos que obtiveram confirmação da presença do vírus em células tumorais, através de hibridação *in situ*, podendo esse critério ser a causa da discrepância verificada, já que no presente estudo apenas um dos vinte e quatro casos analisados teve confirmação por hibridação *in situ*. De acordo com alguns estudos, as cepas que apresentam a referida deleção exibem elevada associação com o genótipo 1 do EBV (CHEN *et al.*, 1996; HIGA, 2002; HIGA, 2003; LEE *et al.*, 2004), podendo os achados expostos neste estudo, refletir a prevalência dos genótipos na amostra examinada. Embora alguns autores considerem que as cepas com a deleção apresentem um potencial oncogênico mais elevado (KNECHT, 1997; LEE *et al.*, 2004), não foi possível inferir algo a respeito, pois a análise da deleção foi realizada apenas em um dos seis casos positivos pela hibridação *in situ*. Contudo, considerando os 24 casos analisados, nenhuma associação foi constatada com estadiamento dos tumores, tão pouco com a presença de metástase à distância.

5.5. Correlação do EBV com as Oncoproteínas Celulares

Embora os resultados da PCR possam ser decorrentes da presença de vírus em outras células, que não as tumorais, estes foram também confrontados com a imuno-marcação das oncoproteínas nas células tumorais. Contudo, a similaridade dos resultados de positividade e escores de marcação encontrados entre os casos positivos e negativos através da PCR, sugere que os vírus ali presentes (células epiteliais normais, pré-neoplásicas e/ou linfócitos), não exerçam efeito sobre a expressão das proteínas estudadas no processo neoplásico instalado.

Quanto à correlação entre a presença do vírus demonstrada por hibridação *in situ* e a imuno-marcação, verificou-se que nenhum dos casos EBV positivos exibiram positividade para a proteína BCL-2. Esse resultado se contrapõe as expectativas deste trabalho, considerando as evidências observadas em estudos *in vitro*, acerca do efeito dos expressos virais EBER1 e BARP1 (ambos descritos em carcinomas gástricos) sobre o aumento na expressão da oncoproteína BCL-2 (WANG *et al.*, 2005a; SHENG *et al.*, 2001; KOMANO *et al.*, 1999). Embora, Kume *et al.* (1999) tenham verificado uma expressão mais elevada de BCL-2 em tumores EBV positivos, outros autores não reproduziram tal achado, constatando de modo geral, positividade mais baixa nos carcinomas EBV associados (GULLEY *et al.*, 1996; ISHII *et al.*, 2001; LEE *et al.*, 2004). Já Wang *et al.* (2005b), verificaram baixos índices apoptóticos nos tumores infectados usando o ensaio TUNEL (do inglês, *terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP-biotin nick end-labeling*), mas sem diferenças quanto a expressão de BCL-2 em ambos os grupos (EBV positivo e negativo).

Em relação à expressão de BAX, notou-se uma importante redução dos valores de imuno-marcação nos casos EBV positivos, principalmente dos escores de marcação (LI e H-score). Não foram encontrados relatos na literatura mundial sobre a relação do EBV com a expressão da proteína pró-apoptótica BAX em carcinomas gástricos, impedindo uma confrontação com os resultados obtidos. Contudo, diante desses achados é razoável pensar que a supressão de fatores pró-apoptóticos seja um mecanismo utilizado pelo vírus para inibir a apoptose. Embora a maioria dos casos aqui estudados tenha demonstrado orientação pró-apoptótica, dentre os oito casos EBV positivos, cinco apresentaram um equilíbrio entre as proteínas BCL2/BAX. Tal achado, somado aos baixos índices apoptóticos verificados por Wang *et al.* (2005b) em casos EBV positivos, reforçam a hipótese supracitada. Entretanto, como mencionado anteriormente, a apoptose é um processo complexo que envolve uma série de fatores (pró-apoptóticos e anti-apoptóticos), portanto, estudos que desenvolvam análises mais amplas seriam fundamentais para definir se o bloqueio da apoptose é realmente um dos mecanismos virais na transformação celular.

Seguindo o mesmo padrão da BAX a expressão da proteína c-MYC nuclear também exibiu, frente aos casos EBV negativos, uma notável redução do percentual de casos positivos

e dos escores de marcação nos casos EBV positivos. Contrariamente, Ishii *et al.* (2001) demonstraram valores de positividade equivalentes entre os casos EBV positivos e negativos (26,0 e 23,9%, respectivamente). No entanto, vale salientar que no referido estudo as marcações nucleares e citoplasmáticas foram consideradas indiscriminadamente, ao contrário do presente estudo, que realizou análises separadamente. Dessa forma, esse critério pode ser o responsável pela discrepância notada.

Como demonstrado por Niller *et al.* (2003), o gene EBER1 apresenta uma seqüência consenso para a ligação da oncoproteína c-MYC, localizada 130pb acima do gene viral, indicando que a proteína c-MYC poderia estar envolvida com o aumento da expressão de EBER1. Os resultados apresentados no presente estudo demonstraram que, dentre os oito casos EBV positivos apenas um foi positivo para a proteína c-MYC. Baseado nesses dados sugere-se que a referida proteína possa até aumentar a expressão de EBER1, mas a expressão de EBER1 independe da ativação pela c-MYC.

A avaliação da marcação citoplasmática demonstrou valores mais elevados de positividade e média de escores nos casos EBV positivos, sem a presença de marcação nuclear concomitante em nenhum caso. Esses resultados sugerem que o vírus não esteja associado com a superexpressão de c-MYC no núcleo das células tumorais, onde esta pode desempenhar suas funções e, portanto, contribuir na oncogênese. Alternativamente, os resultados apontam para um possível envolvimento com mecanismos de transporte da membrana nuclear, que possam bloquear a entrada da proteína c-MYC recém-traduzida, no núcleo das células neoplásicas, culminando no acúmulo da mesma no citoplasma o que explicaria a detecção exclusivamente citoplasmática. A escassez de trabalhos relacionando o EBV com a expressão de c-MYC em carcinomas gástricos, seja nuclear ou citoplasmática, denotam a importância do presente estudo na elucidação dos intricados mecanismos virais.

De modo geral, a hipótese levantada neste estudo sobre uma possível via tumorigênica induzida pelo EBV (figura 10), baseada no aumento da expressão de BCL-2 mediado pelos expressos virais BARF1 e/ou EBER1 (KOMANO *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 2005a) e na superexpressão de c-MYC promovida possivelmente pelo EBNA1 (AMBINDER e MANN, 1994; DROTAR *et al.*, 2003) parece não ocorrer de fato. Esse panorama sugere que os efeitos constatados *in vitro*, analisando o comportamento de linhagens celulares frente à presença de componentes virais, parecem não ocorrer *in vivo*, onde os vírus têm de subsistir em meio a diversos fatores celulares, tais como a complexa rede de sinais intra e/ou extracelulares e o sistema imune do organismo. Neste contexto, sugere-se que o EBV possa atuar através de outros mecanismos ou como no caso do processo apoptótico, por outros fatores, para favorecer o desenvolvimento tumoral.

6. Conclusões

- A técnica de hibridação *in situ* para a detecção do EBV em adenocarcinomas gástricos foi implantada com êxito no Laboratório de Genética Molecular;
- A frequência do EBV (8%) nos adenocarcinomas gástricos oriundos de uma população do Ceará apresentou, diante dos diversos valores obtidos no mundo, valor intermediário, aproximando-se dos valores encontrados no sul do Brasil e de países como a China, Rússia, França e México;
- A presença do EBV foi associada à adenocarcinomas gástricos do tipo intestinal, de grau moderadamente diferenciado, de estadiamento avançado, presentes preferencialmente na cárdia;
- A elevada positividade da técnica de PCR, frente à baixa detecção de linfócitos infectados, indica que o vírus possa estar presente no epitélio normal e/ou pré-neoplásico, exibindo padrão de expressão com ausência de EBER1;
- Dentre as proteínas analisadas a BCL-2 apresentou a menor positividade e em geral demonstrou maior associação com tumores localizados na cárdia, do tipo difuso, pouco diferenciados e de estadiamento avançado;
- As proteínas BAX e c-MYC (nuclear) exibiram valores de positividade e escores de marcação significativos, apontando para uma importante relação no desenvolvimento dos adenocarcinomas gástricos;
- A proteína c-MYC (citoplasmática) apresentou baixa positividade, estando de modo geral, mais associada com tumores do tipo intestinal, moderadamente diferenciados;
- Os resultados verificados no presente estudo indicam que o EBV não esteja relacionado com a expressão da proteína BCL-2 em adenocarcinomas gástricos, demonstrando que os efeitos constatados em experimentos *in vitro* não ocorrem igualmente *in vivo*, por outro lado, a supressão da proteína pró-apoptótica BAX pode ser um mecanismo viral para inibição da apoptose;
- Não houve correlação da presença do EBV com a superexpressão da proteína c-MYC nuclear e a expressão de EBER1 mostrou-se independente da ativação c-MYC;
- O elevado percentual de positividade da proteína c-MYC (citoplasmática) em tumores EBV positivos, aponta para um possível envolvimento do vírus com mecanismos de transporte da membrana nuclear, determinando o acúmulo da proteína no citoplasma das células tumorais;

- A deleção de 30pb no gene da LMP1 ocorreu em 37,5% dos casos PCR positivo analisados, mas não demonstrou associação quanto ao estadiamento tumoral ou a constatação de metástase à distância;
- A hipótese formulada no presente estudo referente a uma possível via tumorigênica induzida pelo EBV, baseada no aumento da expressão de BCL-2 e na superexpressão de c-MYC em adenocarcinomas gástricos, parece não ocorrer de fato *in vivo*.

7. Referências Bibliográficas

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

ALBERTS, B. *et al.* **Biologia Molecular da Célula.** 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

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

ALIPOV, G. *et al.* Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma in Kazakhstan. **World J. Gastroenterol.**, v. 11, n. 1, p. 27-30, Jan. 2005.

ALLDAY, M. J.; FARREL, P. J. Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA3C/6 expression maintains the level of latent membrane protein in G1-arrested cells. **J. Virol.**, v. 68, p. 3491-3498, 1994.

AMATI, B.; ALEVIZOPOULOS, K.; VLACH, J. Myc and the cell cycle. **Front. Biosci.**, v. 3, p. 250-268, 1998.

AMBINDER, R. F. Gammaherpesviruses and “Hit-and-Run” oncogenesis. **Am. J. Pathol.**, v. 156, n. 1, p. 1-3, 2000.

AMBINDER, R. F. *et al.* Definition of the sequence requirements for binding of the EBNA1 protein to its palindromic targets sites in Epstein-Barr virus DNA. **Journal Of Virology**, v. 64, p. 2369-2379, 1990.

AMBINDER, R. F. *et al.* Functional Domains of Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen EBNA-1. **Journal Of Virology**, v. 65, n.3, p. 1466-1478, Mar. 1991.

AMBINDER, R. F.; MANN, R. B. Detection and characterization of Epstein-Barr virus in clinical specimens. **Am. J. Pathol.**, v. 145, n. 2, p. 239-252, Aug. 1994.

ANTONSSON, B.; MARTINOU, J-C. The Bcl-2 protein family. **Exp. Cell Res.**, v. 256, p. 50-57, 2000.

ARIKAWA, J. *et al.* Epstein-Barr virus-positive multiple early gastric cancers and dysplastic lesions: a case report. **Pathol Int.**, v. 47, n. 10, p. 730-734, Oct. 1997.

ARRAND, J. R. *et al.* Molecular cloning of the complete Epstein-Barr virus genome as a set of overlapping restriction endonuclease fragments. **Nucleic Acids Research**, v. 9, n. 13, 1981.

BACCHI, C. E. *et al.* AIDS-related lymphoma in Brazil. Histopathology, immunophenotype, and associated with Epstein-Barr virus. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 105, n. 2, p. 230-237, Feb. 1996.

BAUMFORTH, K. R. N. *et al.* The Epstein-Barr Virus and its association with human cancers. **J. Clin. Pathol.: Mol. Pathol.**, v. 52, p. 307-322, 1999.

BONNET, M. *et al.* Detection of Epstein-Barr virus in invasive breast cancers. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 91, n. 16, p. 1376-1381, Aug. 1999.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativas 2005: Incidência de Câncer no Brasil**, Rio de Janeiro: INCA, 2004. Disponível em: <http://www.inca.gov.br> Acesso em: 10 fev. 2005

BURKE, A. P. *et al.* Lymphoepithelial carcinoma of the stomach with Epstein-Barr virus demonstrated by polymerase chain reaction. **Mod. Pathol.**, v. 3, p. 377-380, 1990.

CALLAN, M. F. C. The immune response to Epstein-Barr virus. **Microbes and Infection**. v. 6, p. 937-945, 2004.

CARRASCAL, E. *et al.* Epstein-Barr virus associated gastric adenocarcinoma in Cali, Colombia. **Oncol. Rep.**, v. 10, n. 4, p. 1059-1062, July-Aug. 2003.

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, out/dez. 2002.

CHEN, W. G. *et al.* Genotyping of Epstein-Barr virus in Brazilian Burkitt's lymphoma and reactive lymphoid tissue. Type A with a high prevalence of deletions within the latent membrane protein gene. **Am. J. Pathol.**, v. 148, p. 17-23, 1996.

CHO, Y. J. *et al.* In Situ Hybridization of Epstein-Barr Virus in Tumor Cells and Tumor-Infiltrating Lymphocytes of the Gastrointestinal Tract. **Human Pathology**, v. 32, n. 3, p. 297-301, Mar. 2001.

CHONG, J-M. *et al.* Global and Non-Random CpG-island Methylation in Gastric Carcinoma Associated With Epstein-Barr Virus. **Cancer Science**, v.94, n. 1, p. 76-80, Jan. 2003.

CHU, P. G. *et al.* Epstein-Barr Virus (EBV) Nuclear Antigen (EBNA)-4 Mutation in EBV-Associated Malignancies in Three Different Populations **American Journal of Pathology**, v. 155, n. 3, Sept. 1999.

CHU, P. G. *et al.* No direct role for Epstein-Barr virus in American hepatocellular carcinoma. **Am. J. Pathol.**, v. 159, n. 4, p. 1287-92, Oct. 2001.

CHUANG, T. C. *et al.* The Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 may act as a transforming suppressor of the HER2/neu oncogene. **FEBS Letters**. v. 532, p. 135-142, 2002.

CIPRIANI, F.; BUIATTI, E.; PALLI, D. Gastric cancer in Italy. **Ital. J. Gastroenterol.**, v. 23, n. 7, p. 429-435, Sept. 1991.

CLUDTS, I.; FARRELL, P. J. Multiple Functions Within The Epstein-Barr Virus EBNA-3A Protein. **Journal Of Virology**, v. 72, n. 3, p. 1862-1869, Mar. 1998.

CORREA, P. Helicobacter Pylori Infection and Gastric Cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 12, p.238-241, mar. 2003.

- COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, S. L. (Eds.) **Robbins-Patologia Estrutural e Funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- CUNNINGHAM, S. C. *et al.* Survival After Gastric Adenocarcinoma Resection: Eighteen-Year Experience at a Single Institution. **Gastrointestinal Surgery**, v. 9, n. 5, p. 718-725, 2005.
- DE STEFANI, E. *et al.* Alcohol drinking and tobacco smoking in gastric cancer. A case-control study. **Rev. Epidemiol. Sante Publique**, v. 38, n. 4, p. 297-307, 1990.
- DOLCETTI, R.; MASUCCI, M. G. Epstein-Barr Virus: Induction and Control of Cell Transformation. **Journal of Cellular Physiology**, v. 196, p. 207-218, 2003.
- DROTAR, M. E. *et al.* Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen-1 and Myc Cooperate in Lymphomagenesis. **Int. J. Cancer**, v. 106, p. 388-395, 2003.
- ELEND, M.; EILERS M. Cell growth: Downstream of Myc – to grow or to cycle? **Current Biology**, v. 9, n. 24, p. 936-938, 1999.
- ELIOPOULOS, A. G. *et al.* Epstein-Barr Virus-Encoded Latent Membrane Protein 1 Activates the JNK Pathway through Its Extreme C Terminus via a Mechanism Involving TRADD and TRAF2. **Journal of Virology**, v. 73, n. 2, p. 1023-1035, Feb. 1999a.
- ELIOPOULOS, A. G. *et al.* Activation of the p38 Mitogen-activated Protein Kinase Pathway by Epstein-Barr Virus-encoded Latent Membrane Protein 1 Coregulates Interleukin-6 and Interleukin-8 Production. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 23, p. 16085-16096, June. 1999b.
- ELLERMANN, V.; BANG, O. Experimentelle leukämie bei Hühnern. **Zentralbl. Bakt. Abt. I (Orig.)**, v. 46, p. 595-609, 1908.
- ESPEJO, E. J.; NAVARRETE, S. J. Classification of stomach adenocarcinomas. **Rev. Gastroenterol. Peru**, v. 23, n. 3, p. 199-212, 2003.
- EPSTEIN, M. A. Historical background. **Phil. Trans. R. Soc. Lond B.**, v. 356, p. 413-420, 2001.
- EPSTEIN, M. A.; ACHONG, B. G.; BARR, Y. M. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. **Lancet**, p. 702-703, 1964.
- EVANS, M. F.; ALIESKY, H. A.; COOPER, K. Optimization of biotinyl-tyramide-based *in situ* hybridization for sensitive background-free applications on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens. **BMC Clinical Pathology**, v. 3, n. 2, p. 1-17, June. 2003.
- EVANS, A. S.; NIDERMAN, J. C.; MCCOLLUM, R. W. Seroepidemiologic studies of infectious mononucleosis with EB virus. **New England Journal of Medicine**, v. 279, p. 1121-1127, 1968.
- FARIA, M. H. G. **Estudo Imuno-histoquímico das Alterações Moleculares nos Astrocitoma: Vias Tumorigênicas, Alvos Terapêuticos e Indicadores de Resistência**. 2005. 168 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará. Fortaleza.

- FARIA, M.H.G.; RABENHORST, S.H.B. Impacto do oncogene *C-MYC* no câncer. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 52, n. 1, p. *in press*, 2006.
- FOSTER, G. D.; TWELL, D. **Plant Gene Isolation. Principles and Pratics.** England: John Wiley & Sons Ltd., p 426, 1996.
- FUKAYAMA, M. *et al.* Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma and Epstein-Barr virus infection of the stomach. **Lab. Invest.**, v. 71, n. 1, p. 73-81, July. 1994.
- GALETSKY, S. A. *et al.* Epstein-Barr-virus associated-gastric cancer in Russia. **Int. J. Cancer**, v. 73, p. 786-789, 1997.
- GARDNER, L.; LEE, L.; DANG, C. myc oncogene. In: BERTINO, J. R. (Org.). **Encyclopedia of Cancer**, 2. ed., vol. 2. Orlando: Academic Press, 2002.
- GRANDORI, C. *et al.* The Myc/Max/Mad Network and the Transcriptional Control of Cell Behavior. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v.16, p. 653-699. 2000.
- GRINSTEIN, S. *et al.* Demonstration of Epstein-Barr virus in carcinomas of various sites. **Cancer Res.**, v. 62, n. 17, p. 4876-4878, Sept. 2002.
- GULLEY, M. L. Molecular diagnosis of Epstein-Barr virus-related diseases. **J. Mol. Diagn.**, v. 3, n. 1, p. 1-10, Feb. 2001.
- GULLEY, M. L. *et al.* Epstein-Barr virus infection is an early event in gastric carcinogenesis and is independent of bcl-2 expression and p53 accumulation. **Hum. Pathol.**, v. 27, n. 1, p. 20-27, Jan. 1996.
- GULLEY, M. L. *et al.* Guidelines for Interpreting EBER In Situ Hybridization and LMP1 Immunohistochemical Tests for Detecting Epstein-Barr Virus in Hodgkin Lymphoma. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 117, n. 2, p. 259-267, 2002.
- HARN, H. J. *et al.* Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinoma in Taiwan. **Hum. Pathol.**, v. 26, n. 3, p. 267-271, Mar. 1995.
- HENLE, G.; HENLE, W; DIEHL, V. Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 59, p. 94-101, 1968.
- HERMEKING, H.; EICK, D. Mediation of c-Myc-Induced Apoptosis by p53. **Science**, v. 265, p. 209-211, 1994.
- HERRERA-GOEPFERT, R. *et al.* Epstein-Barr-virus associated gastric carcinoma in Mexico: Analysis of 135 consecutive gastrectomies in two hospitals. **Mod. Pathol.**, v. 12, p. 873-878, 1999.
- HERRERO, J.A.; MATHEW, P.; PAYA, C. V. LMP-1 Activates NF-kB by Targeting the Inhibitory Molecule IkBa. **Journal of Virology**, v. 69, n. 4, p. 2168-2174, Apr. 1995.
- HIGA, M. *et al.* Epstein-Barr virus (EBV) subtype in EBV related oral squamous cell carcinoma in Okinawa, a subtropical island in southern Japan, compared with Kitakyushu and Kumamoto in mainland Japan. **J. Clin. Pathol.**, v. 55, p. 414-423, 2002.

HIGA, M. *et al.* Epstein-Barr virus (EBV)-related oral squamous cell carcinoma in Okinawa, a subtropical island, in southern Japan- simultaneously infected with human papillomavirus (HPV). **Oral Oncology**, v. 39, p. 405-414, 2003.

HOCKENBERY, D. *et al.* Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. **Nature**. v. 348, p. 334-337, Nov. 1990.

HSIEH, W. S.; AMBINDER, R. F.; LEMAS, M. V. The biology of Epstein-Barr virus in post-transplant lymphoproliferative disease. **Transplant Infectious Disease**, v. 1, p. 204-212, 1999.

HSU, S.M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 29, p. 577-580, 1981.

HUEBER, A. O. *et al.* Requirement for the CD95 receptor-ligand pathway in c-Myc-induced apoptosis. **Science**, v. 278, p. 1305-1309, 1997.

IARC - International Agency for Research on Cancer. **Epstein-Barr virus and Kaposi's sarcoma herpesvirus/human herpesvirus 8**. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, v.70, Lyon, 1997.

IMAI, S. *et al.* Gastric carcinoma: Monoclonal epithelial malignant cells expressing Epstein-Barr virus latent infection protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, p. 9131-9135. 1994.

IMAI, S.; NISHIKAWA, J.; TAKADA, K. Cell-to-Cell Contact as an Efficient Mode of Epstein-Barr Virus Infection of Diverse Human Epithelial Cells. **American Society for Microbiology**, v. 72, n. 5, p. 4371-4378, 1998.

INADA, T. *et al.* Bcl-2 expression as a prognostic factor of survival of gastric carcinoma. **Anticancer Res.**, v. 18, n. 3b, p. 2003-2010, May-Jun. 1998.

ISHII, H. *et al.* Interrelationship between Epstein-Barr virus infection in gastric carcinomas and the expression of apoptosis-associated proteins. **Histopathology**, v. 38, p. 111-119, 2001.

ISHII, H. *et al.* Apoptosis and cell proliferation in the development of gastric carcinomas: Associations with c-myc and p53 protein expresión. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 17, p. 966-972, 2002.

KANG, G. H. *et al.* Epstein-Barr Virus-Positive Gastric Carcinoma Demonstrates Frequent Aberrant Methylation of Multiple Genes and Constitutes CpG Island Methylator Phenotype-Positive Gastric Carcinoma. **American Journal of Pathology**, v. 160, n. 3, p.787-794, 2002.

KARIM, N.; PALLESEN, G. Epstein-Barr virus (EBV) and gastric carcinoma in Malaysian. **Malays J. Pathol.**, v. 25, n. 1, p. 45-47, June. 2003.

KHAN, G. *et al.* Epstein-Barr virus Infection and bcl-2 Proto-oncogene expression. **American Journal of Pathology**, v. 143, n. 5, p.1270-1274, Nov. 1993.

KIEFF, E. Epstein-Barr virus and its replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. *et al.* **Fundamental Virology**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996. p. 1109-1163.

- KIJIMA, Y. *et al.* The comparison of prognosis between Epstein-barr virus (EBV)-positive gastric carcinomas and EBV-negative ones. **Cancer Letters**, v. 200, p. 33-40, 2003.
- KLUMB, C. E. Biologia e Patogênese dos Linfomas Não Hodgkin de Origem B na Infância: Uma Revisão. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 3, p. 291-301, 2001.
- KNECHT, H. *et al.* Epstein-Barr virus oncogenesis. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, v. 26, n. 2, p. 117-35, July. 1997.
- KOMANO, J. *et al.* Oncogenic role of Epstein-Barr virus-encoded RNAs in Burkitt's lymphoma cell line Akata. **J. Virol.**, v. 73, p. 9827-9831, 1999.
- KOMATSU, K. *et al.* Expresión of Bcl-2 and Bax in human gastric cancer tissue. **Nippon Rinsho**, v. 54, n. 7, p. 1929-1934, July. 1996.
- KORIYAMA, C. *et al.* Epstein-Barr virus-associated Gastric Carcinoma in Japanese Brazilians and Non-Japanese Brazilians in São Paulo. **Jpn. J. Cancer Res.**, v. 92, p. 911-917, Sept. 2001.
- KORIYAMA, C. *et al.* Histology-specific gender, age and tumor-location distributions of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma in Japan. **Oncol. Rep.**, v. 12, n. 3, p. 543-547, Sept. 2004.
- KORSMEYER, S. J. Bcl-2 Initiates a New Category of Oncogenes: Regulators of Cell Death. **Blood**. v. 80, n. 4, p.879-886, 1992.
- KOZMA, L. *et al.* C-myc amplification and cluster analysis in human gastric carcinoma. **Anticancer Res.**, v. 21, n. 1b, p. 707-710, Jan-Feb. 2001.
- KRAJEWSKA, M. *et al.* Immunohistochemical analysis of Bcl-2 family proteins in adenocarcinomas of the stomach. **Am. J. Pathol.**, v. 149, n. 5, Nov. 1996.
- KUME, T. *et al.* Low rate of apoptosis and overexpression of bcl-2 in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. **Histopathology**, v. 34, p. 502-509, 1999.
- LANDBERG, G.; ROSS, G. Proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen expression in human haematopoietic cells during growth stimulation and differentiation. **Cell Prolif.**, v. 26, p. 427-437, 1993.
- LAURÈN, P. The Two Histological main types of Gastric Carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. **Acta Path. Microbiol. Scand.**, v. 64, p. 31-49, 1965.
- LAWERS, G. Y.; SCOTT, G. V.; KARPEH, M. S. Immunohistochemical evaluation of bcl-2 protein expression in gastric adenocarcinomas. **Cancer**, v. 75, n. 9, p. 2209-2213, May. 1995.
- LEE, E. S. *et al.* The association of Epstein-Barr virus with smooth-muscle tumors occurring after organ transplantation. **N. Engl. J. Med.**, v. 332, n. 1, p. 19-25, Jan. 1995.
- LEE, H. S. *et al.* Epstein-Barr Virus-Positive Gastric Carcinoma Has a Distinct Protein Expression Profile in Comparison with Epstein-Barr Virus-Negative Carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 10, p. 1698-1705, Mar. 2004

- LEIGHT, E. R.; SUGDEN, B. EBNA-1: A protein pivotal to latent infection by Epstein-Barr virus. **Rev. Med. Virol.**, v. 10, p. 83-100, 2000.
- LEONCINI, L. *et al.* Epstein-Barr virus and gastric cancer: data and unanswered questions. **Int. J. Cancer**, v. 53, n. 6, p. 898-901, Apr. 1993.
- LEVINE, P.H. *et al.* Elevated antibody titers to Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease. **Cancer**, v. 27, p. 416-421, 1971.
- LEVITSKAYA, J. *et al.* Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. **Nature**. v. 375, p. 685-688, 1995.
- LIMA, M. A. P.; RABERHORST, S. H. B. Associação do vírus de Epstein-Barr (EBV) com Tumores Sólidos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 2006, no prelo.
- LIZARD, G.; *et al.* In situ hybridization detection of single-copy human papillomavirus on isolated cells, using a catalyzed signal amplification system: GenPoint. **Diagn. Cytopathol.**, v. 24, n. 2, p. 112-116, Feb. 2001.
- LONGNECKER, R. Epstein-Barr virus latency: LMP2, a regulator or means for Epstein-Barr virus persistence? **Adv. Cancer Res.**, v. 79, p. 175-200, 2000.
- LOPES, L. F. *et al.* Epstein-Barr virus infection and gastric carcinoma in São Paulo State, Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 11, p. 1707-1712, 2004.
- LUO, B. *et al.* Expression of Epstein-Barr virus genes in EBV-associated gastric carcinomas. **World J. Gastroenterol.**, v. 11, n. 5, p. 629-633, Feb. 2005.
- LUTZ, W.; LEON, J.; EILERS, M. Contributions of Myc to tumorigenesis. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1602, n. 1, p. 61-71, 2002.
- LYNCH, H. *et al.* Gastric Cancer: New Genetic Developments. **Journal of Surgical Oncology (Seminars)**, v. 90, p. 114-133, 2005.
- MACMAHON, B. Epidemiology of Hodgkin's disease. **Cancer Res.**, v. 26, p. 1189-1201, 1966.
- MATSUNOU, H. *et al.* Characteristics of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma with lymphoid stroma in Japan. **Cancer**, v. 77, p. 1998-2004, 1996.
- MCCARTY, K. S. Jr. *et al.* Estrogen receptor analyses. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 109, n. 8, p. 716-721, 1985.
- MELKOUMIAN, Z. K.; MARTIROSYAN, A. R.; STROBL, J. S. Myc protein is differentially sensitive to quinidine in tumor versus immortalized breast epithelial cell lines. **Int. J. Cancer**, v. 102, n. 1, p. 60-69, 2002.
- MILLER, W.E. *et al.* Epstein-Barr Virus LMP1 Induction of the Epidermal Growth Factor Receptor Is Mediated through a TRAF Signaling Pathway Distinct from NF- κ B Activation. **Journal of Virology**, v. 71, n. 1, p. 586-594, Jan. 1997.

- MIN, K. *et al.* Poorly differentiated adenocarcinoma with lymphoid stroma (lymphoepithelioma-like carcinomas) of stomach. Report of three cases with Epstein-Barr virus genome demonstrated by polymerase chain reaction. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 96, p. 219-227. 1991.
- MOREWAYA, J. *et al.* Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma in Papua New Guinea. **Oncol. Rep.**, v. 12, n. 5, p. 1093-1098, Nov. 2004.
- MULLER, W. *et al.* Prognostic value of bcl-2 expression in gastric cancer. **Anticancer Res.**, v. 18, n. 6b, p. 4699-4704, Nov-Dec. 1998.
- MURRAY, P. G.; YOUNG, L.S. Epstein-Barr virus infection: basis of malignancy and potential for therapy. **Expert. Rev. Mol. Med.**, v. 15, p. 1-20, Nov. 2001.
- NAKAMURA, S. *et al.* Epstein-Barr virus in gastric carcinoma with lymphoid stroma. Special reference to its detection by the polymerase chain reaction and in situ hybridization in 99 tumors, including a morphologic analysis. **Cancer**, v. 73, n. 9, p. 2239-2249, May. 1994.
- NARDONE, G. Review article: Molecular basis of gastric carcinogenesis. **Aliment Pharmacol. Ther.**, v. 17, p. 75-81, 2003.
- NIEDOBITEK, G. The Epstein-Barr virus: a group 1 carcinogen? **Virchows Arch.**, v. 435, p. 79-86, 1999.
- NINOMIYA, I. *et al.* Expression of c-myc gene product in gastric carcinoma. **Oncology**, v. 48, n. 2, p. 149-153, 1991.
- ODA, K. *et al.* Association of Epstein-Barr virus with gastric carcinoma with lymphoid stroma. **Am. J. Pathol.**, v. 143, p. 1063-1071, 1993.
- ODA, K. *et al.* Detection of Epstein-Barr virus in gastric carcinoma cells and surrounding lymphocytes. **Gastric Cancer**, v. 6, p. 173-178, 2003.
- OHGA, S. *et al.* Immunological aspects of Epstein-Barr virus infection. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**. v. 44, p. 203-215, 2002.
- OKANO, M. Haematological associations of Epstein-Barr virus infection. **Baillieres Best Pract. Res. Clin. Haematol.**, v.13, n. 2, p. 199-214, June. 2000.
- OLD, L. J. *et al.* Precipitating antibody in human serum to an antigen present in cultured Burkitt's lymphoma cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 56, p. 1699-1704, 1966.
- OLUWASOLA, A. O.; OGUNBIVI, J. O. Gastric cancer: aetiological, clinicopathological and management patterns in Nigeria. **Niger. J. Méd.**, v. 12, n. 4, p. 177-186, 2003.
- ORIAN, J. M. *et al.* Overexpression of multiple oncogenes related to histological grade of astrocytic glioma. **Br. J. Cancer**, v. 66, n. 1, p. 106-112, 1992.
- OSATO, T.; IMAI, S. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. **Seminars in Cancer Biology**, v.7, p. 175-182, 1996.

OSAWA, T. *et al.* Reduced Expression and Promoter Methylation of p16 Gene in Epstein-Barr Virus-associated Gastric Carcinoma. **Jpn. Journal Cancer Research**, v. 93, p. 1195-1200, 2002.

OTT, G.; KIRCHNER, T.; MULLER-HERMELINK, H. K. Monoclonal Epstein-Barr virus genomes but lack of EBV-related protein expression in different types of gastric carcinoma. **Histopathology**, v. 25, n. 4, p. 323-329, Oct. 1994.

PARKER, G. A. *et al.* Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA)3C is an immortalizing oncoprotein with similar properties to adenovirus E1A and papillomavirus E7. **Oncogene**, v. 13, p. 2541-2549, 1996.

PARKIN, D. M. *et al.* Global Cancer Statistics, 2002. **CA Cancer J. Clin.**, v. 55, p. 74-108, 2005.

PATROCÍNIO, R. M. S. V. *et al.* **Expressão das proteínas BCL-2 & BAX em tumores astrocíticos humanos.** In: XXV Congresso Brasileiro de Patologia. Sociedade Brasileira de Patologia. Natal, 12 a 15 de outubro de 2005. Disponível em: <http://www.cbp2005.com.br/layout/pag_abstract_sbp.htm>. Acesso em: 19 de novembro de 2005.

PELENGARIS, S.; KHAN, M.; EVAN, G. c-Myc: more than just a matter of life and death. **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, n. 10, p. 764-776, 2002.

PITTALUGA, S. *et al.* Clonal Epstein-Barr virus in lymphoepithelioma-like carcinoma of the stomach: demonstration of viral genome by *in situ* hybridization and Southern blot analysis. **Mod. Pathol.**, v. 5, p. 661-664, 1992.

RAAB-TRAUB, N. Epstein-Barr virus in the pathogenesis of NPC. **Semin. Cancer Biol.**, v. 12, n. 6, p. 431-41, Dec. 2002.

RAAB-TRAUB, N. *et al.* Epstein-Barr virus infection in carcinoma of the salivary gland. **J. Virol.**, v. 65, n. 12, p. 7032-7036, Dec. 1991.

REEDMAN, B.; KLEIN, G. Cellular localization of an Epstein-Barr virus-associated complement-fixing antigen in producer and nonproducer lymphoblastoid cell lines. **International Journal of Cancer**, v. 11, p. 499-520, 1973.

RICKINSON, A. B.; YOUNG, L. S.; ROWE, M. Influence of the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA2 on the growth phenotype of virus-transformed B cells. **J. Virol.**, v. 61, p. 1310-17, 1987.

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

ROWE, M. *et al.* Upregulation of bcl-2 by the Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein LMP1: a B-Cell-Specific Response That Is Delayed Relative to NF- κ B Activation and to Induction of Cell Surface Markers. **Journal of Virology**, v. 68, n. 9, p. 5602-5612, Sept. 1994.

ROWLANDS, D. C. *et al.* Epstein-Barr virus and carcinomas: rare association of the virus with gastric adenocarcinomas. **Br. J. Cancer**, v. 68, p.1014-1019, 1993.

- ROYDS, J. A. *et al.* cellular localization of c-myc product in human colorectal epithelial neoplasia. **J. Pathol.**, v. 166, n. 3, p. 225-233, 1992.
- SAEGUSA, M.; TAKANO, Y.; OKAYASU, I. Bcl-2 expression and its association with cell kinetics in human gastric carcinomas and intestinal metaplasia. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 121, p. 357-363, 1995.
- SELVES, J. *et al.* Epstein-Barr virus latent and replicative gene expression in gastric carcinoma. **Histopathology**, v. 28, n. 2, p. 121-127, Feb. 1996.
- SETO, E. *et al.* Epstein-Barr virus (EBV)-encoded BARF1 gene is expressed in nasopharyngeal carcinoma and EBV-associated gastric carcinoma tissues in the absence of lytic gene expression. **J. Med. Virol.**, v. 76, n. 1, p. 82-88, May. 2005.
- SINCLAIR, A. J. *et al.* EBNA-2 and EBNA-LP cooperate to cause G0 to G1 transition during the immortalization of resting human B lymphocytes by Epstein-Barr virus. **EMBO J.**, v. 13, p. 3321-3328, 1994.
- SHAH, W. A. *et al.* Binding of EBNA-1 to DNA creates a protease-resistant domain that encompasses the DNA recognition and dimerization functions. **Journal Of Virology**, v. 66, p. 3355-3362. 1992.
- SHANG, J.; PEÑA, A. S. Multidisciplinary approach to understand the pathogenesis of gastric cancer. **World J. Gastroenterol.**, v. 11, n. 27, p. 4131-4139, 2005.
- SHARP, T. V. *et al.* Comparative analysis of the regulation of the interferon-inducible protein kinase PKR by Epstein-Barr virus RNAs EBER-1 and EBER-2 and adenovirus VAI RNA. **Nucleic Acids Res.**, v. 21, p. 4483-4490, 1993.
- SHENG, W. *et al.* N-Terminal domain of BARF1 gene encoded by Epstein-Barr virus is essential for malignant transformation of rodent fibroblasts and activation of BCL-2. **Oncogene**, v. 20, n. 10, p. 1176-1185, Mar. 2001.
- SHENG, W. *et al.* Malignant transformation of Epstein-Barr Virus-Negative Akata Cells by Introduction of the BARF1 Gene Carried by Epstein-Barr Virus. **Journal of Virology**, v. 77, n. 6, p. 3859-3865, 2003.
- SHIBATA, D. *et al.* Association of Epstein-Barr virus with undifferentiated gastric carcinomas with intense lymphoid infiltration. Lymphoepithelioma-like carcinoma. **Am. J. Pathol.**, v. 139, p. 469-474, 1991.
- SHIBATA, D.; WEISS, L. M. Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinoma. **Am. J. Pathol.**, v. 140, p. 769-774, 1992.
- SHIN, W. S. *et al.* Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinomas among Koreans. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 105, n. 2, p. 174-181, Feb. 1996.
- SHOUSHA, S.; LUQMANI, Y. A. Epstein-Barr virus in gastric carcinoma and adjacent normal gastric and duodenal mucosa. **J. Clin. Pathol.**, v. 47, n. 8, p. 695-698, Aug. 1994.
- SPANDIDOS, D. A. *et al.* Immunohistochemical analysis of the expression of the c-myc oncoprotein in human stomach cancers. **Digestion**, v. 50, n. 3, p. 127-134, 1991.

- STADTLÄNDER, C. T. K-H.; WATERBOR, J. W. Molecular Epidemiology, Pathogenesis and Prevention of Gastric Cancer. **Carcinogenesis**, v. 20, n. 12, p. 2195-2207, 1999.
- STROCKBINE, L. D. *et al.* The Epstein-Barr virus BARF1 gene encodes a novel, soluble colony-stimulating factor-1 receptor. **J. Virol.**, v. 72, p. 4015– 4021, 1998.
- SUDO, M. *et al.* Promoter Hypermethylation of E-Cadherin and its abnormal expression in Epstein-barr Virus-associated gastric carcinoma. **Int. J. Cancer**, n. 109, p. 194-199, 2004.
- SUGAWARA, Y. *et al.* Detection of Epstein-Barr virus (EBV) in hepatocellular carcinoma tissue: a novel EBV latency characterized by the absence of EBV-encoded small RNA expression. **Virology**, v. 256, n. 2, p. 196-202, Apr. 1999.
- SUGIURA, M. *et al.* Transcriptional analysis of Epstein-Barr virus gene expression in EBV-positive gastric carcinoma: unique viral latency in the tumour cells. **Br. J. Cancer**, v. 74, n.4, p. 625-631, Aug. 1996.
- SZEKELY, L. *et al.* EBNA-5, an Epstein-Barr virus-coded nuclear antigen, binds to the retinoblastoma and p53 proteins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, p. 5455-5459, 1993.
- TAKADA, K. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. **J. Clin. Pathol.: Mol. Pathol.**, v. 53, p. 255-261, 2000.
- TAKADA, K.; NANBO, A. The role of EBERs in oncogenesis. **Seminars in Cancer Biology**, v. 11, p. 461–467, 2001.
- TAKANO, Y. *et al.* The role of the Epstein-barr virus in the oncogenesis of EBV(+) gastric carcinomas. **Virchows Achieves**, v. 434, p. 17-22, 1999.
- TELENTI, A.; MARSHALL, W. F.; SMITH, T. F. Detection of Epstein-Barr Virus by Polymerase Chain Reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 10, p. 2187-2190, Oct. 1990.
- TERRY, M. B.; GAUDET, M. M.; GAMMON, M. D. The epidemiology of gastric cancer. **Semin Radiat. Oncol.**, v. 12, n. 2, p. 111-127, Apr. 2002.
- THORLEY-LAWSON, D. A. Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 1, n. 1, p. 75-82, Oct. 2001.
- TOCZYSKI, D.P.; STEITZ, J. A. EAP, a highly conserved cellular protein associated with Epstein–Barr virus small RNAs (EBERs). **EMBO J.**, v. 10, p. 459–466, 1991.
- TOKUNAGA, M. *et al.* Epstein-barr virus in gastric carcinoma. **American J. Pathol.**, v. 143, n. 5, p.1250-1254, 1993a.
- TOKUNAGA, M. *et al.* Epstein-Barr virus related gastric cancer in Japan: A molecular patho-epidemiological study. **Acta Pathologica Japonica**, v. 43, p. 574-581, 1993b.
- TRÉDANIEL, J. *et al.* Tobacco smoking and gastric cancer: Review and meta-analysis. **Int. J. Cancer**, v. 72, p. 565-573, 1997.

- TSUCHIYA, S. Diagnosis of Epstein-Barr virus-associated diseases. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 44, p. 227-238, 2002.
- VAN DER WOUDE, C. J. *et al.* Diffuse and intestinal type gastric carcinomas differ in their expression of apoptosis related proteins. **J. Clin. Pathol.**, v. 56, p. 699-702, 2003.
- VERDECCHIA, A. *et al.* Explaining gastric cancer survival differences among European countries. **Int. J. Cancer**, v. 109, p. 737-741, 2004.
- ZHENG, L. *et al.* Molecular basis of gastric cancer development and progression. **Gastric Cancer**, v. 7, p. 61-77, 2004.
- ZÖRNING, M. *et al.* Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1551, p. 1-37, 2001.
- ZUR HAUSEN, A. *et al.* EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours anaplastic carcinomas of the nasopharynx. **Nature**, v. 228, p. 1056-1058, 1970.
- ZUR HAUSEN, A. *et al.* Unique Transcription Pattern of Epstein-Barr Virus (EBV) in EBV-carrying Gastric Adenocarcinomas: Expression of the Transforming *BARF1* Gene. **Cancer Research**, v. 60, p. 2745-2748, May. 2000.
- ZUR HAUSEN, A. *et al.* Epstein-Barr virus in gastric carcinomas and gastric stump carcinomas: a late event in gastric carcinogenesis. **J. Vlin. Pathol.**, v. 57, p. 487-491, 2004.
- WANG, Y. *et al.* Expression of Epstein-Barr virus genes in EBV-associated gastric carcinoma. **Ai. Zheng.**, v. 23, n. 7, p. 782-787, 2004.
- WANG, Q. *et al.* Anti-apoptotic role of BARF1 in gastric cancer cells. **Cancer Letters**, v.20, p. 1-14, 2005a.
- WANG, Y. *et al.* Relationship between Epstein-Barr virus-encoded proteins with cell proliferation, apoptosis, and apoptosis-related proteins in gastric carcinoma. **World J. Gastroenterol.**, v. 11, n. 21, p. 3234-3239, June. 2005b.
- WATANABE, H.; ENJOJI, M.; IMAI, T. Gastric carcinoma with lymphoid stroma. **Cancer**, v. 38, p 232-243, 1976.
- WERNER, M. *et al.* Gastric Adenocarcinoma: Pathomorphology and Molecular Pathology. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 127, p. 207-216, 2001.
- WILSON, J. B.; BELL, J. L.; LEVINE, A. J. Expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 induces B cell neoplasia in transgenic mice. **EMBO J.**, v. 15, p. 40-50, 1996.
- WOLF, H.; ZUR HAUSEN, H.; BECKER, V. EB viral genomes in epithelial nasopharyngeal carcinoma cells. **Nature**, v. 244, p. 245-7, 1973.
- YAMAMOTO, T. *et al.* Immunohistochemical detection of c-myc oncogene product in human gastric carcinomas: expression in tumor cells and stromal cells. **Jpn. J. Cancer Res.**, v. 78, n. 11, p. 1169-1174, Nov. 1987.

YOSHIYAMA, H. *et al.* Epstein-Barr Virus Infection of Human gastric Carcinoma Cells: Implication of the Existence of a New Virus Receptor Different from CD21. **American Society for Microbiology**, v. 71, n. 7, p. 5688-5691, 1997.

YOSHIWARA, E. *et al.* Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma in Lima, Peru. **J Exp. Clin. Cancer Res.**, v. 24, n. 1, p. 49-54, Mar. 2005.

YOUNG, L. S.; DAWSON, C. W.; ELIOPOULOS, A. G. Epstein-Barr virus and apoptosis: viral mimicry of cellular pathways. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 27, p. 807-812, 1999.

YOUNG, L. S.; DAWSON, C. W.; ELIOPOULOS, A. G. The expression and function of Epstein-Barr virus encoded latent genes. **J. Clin. Pathol.: Mol. Pathol.**, v. 53, p. 238-247, 2000.

YUEN, S. T. *et al.* In situ detection of Epstein-Barr virus in gastric and colorectal adenocarcinomas. **Am. J. Surg. Pathol.**, v. 18, n. 11, p. 1158-1163, Nov. 1994.

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 paciente, 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.: GC-001-N1/ D-M-2004);
- 3-Após a retirada da peça, colocá-la em uma cuba estéril e lavá-la com soro fisiológico estéril (se necessário). Secá-la com uma 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 das bordas, evitando 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 a 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^a. 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: _____

Data: ____/____/____

Assinatura do investigador: _____

Anexo IV

Cadastro de Pacientes Submetidos a Coleta de Tecido de Peça Cirúrgica

Código: CG _____ **Data** ____/____/____
 N° 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 _____

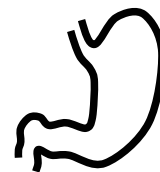
Dados relativos à neoplasia.

Data do primeiro diagnóstico ____/____/____ Exam _____

H. pylori []

Sítio anatômico _____ Est. Clínico T ___ N ___ M ___

Aspecto morfológico _____ Bormann _____



Exame anatomopatológico N°: _____

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 _____

N° de amostra Tumoral congelada [] N° de amostra Normal []

Local Armazenamento: _____

Anexo V

Orçamento Geral

TÉCNICAS DE HIBRIDAÇÃO <i>IN SITU</i> E IMUNO-HISTOQUÍMICA			
Reagentes e materiais	Origem	Qtd.	Valor
Ácido Cítrico	Sigma®	1	R\$ 20,00
Água oxigenada 10 vol	Rioquímica®	5	R\$ 30,00
Álcool etílico 95°GL	Synth®	50	R\$ 80,00
Anticorpo monoclonal de camundongo anti-c-MYC humano	Labvision®	1	R\$ 1.250,00
Anticorpo policlonal de coelho anti-BAX humano	DakoCytomation®	1	R\$ 990,00
Anticorpo monoclonal de camundongo anti-BCL2 humano	DakoCytomation®	1	R\$ 1.050,00
Anticorpo monoclonal de camundongo anti-biotina	DakoCytomation®	1	R\$ 1.500,00
Anticorpo policlonal biotilado de coelho anti-IgG	DakoCytomation®	1	R\$ 850,00
Albumina Bovina (BSA)	Sigma®	1	R\$ 1.800,00
Bálsamo do Canadá	QEL®	1	R\$ 50,00
Caneta hidrofóbica	DakoCytomation®	1	R\$ 380,00
Cx. de Lâmina	Bioglass®	15	R\$ 45,00
Cx. de Lâminulas	Bioglass®	15	R\$ 45,00
Cloreto de sódio	Sigma®	1	R\$ 50,00
DEPC (dietil-piromcarbonato)	Sigma®	1	R\$ 1.700,00
DNA de esperma de salmão sonicado	Amresco®	1	R\$ 506,00
Hematoxilina	Nuclear®	1	R\$ 200,00
Kit de detecção (Dako) LSAB+	DakoCytomation®	1	R\$ 2.260,00
Kit DAB+ líquido	DakoCytomation®	1	R\$ 305,00
Kit de detecção (Dako) ABC	DakoCytomation®	1	R\$ 1.200,00
Ponteiras descartáveis (Diversas)	Gilson®	2	R\$ 60,00
Proteinase K	Sigma®	1	R\$ 350,00
Silano	Sigma®	1	R\$ 1.035,00
Solução de pré-hibridização	Gibco BRL®	1	R\$ 450,00
Solução de hibridização	Gibco BRL®	1	R\$ 500,00
Sonda	Invitrogen®	1	R\$ 350,00
Xileno	Synth®	50	R\$ 350,00
SUBTOTAL			R\$ 17.406,00

TÉCNICAS DE PCR			
Reagentes e materiais	Origem	Qtd.	Valor
Agarose	Gibco BRL®	1	R\$ 1.665,00
Azul de Bromofenol	Gibco BRL®	1	R\$ 100,00
Brometo de etídeo	Sigma®	1	R\$ 116,00
dNTP	Invitrogen®	1	R\$ 400,00
Marcador de PM 100pb	Invitrogen®	1	R\$ 500,00
Pacote de tubos do tipo Eppendorf (Diversos)	Eppendorf®	4	R\$ 112,00
Ponteiras descartáveis (Diversas)	Gilson®	4	R\$ 90,00
Primers (detecção de EBV; deleção de 30pb LMP1)	Invitrogen®	2	R\$ 520,00
Taq polimerase/Reagentes para PCR	Invitrogen®	1	R\$ 350,00
Tampão TBE	Sigma®	1	R\$ 450,00
Xileno Cianol	Gibco BRL®	1	R\$ 100,00
SUBTOTAL			R\$ 4.403,00

Orçamento Geral - Continuação

COLETA DE ESPÉCIMES E EXTRAÇÃO DE DNA			
Reagentes e materiais	Origem	Qtd.	Valor
Álcool Isopropílico	Vetec [®]	3	R\$ 15,00
Álcool Isoamílico	Vetec [®]	1	R\$ 7,00
Clorofórmio	Vetec [®]	3	R\$ 30,00
CTAB	Gibco BRL [®]	1	R\$ 150,00
EDTA	Sigma [®]	1	R\$ 553,00
Etanol P.A.	Vetec [®]	1	R\$ 105,00
Nitrogênio Líquido	White Martins [®]	160L	R\$ 1.600,00
Pacote de Criotubos	Gilson [®]	2	R\$ 40,00
SDS	Sigma [®]	1	R\$ 500,00
β-Mercaptoetanol	Sigma [®]	1	R\$ 600,00
Tris Ultrapuro	Sigma [®]	1	R\$ 382,00
SUBTOTAL			R\$ 3.982,00

INSUMOS DA INSTITUIÇÃO			
Equipamentos e materiais	Origem	Qtd.	Valor
Agitador	-	1	R\$ 350,00
Balança de precisão	Celtac [®]	1	R\$ 2.100,00
Banho-Maria	Quimis [®]	1	R\$ 300,00
Câmara úmida	Erviagas [®]	1	R\$ 20,00
Câmera digital	Nikon [®]	1	R\$ 2.000,00
Capela de Fluxo Laminar	Pachane [®]	1	R\$ 4.000,00
Capela de exaustão	Quimis [®]	1	R\$ 250,00
Centrífuga refrigerada	Eppendorf [®]	1	R\$ 10.000,00
Conjunto de Micropipeta	Gilson [®]	1	R\$ 2.500,00
Contador de células manual	Herka [®]	1	R\$ 115,00
Cuba de Eletroforese	Gilson [®]	1	R\$ 800,00
Cuba de vidro	Duralex [®]	10	R\$ 100,00
Destilador/ Água Milli-Q	Milli-Q [®]	1	R\$ 1.050,00
Estufa	Fanem [®]	1	R\$ 800,00
Etiqueta para lâmina	Pimaco [®]	3	R\$ 10,00
Folha de papel de filtro	Ripax [®]	10	R\$ 5,00
Fonte elétrica para eletroforese	-	1	R\$ 400,00
Forno Microondas	Electrolux [®]	1	R\$ 360,00
Freezer (-20°C)	Prosdócimo [®]	1	R\$ 1.200,00
Geladeira	Electrolux [®]	1	R\$ 800,00
Lâmina para micrótomo	Leica [®]	1	R\$ 400,00
Cx. luvas de procedimento	Blowtex [®]	20	R\$ 80,00
Medidor de pH	Digimed [®]	1	R\$ 500,00
Microscópio óptico	Olympus [®]	1	R\$ 8.000,00
Micrótomo	Quimis [®]	1	R\$ 800,00
Micrótomo Criostato	Quimis [®]	1	R\$ 1.500,00
Transiluminador de luz Ultra-Violeta	-	1	R\$ 1.500,00
Vortex	Quimis [®]	1	R\$ 250,00
Termociclador	Eppendorff [®]	1	R\$ 20.000,00
Termômetro	BD [®]	1	R\$ 15,00
SUBTOTAL			R\$ 60.205,00
TOTAL			R\$ 86.296,00

Anexo VI

(Artigo a ser enviado ao *Journal of Clinical Virology*)

Relationship Between the EBV Infection and the Expression of Cellular Oncoproteins in Gastric Carcinomas.

Lima MAP¹, Barros MAP², Ferreira MVP¹, Pardini MIMC³, Ferrasi A³, Mota RMS⁴, Rabenhorst SHB¹

1-Section of Microbiology, Department of Pathology and Forensic Medicine. Federal University in Ceará, Brazil. 2-Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza, CE, Brazil. 3-State University in São Paulo, Botucatu, Brazil. 4-Department of Statistic and Applied Mathematics. Federal University in Ceará, Brazil.

Abstract

Background: The Epstein-Barr virus (EBV) has been related to the tumorigenesis of about 10% of the gastric carcinomas. Several studies have demonstrated strong evidences of its relation in this process, however, most of the mechanisms used by the virus to control this process still unknown. In this context, the present study aimed to investigate possible EBV-induced tumorigenic pathways.

Materials and Methods: One hundred cases of gastric carcinoma (67 males and 33 females), obtained from two hospitals in Fortaleza, were assessed by *in situ* hybridization (aimed to the EBER1 transcript) to detect the EBV. Immunohistochemistry technique was also accomplished to evaluate the expression of the cellular proteins BCL-2, BAX and c-MYC (nuclear and cytoplasmic staining), by streptavidin-biotin-peroxidase method. **Results:** The distribution by sex, age, anatomic site of the tumor and the histopathologic analysis of the cases, in general, reproduced the tendency of the world scientific bibliographies. Regarding virus detection by *in situ* hybridization, 8 (8%) cases exhibited strong staining situated in the nuclei of the tumor cells, 6 of these presenting diffuse pattern of staining, and 2 demonstrating focal pattern. Among the 100 cases only 2 of these presented infected lymphocytes. In general, the EBV demonstrated higher association with males (87.5% [$p=0.265$]), with tumors situated in the cardia (37.5% [$p=0.549$]), of advanced stage (IIIB and IV), of the intestinal type (87.5% [$p=0.136$]) and moderately differentiated (75%). The correlation with the results of the immunohistochemistry technique, demonstrated that none of the EBV-positive cases exhibited BCL-2 staining. Although the BAX and the c-MYC (nuclear) proteins have demonstrated significant positivity index and scores averages in the EBV-positive group, these were lower than the values of the EBV-negative group, notably the c-MYC nuclear protein (Mann-Whitney test LI $p=0.039$ and HS $p=0.045$). The cytoplasmic staining of the c-MYC protein, revealed slightly upper staining values in the EBV-positive group. The balance between the BCL-2 and BAX proteins demonstrated that the majority of the evaluated cases, including the EBV-positive cases, exhibited apoptosis-orientation.

Discussion: The results obtained in the present study, concerning the EBV frequency and the correlation with clinic-histopathologic data, reproduced findings of researches done in several world regions. The correlation with the proteins, suggests that *in vivo*, the virus is not related to the overexpression of BCL-2 and c-MYC (nuclear) that could act in synergism, promoting the tumor development. The suppression of the BAX expression can represent a viral mechanism for apoptosis inhibition. The results of the cytoplasmic c-MYC, point to a possible involvement of the EBV with transport mechanisms of the nuclear membrane, culminating with its accumulation in the cytoplasm.

Keywords: Epstein-Barr virus, gastric carcinoma, tumorigenesis.

Introduction

The Epstein-Barr virus (EBV) has been related to the carcinogenesis of the gastric carcinoma. The virus can be found in approximately 10 % of these tumors, demonstrating strong evidences of its relation such as the monoclonality of the viral genome, and the

presence in almost all tumor cells.^{1 2 3 4} However, most of the mechanisms used by the virus to control this process still unknown. Several studies have demonstrated that the latent genes expressed in this tumor, (EBNA1, EBERs, LMP2A and BARF1) have an important role in this process.

It has been related that EBERs and BARF1 can induce the overexpression of BCL-2 *in vitro*.^{5 6 7} Additionally, the LMP2A can activate the protein-kinase B (PKB), that phosphorylates several cytoplasmic proteins, including the pro-apoptotic protein Bad.⁸ These effects suggest that the EBV suppress the apoptosis, therefore, immortalizing the tumor cells. It has been reported that the EBNA1 contribute to the overexpression of the *c-MYC* oncogene in the context of the chromosomal translocation.^{9 10} So that, virtually the c-MYC-induced proliferative effect can act, in synergism with the BCL-2-induced anti-apoptotic effect, promoting cell transformation and driving the cells to the malignant phenotype.

However, a few papers have analyzed *in vivo*, the association of the EBV with the expression of the referred cellular oncoproteins in gastric carcinomas. For this reason, we investigated the presence of the EBV by *in situ* hybridization and evaluated the expression of the apoptosis-involved proteins BCL-2, BAX and c-MYC, by immunohistochemistry.

Materials and Methods

Clinical Specimens

One hundred cases of gastric carcinoma surgically-resected were collected from two hospitals of the State of Ceará, Brazil: Walter Cantídeo Hospital at Federal University in Ceará, and Santa Casa de Misericórdia (a catholic beneficial institution), all located in Fortaleza, the capital of the state. It has been obtained from all these cases, specimens fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. Histological sections of 5µm were performed and placed on silane-treated glass slides. Soon each slide have been deparaffinized with xylene and rehydrated in gradient of ethanol-water before the accomplishment of the techniques. The cases have been classified according to the Lauren's classification.¹¹

In Situ Hybridization

The presence of the EBV was assessed by RNA *in situ* hybridization with a 30bp biotinylated probe (5'-AGACACCGTCCTCACCACCCGGGACTTGTA - 3') complementary to the RNA EBER1, an EBV transcript shown in elevated amount in the nuclei of latently infected cells. After the deparaffinization and rehydration, endogenous peroxidase was blocked with 3% H₂O₂ solution. Enzymatic digestion was performed with proteinase K (0,02µg/µL) for 13 min at environment temperature, subsequently, the tissues

were dehydrated in gradient of ethanol and dried. The slides have been incubated with pre-hybridization solution (Denhardt's solution [3.5X]; SSC [4.5X]; EDTA [0.0075M]; SDS [0.35%]; denatured salmon sperm DNA [75µg/mL]; NaH₂PO₄ [0.75M]; dextran sulfate [10%]) for 60 min at 37°C in humid chamber. Soon after, the slides were incubated with hybridization solution (Denhardt's solution [2X]; formamide [50%]; dextran sulfate [2%]; NaH₂PO₄ [0.002M]; probe [0.3ng/µL]) for 16 hours at 37°C in humid chamber. To the signal amplification was employed anti-biotin antibody (clone BK, mouse, dilution 1:20; DakoCytomation[®]) and biotinylated anti-immunoglobulin antibody (polyclonal, rabbit, dilution 1:100; DakoCytomation[®]), the reaction was detected with the streptavidin-biotin-peroxidase complex (DakoCytomation[®]) and the diaminobenzidine chromogen (DakoCytomation[®]). The slides were counterstained with Harris's hematoxilin. A case of nasopharyngeal carcinoma was used as positive control.

Immunohistochemistry

The expression of the proteins BCL-2, BAX and c-MYC was performed according to the method described by Hsu *et al.*¹² Briefly, after the deparaffinization and rehydration, antigen retrieval was carried out by microwave-treatment of the slides for 15 min in 10mM citrate buffer solution (pH 6.0). Endogenous peroxidase activity was blocked with 3% H₂O₂ solution. Primary antibodies were incubated for 16 hours at 4-8°C in humid chamber. For each protein, it was used the following antibody: anti-human BCL-2 (clone 124, mouse, dilution 1:80; DakoCytomation[®]), anti-human BAX (polyclonal, rabbit, dilution 1:400; DakoCytomation[®]) and anti-human c-MYC (clone 9E10, mouse, dilution 1:100; Labvision[®]). The reaction was detected with LSAB+ system (DakoCytomation[®]) and the diaminobenzidine chromogen (DakoCytomation[®]). The counterstaining was accomplished with Harris's hematoxilin. According to the manufacturer's recommendation, we used as positive controls: reactive lymphonode for BCL-2; colon carcinoma for BAX; Burkitt's lymphoma for c-MYC.

Evaluation of the Reactions

Regarding *in situ* hybridization, the presence of nuclear dark brown staining was considered as positive. According to the immunohistochemistry, the staining for BCL-2 and BAX proteins were cytoplasmic, and for c-MYC protein was nuclear and/or cytoplasmic. For immunohistochemistry, the percentage of tumor cells staining (*Labelling index* - LI) was proceeded using the following methods described previously.¹³ Only a LI ≥ 5% was considered as positive. Besides, the intensity of staining (*H-score* - HS) was evaluated following methods described by McCarty *et al.*¹⁴

Statistical Analyses

The analyses was developed using the statistical programs EPINFO[®] 6.04d version and SPSS 12.0. Statistically significant differences were evaluated by Fisher's exact test (2-sided) and Mann-Withney U-test. The results were considered to be statistically significant when *p*-values were less than 0.05.

Results

Clinicopathological Analyses

Eight of 100 (8%) gastric carcinomas were EBV-positive, demonstrating strong staining specifically situated in the nuclei of tumor cells. In six of the EBV-positive cases almost all tumor cells were positive, while the other two cases exhibited a focal staining pattern. Only two of 100 cases displayed surrounding infected lymphocytes, coincidentally both presenting positive tumor cells. Non-cancerous gastric mucosa and dysplastic area have been always negative. Table 1 summarizes the clinicopathological data.

There was a male predominance (87.5%) in the EBV-positive cases, but no statistically significant difference has been noticed. As regarded to the age distribution, there was a small reduction within the interval 55-64 in the EBV-positive cases. The average of the EBV-positive and EBV-negative groups were 59.7 and 61.3 years old respectively. The age distribution was similar between EBV-positive and EBV-negative groups. Although the anatomic localization has not been statistically significant, there was a discreet elevation of the EBV-positive tumors localized in the cardia (37.5%) compared with the EBV-negative group. The histological analyses revealed that most of the EBV-positive cases were classified as intestinal type (87.5%) and showed a predominance of the moderately differentiated tumors (75%). The tumor stage distribution was similar between both groups.

Table 1 - Comparison of EBV-positive and EBV-negative gastric carcinomas according to the clinicopathological findings.

	EBV(+) (n=8)	EBV(-) (n=92)	p-value
Sex			<i>p</i> =0.265
Male	7 (87.5%)	60 (65.2)	
Female	1 (12.5%)	32 (34.8)	
Age distribution *			
0-14	0 (0%)	0 (0%)	
15-44	1 (12.5%)	8 (8.7%)	
45-54	2 (25.0%)	18 (19.6%)	
55-64	1 (12.5%)	24 (26.1%)	
≥ 65	4 (50.0%)	42 (45.7%)	
Anatomic localization			<i>p</i> =0.549
Cardia	3 (37.5%)	20 (21.7%)	
Corpus	1 (12.5%)	22 (23.9%)	
Antrum	4 (50.0%)	50 (54.3%)	
Lauren's classification			<i>p</i> =0.136
Diffuse	1 (12.5%)	40 (43.5%)	
Intestinal	7 (87.5%)	52 (56.5%)	
Differentiation *			
Undifferentiated	0 (0%)	1 (1.1%)	
Poorly	2 (25.0%)	39 (42.4%)	
Moderately	6 (75.0%)	48 (52.2%)	
Well differentiated	0 (0%)	4 (4.3%)	
pTNM stage *			
I	1 (12.5%)	13 (14.1%)	
II	1 (12.5%)	18 (19.6%)	
III	3 (37.5%)	33 (35.9%)	
IV	3 (37.5%)	28 (30.4%)	

* It has not been possible to calculate the significance.

EBV and Cellular Oncoproteins

Among the EBV-positive gastric carcinomas, none expressed the BCL-2 protein and even EBV-negative group exhibited a low frequency of expression (5/100 cases) and low staining scores (LI, HS) averages. The assessment of the BAX expression demonstrated elevated values in EBV-positive group, however, smaller than EBV-negative group. Additionally, based on the balance between BCL2/BAX proteins, fifty-eight percent of the carcinomas exhibited apoptosis-orientation, three percent survival- orientation and thirty nine percent exhibited equilibrium.

The nuclear c-MYC expression showed very low values in EBV-positive group, demonstrating clearly the disparity between both groups, being verified statistic significances in these analysis (Mann-Whitney test: LI, $p=0.039$ and HS, $p=0.045$). Although, the cytoplasmic staining of the c-MYC protein in the EBV-positive carcinomas exhibited values more elevated than EBV-negative. It is important to notice that none EBV-positive cases presented nuclear and cytoplasmic staining concomitantly.

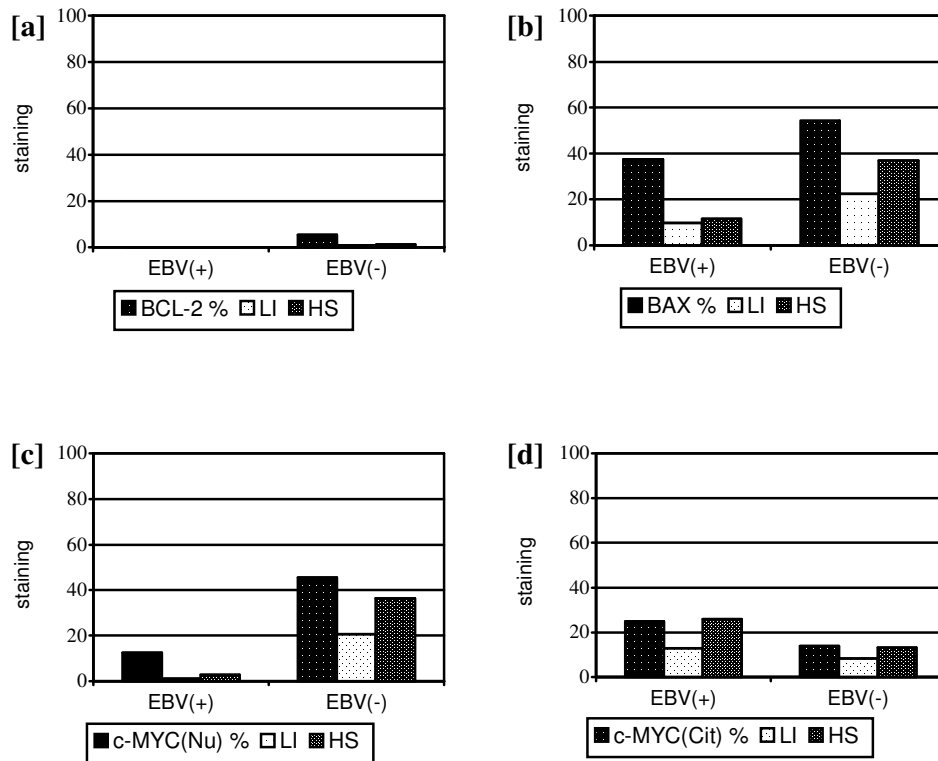


Fig.1. Relationship between detection of the EBV and positivity and staining scores averages (LI, HS) of the oncoproteins [a] BCL-2 (Mann Whitney test LI $p=0.357$ and HS $p=0.357$) [b] BAX (Mann Whitney test LI $p=0.140$ and HS $p=0.103$) [c] nuclear c-MYC (Mann Whitney test LI $p=0.039$ and HS $p=0.045$) and [d] cytoplasmic c-MYC (Mann Whitney test LI $p=0.650$ and HS $p=0.593$).

Discussion

In this study, EBV was detected in 8% of the assessed gastric carcinomas, according to the reported results in various world regions ranging between 1.3 to 19.3%, demonstrating greater similarity with studies performed in China, France, Russia, Mexico and Brazil.^{15 16 17 18}
¹⁹ As described, in six cases almost all tumor cells were EBV-positive while the other two cases demonstrated a focal staining pattern. According to Takada³ the presence of the virus in the majority if not in all tumor cells, suggests that the virus displays an important role in the

development of this neoplasm. Contrarily, the verification of EBV only in a portion of tumor cells (focal staining pattern), indicates that the infection had occurred after cellular transformation.²⁰ Curiously, during the experimental phase we observed frequent cytoplasmic staining, occurring especially in non-cancerous glandular arrangements, in some of these cases the hybridization technique was repeated omitting the anti-biotin antibody, being verified the same initial results. Thus, we have concluded that this finding was actually a non-specific staining (background).

Some authors have related that the gastric mucosa infection is mediated by infiltrated EBV-positive lymphocytes.^{3 21} However, we found only two cases containing stained lymphocytes, contradicting the mentioned hypothesis. Perhaps, this event may occur due to the scarce amount of EBV-positive circulating lymphocytes. Alternatively, Osato and Imai²² has proposed that the gastric mucosal infection may be mediated by free virus presents in the swallowed saliva and due to its structural fragility (enveloped virus), the EBV could lose its infectivity explaining its low frequency in distal gastric carcinomas and the absence in intestinal tumors.^{2 15 23}

The results of the present study have also confirmed others researches showing that EBV-positive cases have a higher incidence in males.^{1 17 24 25} The age distribution of the EBV-positive group demonstrated a reduction within the interval 55-64 years old compared to the EBV-negative group, this variation may be a consequence of the small number of positive cases. Even so, the average of years of the EBV-positive group reproduced the results of others studies.^{26 27 28} Concerning to the anatomical localization, the slight elevation of EBV-positive tumors situated in the cardia is in agreement with researches done in several world regions.^{4 26 29 30}

The correlation between EBV infection and the Lauren's histological type remains controversial. Some authors point the intestinal type as the most frequently associated with EBV^{15 30 31} while others point the diffuse^{19 25 27 32 33} or even equivalence between both histological types.^{3 24 29} In this study, we observed a predominance of the intestinal type in the EBV-positive group. Additionally, Kijima *et al.*⁴ have reported that patients with EBV-positive carcinoma of the intestinal type have a worst prognostic compared to the patients with diffuse type. In this context, we have noticed that the majority of the EBV-positive cases belonged to the tumor stage III and IV. However, these values were similar to the verified in the EBV-negative group. So, it seems that the EBV does not induce a more aggressive phenotype in the associated neoplasms.

According to the differentiation grade, the virus was associated exclusively with poorly and moderately differentiated tumors, especially the last one. Several studies have

reported the two grades as the most frequent^{17 26 34 35}, just a few authors has pointed the poorly differentiated as the predominant grade.^{30 36}

Regarding to the correlation between the EBV status and the expression of cellular oncoproteins, contrarily to what was expecting by us, none EBV-positive case express the BCL-2 protein. These results may not be due to the variation of the employed technique, considering that 37% of the carcinomas presented lymphoid follicles strongly stained representing internal controls of the reactions. Despite Kume *et al.*³⁷ have reported an elevated expression of the BCL-2, in general other authors have demonstrated low positivity in EBV-infected carcinomas.^{1 36 38} In this scenario, the *in vitro* observed effects related to expression of the BCL-2 induced by viral transcripts (BARF1 and/or EBERs) does not seem to occur *in vivo*, where the virus have to subsist among diverse cellular factors. Nevertheless, we observed that the BAX expression overlapped the BCL-2, exhibiting an apoptosis orientation in the majority of the cases. But even so, the BAX expression in the EBV-positive group was smaller than in the EBV-negative group, indicating that the EBV can contribute to the apoptosis suppression by alternative mechanisms. It wasn't found any report regarding EBV presence and BAX expression in gastric carcinomas, impeding a comparison of findings.

The apoptosis is a complex process that involve diverse factors (pro-apoptotic and anti-apoptotic), so that the investigation of others components of the apoptotic process (such as Bcl-xL, Bad, Bak, Bid) can contribute to know whether the apoptosis is really a mechanism used by the EBV in the cellular transformation.

The evaluation of the c-MYC protein in the nuclei of the tumor cells exhibited a notable reduction of the positivity as well as the staining scores in EBV-positive group. In contrast, the detection of the c-MYC protein in the cytoplasm demonstrated more elevated values in the EBV-positive group. These results indicate that the EBV is not associated with the overexpression of the c-MYC situated in the nuclei where this oncoprotein may perform its functions.³⁹ Alternatively, the results point to a possible involvement with transport mechanisms of the nuclear membrane that could block the uptake of the protein into the nuclei of the tumor cells, culminating with its accumulation in the cytoplasm, explaining the exclusive cytoplasmic detection without nuclear concomitance. The relationship between EBV and c-MYC (nuclear or cytoplasmic) lacks of researches, denoting the importance of our study. In the study of Ishii *et al.*¹ the c-MYC positivity was similar between EBV-positive and EBV-negative groups, however, the nuclear and cytoplasmic staining was indiscriminately considered. In the present study, we assessed separately both staining, because the functional importance of the cytoplasmic c-MYC is not still completely understood. Some authors relate that this finding is destituted of functional meaning⁴⁰, on the other hand, others researchers

have demonstrated an elevation of cytoplasmic expression in function of the malignant progression in carcinomas of the stomach⁴¹, colon⁴² and astrocytic tumors.⁴³

Our findings suggest that the proposed hypothesis about a possible EBV-mediated tumorigenic pathway, based on the synergic effect between the apoptosis inhibition by the BCL-2 protein expression and the cellular proliferating induced by the overexpression of c-MYC protein (nuclear) seems, in fact, not to happen. Proving that several effects observed *in vitro*, do not occur *in vivo*. Additionally, our results indicate that EBV should use other mechanisms or else other factors (as in the case of the apoptosis process) to promote the tumor development.

References

1. Ishii H, Gobé G, Kawakubo Y, Sato Y, Ebihara Y. Interrelationship between Epstein-Barr virus infection in gastric carcinomas and the expression of apoptosis-associated proteins. *Histopathology*. 2001; 38:111-119.
2. Morewaya J, Koriyama C, Akiba S, Shan D, Itoh T, Eizuru Y. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma in Papua New Guinea. *Oncol. Rep.* 2004 Nov; 12(5):1093-1098.
3. Takada K. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. *J. Clin. Pathol.: Mol. Pathol.* 2000;53: 255-261.
4. Kijima Y, Ishigami S, Hokita S, Koriyama C, Akiba S, Eizuru Y, Aikou T. The comparison of prognosis between Epstein-barr virus (EBV)-positive gastric carcinomas and EBV-negative ones. *Cancer Letters*. 2003;200:33-40.
5. Komano J, Maruo S, Kurozumi K, Oda T, Takada K. Oncogenic role of Epstein-Barr virus-encoded RNAs in Burkitt's lymphoma cell line Akata. *J. Virol.* 1999;73: 9827-9831.
6. Sheng W, Decaussin G, Sumne S, Ooka T. N-Terminal domain of BARTF1 gene encoded by Epstein-Barr virus is essential for malignant transformation of rodent fibroblasts and activation of BCL-2. *Oncogene*. 2001 Mar;20(10):1176-1185.
7. Wang Q, Tsao SW, Ooka T, et al. Anti-apoptotic role of BARTF1 in gastric cancer cells. *Cancer Letters*. 2005;20:1-14.
8. Thorley-Lawson DA. Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2001 Oct;1(1):75-82.
9. Ambinder RF, Mann RB. Detection and characterization of Epstein-Barr virus in clinical specimens. *Am. J. Pathol.* 1994 Aug;145(2):239-252.
10. Drotar ME, Silva S, Barone E, Campbell D, et al. Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen-1 and Myc Cooperate in Lymphomagenesis. *Int. J. Cancer*. 2003;106: 388-395.
11. Laurèn P. The Two Histological main types of Gastric Carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 1965;64:31-49.
12. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* 1981;29:577-580.
13. Landberg G, Ross G. Proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen expression in human haematopoietic cells during growth stimulation and differentiation. *Cell Prolif.* 1993;26:427-437.

14. McCarty KS Jr., Miller LS, Cox EB, Konrath J, McCarty KS. Estrogen receptor analyses. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1985;109(8):716-721.
15. Yuen ST, Chung LP, Leung SY, Luk IS, Chan SY, Ho J. In situ detection of Epstein-Barr virus in gastric and colorectal adenocarcinomas. *Am. J. Surg. Pathol.* 1994 Nov;18(11):1158-1163.
16. Selves J, Bibeau F, Brousset P, Meggetto F, Mazerolles C, Voigt JJ, Pradere B, Chiotasso P, Delsol G. Epstein-Barr virus latent and replicative gene expression in gastric carcinoma. *Histopathology.* 1996 Feb;28(2):121-127.
17. Galetsky SA, Tsvetnov VV, Land CE, Afanasieva TA, Petrovichev NN, Gurtsevitch VE, Tokunaga M. Epstein-Barr-virus associated-gastric cancer in Russia. *Int. J. Cancer.* 1997;73:786-789.
18. Herrera-Goepfert R, Reyes E, Hernandez-Avila M, Mohar A, Shinkura R, Fujiyama C, Akiba S, Eizuru Y, Harada Y, Tokunaga M. Epstein-Barr-virus associated gastric carcinoma in Mexico: Analysis of 135 consecutive gastrectomies in two hospitals. *Mod. Pathol.* 1999;12:873-878.
19. Koriyama C, Akiba S, Iriya K, Yamaguti T, Hamada GS, Itoh T, Eizuru Y, Aikou T, Watanabe S, Tsugane S, Tokunaga M. Epstein-Barr virus-associated Gastric Carcinoma in Japanese Brazilians and Non-Japanese Brazilians in São Paulo. *Jpn. J. Cancer Res.* 2001 Sept;92:911-917.
20. Luo B, Wang Y, Wang X, Liang H, Yan L, Huang B, Zhao P. Expression of Epstein-Barr virus genes in EBV-associated gastric carcinomas. *World J. Gastroenterol.* 2005 Feb;11(5):629-633.
21. Imai S, Nishikawa J, Takada K. Cell-to-Cell Contact as an Efficient Mode of Epstein-Barr Virus Infection of Diverse Human Epithelial Cells. *American Society for Microbiology.* 1998;72(5):4371-4378.
22. Osato T, Imai S. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. *Seminars in Cancer Biology.* 1996;7:175-182.
23. Cho YJ, Chang MS, Park SH, Kim HS, Kim WH. In Situ Hybridization of Epstein-Barr Virus in Tumor Cells and Tumor-Infiltrating Lymphocytes of the Gastrointestinal Tract. *Human Pathology.* 2001 Mar;32(3):297-301.
24. Shibata D, Weiss LM. Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinoma. *Am. J. Pathol.* 1992;140:769-774.
25. Tokunaga M, Uemura Y, Tokudome T, Ishidate T, Masuda H, Okazaki E, Kaneko K, Naoe S, Ito M, Okamura A, Shimada A, Sato E, Land CE. Epstein-Barr virus related gastric cancer in Japan: A molecular patho-epidemiological study. *Acta Pathologica Japonica.* 1993;43:574-581.
26. 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 Achieves.* 1999;434:17-22.
27. Oda K, Koda K, Takiguchi N, Nunomura M, Seike K, Miyazaki M. Detection of Epstein-Barr virus in gastric carcinoma cells and surrounding lymphocytes. *Gastric Cancer.* 2003;6:173-178.
28. 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. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2004;37(11):1707-1712.
29. Carrascal E, Koriyama C, Akiba S, Tamayo O, Itoh T, Eizuru Y, Garcia F, Sera M, Carrasquilla G, Piazuolo MB, Florez L, Bravo JC. Epstein-Barr-virus associated gastric adenocarcinoma in Cali, Colombia. *Oncol. Rep.* 2003 July;10(4):1059-1062.
30. Zur Hausen A, Rees BPV, Beek JV, Craanen ME, Bloemena E, Offerhaus GJA, Meijer CJLM, Brule AJCVD. Epstein-Barr virus in gastric carcinomas and gastric

- stump carcinomas: a late event in gastric carcinogenesis. *J. Vlin. Pathol.* 2004;57:487-491.
31. Harn HJ, Chang JY, Wang MW, Ho LI, Lee HS, Chiang JH, Lee WH. Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinoma in Taiwan. *Hum. Pathol.* 1995 Mar;26(3):267-271.
 32. Koriyama C, Akiba S, Coryalan A, Carrascal E, Itoh T, Herrera-Goepfert R, Eizuru Y, Tokunaga M. Histology-specific gender, age and tumor-location distributions of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma in Japan. *Oncol. Rep.* 2004 Sept;12(3):543-547.
 33. Alipov G, Nakayama T, Nakashima M, Wen C, Niino D, Kondo H, Pruglo Y, Sekine I. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma in Kazakhstan. *World J. Gastroenterol.* 2005 Jan;11(1):27-30.
 34. Leoncini L, Vindigni C, Megha T, Funto I, Pacenti L, Musaro M, Renieri A, Seri M, Anagnostopoulos J, Tosi P. Epstein-Barr virus and gastric cancer: data and unanswered questions. *Int. J. Cancer.* 1993 Apr;53(6):898-901.
 35. Yoshiwara E, Koriyama C, Akiba S, Itoh T, Minakami Y, Chirinos JL, Watanabe J, Takano J, Miyagui J, Hidalgo H, Chacon P, Linares V, Eizuru Y. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma in Lima, Peru. *J Exp. Clin. Cancer Res.* 2005 Mar;24(1):49-54.
 36. Lee HS, Chang MS, Yang H, Lee BL, Kim WH. Epstein-Barr Virus-Positive Gastric Carcinoma Has a Distinct Protein Expression Profile in Comparison with Epstein-Barr Virus-Negative Carcinoma. *Clinical Cancer Research.* 2004 Mar;10:1698-1705.
 37. Kume T, Oshima K, Shinohara T, Takeo H, et al. Low rate of apoptosis and overexpression of bcl-2 in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Histopathology.* 1999;34:502-509.
 38. Gulley ML, Pulitzer DR, Eagan PA, Schneider BG. Epstein-Barr virus infection is an early event in gastric carcinogenesis and is independent of bcl-2 expression and p53 accumulation. *Hum. Pathol.* 1996 Jan;27(1):20-27.
 39. Pelengaris S, Khan M, Evan G. c-Myc: more than just a matter of life and death. *Nat. Rev. Cancer.* 2002;2(10):764-776.
 40. Orian JM, Vasilopoulos K, Yoshida S, *et al.* Overexpression of múltiple oncogenes related to histological grade of astrocytic glioma. *Br. J. Cancer.* 1992;66,(1):106-112.
 41. Yamamoto T, Yasui W, Ochiai A, *et al.* Immunohistochemical detection of c-myc oncogene product in human gastric carcinomas: expression in tumor cells and stromal cells. *Jpn. J. Cancer Res.* 1987 Nov;78(11):1169-1174.
 42. Royds JA, Sharrard RM, Wagner B, Polaczar SV. Cellular localization of c-myc product in human colorectal epithelial neoplasia. *J. Pathol.* 1992;166(3):225-233.
 43. Faria MHG. Estudo Imuno-histoquímico das Alterações Moleculares nos Astrocitoma: Vias Tumorigênicas, Alvos Terapêuticos e Indicadores de Resistência. 2005. 168 p. Dissertation (Master's degree in Pharmacology) – Federal University in Ceará. Fortaleza.

Anexo VII

*Coordenação de Ensino e Divulgação Científica
Revista Brasileira de Cancerologia*

Rio de Janeiro, 12 de julho de 2005

Dra. Silvia Helena Baren Rabenhorst

Prezada Senhora,

Informamos que o artigo “Associação do vírus Epstein-Barr (EPV) com tumores sólidos”, **MS 14/05**, foi avaliado por nosso Conselho Editorial e este sugeriu modificações que encontram-se em anexo.

Solicitamos que detalhe as alterações que vierem a ser feitas e as sugestões que forem incorporadas.

O artigo deve ser devolvido em duas vias impressas em espaço duplo e cópia em *Word* 6.0 ou 7.0.

Sem mais para o momento.

Atenciosamente,

Pilar Prado - Secretária
Revista Brasileira de Cancerologia - CEDC

Associação do Vírus Epstein-Barr (EBV) com Tumores Sólidos.
Association of Epstein-Barr virus (EBV) with Solid Tumors.

Marcos Antonio Pereira de Lima – UFC¹

Silvia Helena Barem Rabenhorst, PhD – UFC²

Departamento de Microbiologia Médica - Universidade Federal do Ceará.

1- Mestrando do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Médica - Universidade Federal do Ceará.

2- Professora de Genética Molecular do Departamento de Patologia e Medicina Legal - Faculdade de Medicina - Universidade Federal do Ceará.

Título Abreviado: Assoc do EBV com Tumores Sólidos

RESUMO

O gama-herpes vírus Epstein-Barr (EBV) é um vírus ubíquo, que estabelece infecção persistente em mais de 90% da população mundial adulta. O EBV está associado a várias desordens proliferativas benignas e malignas de origem linfóide, tais como Mononucleose Infecciosa, Linfoma de Burkitt, Doença de Hodgkin e Doença Linfoproliferativa Pós-Transplante, nas quais o seu papel oncogênico tem sido largamente estudado. Em tumores sólidos, a relação do EBV é bem documentada em carcinomas de nasofaringe. Contudo, novos achados tem demonstrado que o EBV apresenta um espectro de infecção celular mais amplo do que se conhecia, sendo detectado em células de outros tipos de tumores sólidos, com evidências que apontam para a sua participação na tumorigênese dessas neoplasias. O presente artigo inicia com uma breve descrição da biologia do EBV e tem como objetivo, realizar uma compilação dos achados encontrados na literatura, concernentes à associação do EBV a neoplasias sólidas, apontando as evidências do envolvimento viral e as características das infecções que são encontradas em cada tecido.

Palavras chave: Vírus de Epstein-Barr, Tumores sólidos, Oncogênese.

ABSTRACT

The gama-herpes Epstein-Barr virus is a ubiquitous viral agent that establish persistent infection in more than 90% of the world adult population. The EBV is associated with several lymphoproliferative disorders such as infectious mononucleosis, Burkitt's lymphomas, Hodgkin's diseases and Post-transplant lymphoproliferative disease. The oncogenic role of EBV in tumors of lymphoid origin has been widely investigated. In respect to solid tumors the role of EBV is well documented in nasopharyngeal carcinoma. However, new finds have shown that the spectrum of cellular infection of EBV is larger, being detected in cells of other kinds of solid tumors, demonstrating evidences of its involvement with tumorigenesis of these tumors. The present paper begin with a brief description about the EBV biology and intends to accomplish a summary of the new finds concerning the association of EBV to solid tumors, pointing the evidences of the viral role and the features of infections in each tissue.

Key words: Epstein-Barr virus, Solid Tumors, Oncogenesis .

INTRODUÇÃO

O vírus Epstein-Barr (EBV) é um gama-herpes vírus, constituído de DNA linear fita dupla, envolvido por um capsídeo icosadeltaédrico composto de 162 capsômeros, recoberto por um envelope glicoprotéico.¹ É amplamente distribuído no mundo e estima-se que mais de 90% da população mundial adulta está infectada por este vírus.²

O EBV é transmitido pela saliva, infectando inicialmente, as células epiteliais da orofaringe, nasofaringe e glândulas salivares, por receptores ainda não identificados, onde freqüentemente ocorre replicação. Posteriormente, os vírus alcançam tecidos linfóides adjacentes e infectam linfócitos B através da ligação entre a glicoproteína viral gp350/220 e o receptor CD21 (CR2) do componente C3d do sistema complemento.³ Após essa associação, o vírus penetra nos linfócitos B por fusão do envoltório com a membrana celular e o capsídeo é então liberado no citoplasma. O genoma antes linear é transportado para o núcleo tornando-se circular, permanecendo em estado latente, sob a forma de DNA episomal extracromossômico.⁴ O genoma viral apresenta um comprimento de cerca de 172 Kpb, o qual foi dividido em regiões, com base na posição no mapa de restrição da endonuclease *Bam*HI (*Bacillus amyloliquefaciens* H), e nomeadas de acordo com o tamanho do fragmento, indo de A à Z, sendo o fragmento *Bam*HI A o maior deles.⁵

Devido a estímulos ainda não totalmente esclarecidos o EBV pode iniciar um ciclo lítico. O primeiro gene a ser expresso nesse ciclo é o BZLF1 (*Bam*HI Z left-ward open

reading frame 1), também conhecido como ZEBRA.⁶ Este gene codifica uma proteína que apresenta função de ativador transcricional, iniciando uma cascata de eventos que determinam a expressão de algumas proteínas, tais como os antígenos precoces (EAs), BHRF1 (*BamHI H right-ward open reading frame 1*) e BCRF1 (*BamHI C right-ward open reading frame 1*), incluindo a expressão da DNA polimerase viral.⁷

Durante as infecções latentes, é possível verificar a expressão de alguns genes virais, que codificam: seis proteínas conhecidas como antígenos nucleares do EBV, EBNA-1, 2, 3A, 3B (também conhecido EBNA-4), 3C e LP (também designada EBNA-5); três proteínas latente de membrana LMP-1, LMP-2A e LMP-2B; duas pequenas moléculas de RNA não-poliadeniladas, EBER-1 e 2; alguns transcritos com múltiplos *splices*, da região *BamHI A* do genoma viral, BARF0 (*BamHI A right-ward open reading frame*) e BARF1.^{7,8,9}

Esses genes, no entanto, não são expressos concomitantemente nas diversas células de tecidos ou linhagens tumorais EBV-positivas, sendo proposto a existência de quatro tipos de latência, com padrões distintos de expressão dos genes virais, os quais estão descritos na tabela 1.

De acordo com a International Agency for Research on Cancer – IARC, o Epstein-Barr Vírus é classificado como um carcinógeno do grupo I. Não obstante, diversos autores investigam a função das proteínas virais expressas e a participação destas no desenvolvimento das neoplasias. Alguns estudos tentam correlacioná-las com a superexpressão ou mesmo inibição de proteínas celulares envolvidas em processos oncogênicos. A seção a seguir, descreve alguns achados relevantes relativos aos genes latentes do EBV.

Genes latentes: Mecanismos tumorigênicos.

A oncoproteína EBNA-1, codificada pelo gene homônimo, é responsável pela manutenção do genoma viral, já que ao se ligar à região oriP, permite a replicação pela DNA polimerase celular.¹⁰ Atua também como fator de transcrição do gene viral LMP-1⁵ e supressor, a nível transcricional, da expressão do oncogene *c-erbB-2* celular.¹¹

O EBNA-2 por sua vez, transativa genes virais, tais como LMP-1, LMP-2 e genes celulares como CD21, CD23 e o *c-myc*.^{12,13} Também induz a proliferação/transformação de linfócitos B.^{14,15} Ademais, interage com o fator transcricional RBP-Jκ, regulando positivamente sua atividade.¹⁶ Juntamente, com EBNA-LP, são as primeiras proteínas a serem observadas, sendo essas, suficientes para induzir a transição da fase G0 para G1 do ciclo celular em linfócitos-B, possivelmente por aumentarem a expressão de Ciclina D2.^{5,17}

A família EBNA-3 parece ter importante papel na transformação de células B.¹⁰ Podem induzir a expressão de genes virais (LMP-1) e celulares (CD21) e se combinar com a

proteína Rb, favorecendo a transformação celular.⁵ Os EBNA-3 também se associam a proteína RBP-Jκ, mas ao contrário da EBNA2, regulam negativamente sua atividade.¹⁶

Em relação aos EBERs, tem sido relatado que estes conferem resistência a apoptose em células de linfoma de Burkitt e tumorigenicidade em camundongos SCID. Induzem ainda, a transcrição de IL-10 em células de Linfoma de Burkitt.¹⁸ Niller et al.¹⁹, demonstraram uma região de ligação para a proteína c-Myc, cerca de 130pb fita acima do gene EBER-1, o qual, por sua vez, tem sido demonstrado ser capaz de bloquear os efeitos pro-apoptóticos da proteína c-Myc.¹⁵

Alguns efeitos da LMP-1 ainda são motivos de controvérsias entre alguns autores. De acordo com Dolcetti et al.²⁰, a LMP-1 demonstra um efeito imortalizador sob os linfócitos, decorrente da indução da expressão do oncogene bcl-2, correlação esta, não observada por outros autores.^{21,22} Entretanto, a LMP-1 atua como membro da família de receptores TNF, ativando o fator transcricional NF-κB, induzindo a expressão de receptores celulares (CD40, CD23, EGFR), moléculas de adesão (CD57, ICAM-1, LFA 1 e 3) e citocinas (IL-6 e IL-10).^{10,23,24} Já a LMP-2A, regula negativamente a atividade de proteínas tirosino-quinases citoplasmáticas (PTK), tais como as da família Syk. Promove a sobrevivência de linfócitos B e inibe a reativação viral.^{5,10,25} Também pode induzir transformação em células epiteliais.⁵

O BARF1 é descrito como gene latente exclusivamente em neoplasias de origem epitelial, sendo descrito como um gene lítico precoce nas infecções de linfócitos-B. Atua como homólogo funcional do receptor do fator estimulador de colônia 1 (CSF-1) humano.¹⁰ Exerce efeitos imortalizantes em células epiteliais primárias humanas *in vitro* e induz tumorigenicidade em linhagens de fibroblastos.⁹

METODOLOGIA

Os artigos utilizados nesta revisão foram selecionados nos portais CAPES, PUBMED e SCIELO e obtidos na íntegra nos referidos portais ou solicitados pela BIREME, quando não disponíveis pela internet. Todos foram organizados de acordo com os sítios tumorais e sintetizados para compilação das informações, as quais foram então discutidas na atual revisão.

TÉCNICAS DE DETECÇÃO

As técnicas utilizadas para demonstrar o EBV em espécimes tumorais e que, subsequentemente, permitiram analisar a participação do referido vírus no desenvolvimento das várias neoplasias associadas, incluem: amplificação de seqüência do genoma viral através de reação em cadeia da polimerase (PCR); hibridização *in situ* (HIS), utilizando sondas

complementares tanto à seqüência do genoma viral, quanto à segmentos de RNAm viral; imuno-histoquímica e imunofluorescência, utilizando anticorpos monoclonais específicos para proteínas virais expressas; Western blotting; e Southern blot.^{3,8,26}

A técnica de Southern blot é também aplicada para avaliar a clonalidade do EBV encontrado nas neoplasias, a presença de infecção lítica e investigar a ocorrência de integração do genoma viral ao genoma da célula hospedeira.^{8,27} A clonalidade do vírus é verificada através da manutenção do número de repetições de 500pb, descritas como TR (*tandem repeat*), que se encontram nas extremidades do genoma viral. Dentro deste conceito, a verificação de uma única banda de mais de 8,0 Kpb, indica a presença de epissomos com mesmo número de TR, sugerindo um padrão monoclonal do genoma viral.³ Contrariamente, a constatação de bandas de mais de 8,0 Kpb dispostas em escada, apontam para um padrão policlonal. Adicionalmente, a demonstração de bandas de cerca de 4,0 Kpb, indica a presença de genoma linear e subseqüentemente, infecção lítica.⁸

A associação do EBV a neoplasias de origem linfóide, tem sido amplamente estudada. Contudo, os relatos da presença do referido vírus em neoplasias sólidas tem sido cada vez mais freqüente. Segue abaixo uma revisão da literatura, existente até o momento, nos portais PUBMED, CAPES e SCIELO, concernente a associação do EBV em tumores sólidos.

EBV EM TUMORES SÓLIDOS

Carcinoma de Nasofaringe

O Carcinoma de Nasofaringe (CNF) foi a primeira neoplasia de origem epitelial a ser associada ao EBV, relatada por Wolf et al.²⁸ em 1973 e desde então, tem sido vastamente estudada no mundo. Até o momento dessa revisão, foi possível encontrar mais de 700 artigos associando CNF e EBV no portal PUBMED. Nesses tumores, o percentual de associação com o EBV parece não apresentar variações, em todas partes do mundo.⁸ Virtualmente, todos os casos de CNF indiferenciados (também descrito como linfoepitelial ou linfoepitelioma) são EBV positivos, sendo o referido vírus, pouco observado em tipos diferenciados.²³

Níveis plasmáticos elevados de DNA viral é observado em pacientes de estágios inicial e avançado de CNF, sendo sugerido que a quantificação do DNA do EBV, pode ser útil no diagnóstico e monitoramento como também, um indicador de risco para recorrência.²⁹

Nesse tipo tumoral, o EBV desenvolve uma latência do tipo II (tabela 1) e o genoma viral obtido, apresenta caráter monoclonal.²³ A presença do vírus em todas as células tumorais (detectado pela técnica de hibridização *in situ*), aliado ao elevado percentual de associação e a monoclonalidade, são as principais indicações do papel tumorigênico do EBV em CNF.³⁰ Sarac et al.²¹, demonstraram uma correlação positiva entre a expressão de LMP-1 e bcl-2.

Sendo que, a expressão de bcl-2 não foi dependente da expressão de LMP-1. Adicionalmente, Niemhoma et al.³¹, verificaram uma superexpressão de bcl-2 e p53 em casos EBV-positivos, sugerindo que o vírus possa estar envolvido na regulação desses dois oncogenes, atuando como um importante fator etiológico nos CNF.

Carcinoma Gástrico

Além da função bem estabelecida do *Helicobacter pylori*, a participação do EBV no desenvolvimento de carcinoma gástrico (CG) tem sido recentemente demonstrada. A associação do vírus Epstein-Barr aos CGs apresenta uma distribuição mundial, variando de 2 - 18%.³² No Japão, o percentual de associação é de 7%, na Rússia 8,7%, na Alemanha 18%, no México 8,2% e nos Estados Unidos 16%.³³ Segundo Hausen et al.⁹, o EBV também está associado à cerca de 80-100% dos carcinomas gástricos do tipo linfoepitelial.

Os carcinomas gástricos EBV-positivos desenvolvem uma latência do tipo I (tabela 1). Apesar da presença da LMP-2A não ser característico desse tipo de latência, pouca quantidade pode ser expressa em determinadas situações.^{3,9} É interessante notar que o gene LMP-1, um dos principais oncogenes conhecido do EBV, não é expresso nesse tipo de carcinoma. No entanto, recentemente foi demonstrado que outro gene viral, o BARF1, expresso nesse tipo de neoplasia, exerce efeitos imortalizantes em células epiteliais *in vitro*, o que pode indicar uma via alternativa na oncogênese de carcinomas gástricos mediada pelo EBV.⁹

A indicação de que o EBV esteja relacionado ao processo oncogênico nos CGs, assim como nos CNFs, é baseada no significativo percentual de associação com esses tumores, bem como, na presença do vírus em quase todas as células tumorais dos carcinomas gástricos EBV-positivos e o caráter monoclonal destas células. Contudo, Hausen et al.³⁴, não constataram EBV em lesões pré-neoplásicas sugerindo a ocorrência da infecção viral após o desenvolvimento da neoplasia.

Alguns estudos apontam para ocorrência de metilação de supressores tumorais induzida pelo EBV, como um dos mecanismos virais nesse processo.^{35,36,37} Um achado interessante vem dos estudos de Chong et al.³⁷, no qual demonstraram que apesar da elevada frequência de metilação encontrada nos genes p14, p15, p16, TIMP-3, E-caderina, DAPK, GSTPi e MGMT em CGs EBV-positivos, observaram a supressão da expressão de DNA metiltransferases, uma enzima responsável pela metilação do DNA, sugerindo uma via alternativa do vírus para metilação desses genes.

Neoplasias da Musculatura Lisa

A presença do EBV também foi relatada em leiomiomas e leiomiossarcomas, em pacientes imunossuprimidos.³ Inicialmente, o EBV foi demonstrado nestes tumores, em

crianças aidéticas, através da técnica de HIS por MacClain et al.³⁸ Contudo, a análise da clonalidade do genoma viral por Southern blot, revelou um caráter policlonal, sendo também observado, elevados níveis de receptores CD21 na superfície das células tumorais. Adicionalmente, Lee et al.²⁷, estudando três casos de tumor de músculo-liso após transplante, verificaram a expressão de EBNA-2, EBER-1 e ausência de LMP-1 e de receptores CD21. Nesse estudo, a demonstração da expressão de uma das principais oncoproteínas virais, o EBNA-2 e a origem monoclonal do genoma viral são evidências da participação do EBV no desenvolvimento desse tipo de neoplasia. Apesar dos estudos contraditórios quanto a presença do receptor CD21, a participação do EBV parece estar associada à imunossupressão, já que pacientes imunocompetentes não desenvolvem leiomiossarcoma EBV-positivo.³

Carcinoma Intracervical

Apesar da infecção por Papilomavírus Humanos (HPV), especialmente pelos tipos 16 e 18, ser considerada atualmente o principal fator de risco para o desenvolvimento de Carcinoma Intracervical, alguns estudos tem demonstrado que o EBV possa também ter participação nesse processo. Landers et al.³⁹, realizando HIS-DNA e PCR verificaram a presença de EBV em 43% dos carcinomas cervicais estudados e uma menor associação em lesões pré-malignas NIC-II e NIC-III, não sendo detectado em lesões NIC-I e tecidos normais. Recentemente, Shimakage et al.¹², também observaram a presença do EBV em carcinoma cervical, neoplasia cervical intra-epitelial (NIC-I, II, III) e ausência em tecido normal, utilizando as técnicas de imunofluorescência indireta para o EBNA-2 e de hibridização *in situ* com sondas complementares ao RNAm de EBNA-2 e de *BamHI-W*. Este último foi também detectado em casos de cervicite crônica, sugerindo que a expressão de *BamHI W* isoladamente não seja capaz de induzir o desenvolvimento de neoplasias cervicais. Em contrapartida, Hording et al.⁴⁰, fazendo uso da técnica de PCR, investigaram a presença de genoma dos vírus HPV (16, 18) e EBV em espécimes de pacientes da Groelândia e Dinamarca, obtendo positividade apenas para HPV.

Mesmo com os poucos estudos, Shimakage et al.¹², defendem que o EBV é um fator de risco para o desenvolvimento de carcinoma cervical, independente do HPV. Ademais, a demonstração da expressão de EBNA-2 é um importante achado relativo ao papel do EBV na tumorigênese cervical, considerando alguns dos efeitos descritos dessa proteína.

Carcinoma Hepatoceleular

Apesar de algumas controvérsias, alguns estudos demonstram que além do vírus da hepatite B (HBV), o vírus Epstein-Barr pode também estar associado à gênese do Carcinoma Hepatoceleular (CHC).

Sugawara et al.²⁶ detectaram a presença do genoma viral em 13/35 (37%) dos espécimes clínicos provenientes de pacientes japoneses submetidos a hepatectomia, com expressão de BARF0 e EBNA1 em apenas um pequeno percentual de células tumorais (7-13%) e ausência de EBNA-2, -3, -LP, LMP-1, LMP-2A e LMP-2B. Os EBERs que são normalmente expressos nos quatro padrões de latência (tabela 1), também não foram detectados nas amostras positivas para o EBV. Foi verificado ainda, o caráter monoclonal do genoma viral, bem como um elevado percentual de associação do EBV com o vírus da hepatite C (9 dos 13 casos EBV-positivos), sugerindo um sinergismo entre esses vírus no desenvolvimento do Carcinoma Hepatoceleular. Recentemente, Li et al.⁴¹, verificaram a presença da LMP-1 em células tumorais de 15/78 casos de pacientes chineses, através de imuno-histoquímica. Nos dois referidos estudos, não foi verificada correlação significativa entre o EBV e o HBV.

Contrariamente, em estudos realizados na Holanda, Hausen et al.⁴², detectaram fraca positividade para o fragmento *Bam*HI W do EBV, pela técnica de PCR-ensaio imunoenzimático em 5 das 16 amostras estudadas. Não foi observada a expressão de EBNA-1, BARF1, LMP-1, EBERs e ZEBRA, o que segundo os autores, se contrapõem ao papel do EBV na oncogênese hepática, levando a acreditar que o resultado fracamente positivo para o DNA viral, fosse decorrente de amplificação a partir de genoma viral presente em linfócitos infiltrados. Junying et al.⁴³, analisando espécimes de CHC oriundos da Alemanha e Reino Unido, e Akhter et al.⁴⁴ da América do Norte, não detectaram a presença de EBV. Neste último estudo, apenas HBV e/ou HCV (vírus da hepatite C) foram detectados durante a investigação.

No entanto, Chu et al.⁴⁵, analisando 41 espécimes obtidos de pacientes norte-americanos, demonstraram 4 casos positivos. Dois foram evidenciados pela presença de EBER1 e ZEBRA, mas restrita a raros linfócitos do infiltrado. Os outros dois casos envolviam as células tumorais e foram caracterizados pela presença de EBNA-1 e ausência de EBER-1, EBNA-4, LMP-1 e ZEBRA, ocorrendo em pacientes de etnia asiática. Esses achados corroboram com Sugawara et al.²⁶, e apontam para a possibilidade de indivíduos asiáticos, serem mais suscetíveis a desenvolver CHC, quando infectados pelo EBV, o qual atuaria como co-fator nesse processo.

Câncer de Mama

O primeiro a relatar a presença do EBV em câncer de mama foi Labrecque et al.⁴⁶, os quais utilizando a técnica de PCR, amplificando as regiões *BamHI W* e *BamHI C*, obtiveram 19/91 (21%) casos positivos. Subseqüentemente, empregando as técnicas de HIS nos 19 casos positivos, obtiveram 12 (63%) casos com células tumorais marcadas, quando utilizando sondas complementares à seqüência de DNA viral e 6 (31,5%) casos, quando utilizando sondas para EBER-1.

Bonnet et al.⁴⁷, através de PCR, demonstraram a presença de EBV em 51 de 100 casos de carcinoma invasivo primário de mama. Tomando alguns espécimes positivos, puderam constatar através de imuno-histoquímica, a expressão de EBNA-1 em uma fração de células tumorais e a ausência da expressão de EBERs, através da técnica de HIS. Recentemente, Grinstein et al.⁴⁸, observaram a presença de EBV em 14/33 (42%) carcinomas, através de PCR e imuno-histoquímica, caracterizados também pela expressão de EBNA-1 e ausência de LMP-1, ZEBRA e EBER-1. Adicionalmente, o EBV foi detectado em lesões pré-malignas, o que aponta para a participação do vírus na carcinogênese mamária. Tanto Bonnet et al.⁴⁷ como Grinstein et al.⁴⁸, não analisaram a clonalidade do genoma viral, o que poderia fornecer mais evidências referentes ao papel do EBV no desenvolvimento desses tumores. Mais recentemente, Ribeiro-Silva et al.⁴⁹, empregando imuno-histoquímica demonstraram positividade para EBNA-1 em 32/85 (37,6%) casos de carcinoma de mama em pacientes brasileiras, sendo mais freqüentemente associado a carcinomas ductais pouco diferenciados. Não sendo observada a expressão de EBNA-1 em fibroadenomas e tecidos normais.

Os estudos de Chu et al.⁵⁰ e Herrmann & Niedobitek⁵¹, são contrários aos anteriormente citados. Esses autores, fazendo uso das técnicas de HIS-EBER e imuno-histoquímica para EBNA-1, não detectaram os referidos expressos virais em nenhum dos espécimes estudados, sugerindo que os dois referidos genes não estivessem sendo expressos. Adicionalmente, Herrmann & Niedobitek⁵¹ obtiveram positividade em 4 dos 59 casos estudados, fazendo uso da técnica de PCR. Contudo, neste caso é possível que a positividade tenha sido decorrente de amplificação a partir de linfócitos infectados presentes no infiltrado e ao considerar o elevado percentual de positividade observado por Bonnet et al.⁴⁷, é possível que esse último evento também tenha ocorrido em seus experimentos.

Câncer de Pulmão

O EBV tem sido também associado a carcinoma pulmonar do tipo linfóepitelioma (LELC). As primeiras evidências de sua participação decorrem de estudos de Pittaluga et al.⁵²,

em 5 pacientes chineses nos quais foi demonstrada a presença do EBV, através da técnica de HIS, apenas em células epiteliais. Sendo essa infecção de caráter monoclonal.

Corroborando esses achados, Wong et al.⁵³ observaram a presença de EBV (através de HIS-EBER) de caráter monoclonal em 9 dos 167 casos (5,4%) de carcinoma pulmonar do tipo linfopitelioma em pacientes chineses. Ademais, foi observada a presença de LMP-1 e ausência de EBNA-2 em 4 dos 9 casos, através da técnica de imuno-histoquímica. Recentemente, Grinstein et al.⁴⁸, estudando 54 casos de carcinomas, observaram positividade para EBNA-1 em 4 casos (7,4%), sendo a positividade restrita a apenas uma fração das células tumorais (5-30%).

Contrariamente, Castro et al.⁵⁴, utilizando a técnica de hibridização *in situ* para EBERs, não demonstraram EBV em nenhum dos 6 casos de LELC obtidos de pacientes ocidentais, sugerindo que o EBV é mais freqüentemente demonstrado em casos de câncer pulmonar de indivíduos asiáticos. Entretanto, o “n” estudado pelo referido autor foi insuficiente, considerando que em estudos prévios o EBV demonstrou baixa freqüência de associação.

Carcinoma de Glândula Salivar

A presença do EBV tem sido também demonstrada em carcinoma de glândula salivar. Raab-Traub et al.³⁰, verificaram através da técnica de HIS a expressão de RNAm de LMP-1, BARF-0 e EBER-1 em carcinoma indiferenciado de glândulas parótidas, limitado ao tecido tumoral. É importante ressaltar, que o EBV é freqüentemente observado nesse sítio desenvolvendo infecção lítica, contudo, não foi verificada a presença de formas lineares. Posteriormente, Leung et al.⁵⁵, relataram HIS-EBER fortemente positiva e presença de LMP-1, através de imuno-histoquímica em 10/10 (100%) casos de carcinoma linfopitelial de glândulas salivares. Em ambos os estudos o caráter monoclonal do genoma viral foi demonstrado.

Carcinoma Oral

O EBV também tem sido demonstrado em carcinoma oral de células escamosas.⁵⁶⁻⁶¹ Na maioria destes foi verificado um elevado percentual de associação, variando de 25 a 86%, utilizando a técnica de PCR. Entretanto, Higa et al.¹⁴, verificaram a expressão de LMP-1, EBNA-2 (através de imuno-histoquímica) e EBER1 (através de HIS) em 49/95 (51%) casos de pacientes japoneses. Enquanto, Kobayashi et al.⁶² e Gonzalez-Moles et al.⁶³ demonstraram a presença da LMP-1 através de imuno-histoquímica, respectivamente em 6/46 (13%) e 15/78

(19,2%) dos casos estudados. Em ambos trabalhos, a HIS-EBER foi negativa. Contudo, Shimakage et al.⁶⁴, verificou a expressão de EBER1 em 16/24 (66,6%) casos, através de HIS.

Achados conflitantes vem do estudo de Cruz et al.⁶¹, que analisando 36 casos PCR-positivo constataram a não expressão dos transcritos EBNA-1, EBNA-2, LMP-1, LMP-2, BHRF1 e BARF0, através da técnica de RT-PCR. As reações de imuno-histoquímica para ZEBRA, EBNA-1 e LMP-1, também foram negativas.

Apesar de controverso, os estudos denotam que o EBV pode estabelecer infecção latente com expressão de genes latentes em células de carcinoma oral, indicando que o mesmo possa participar no desenvolvimento deste tipo neoplásico, ou como sugerido por Sand et al.⁵⁹, atuar junto de fatores de risco conhecidos, tais como fumo e consumo de álcool.

Outras Neoplasias Associadas

Leung et al.⁶⁵, verificaram a expressão de EBER, através de HIS em 7 de 29 casos de carcinoma sinonasal de pacientes chineses, sendo que dois dos sete casos positivos também expressavam LMP-1. Esse mesmo autor descreveu a presença do vírus em um caso de carcinoma indiferenciado de glândula lacrimal.⁶⁶ Shimakage et al.⁶⁷, relataram a expressão de EBNA-2, LMP-1 e EBERs em 27/27 (100%) de tumores testiculares. Grinstein et al.⁴⁸, demonstraram o EBV em um dos 19 casos de carcinoma de cólon, com uma fração de células tumorais expressando EBNA-1. Também verificou EBV em 7 de 19 amostras de câncer prostático de diversos graus de malignidade, com núcleos das células tumorais fortemente marcados. Kekis et al.⁶⁸, relataram a presença de EBV através da técnica de HIS-EBER, em apenas um caso de carcinoma linfoepitelial pancreático. No estudo realizado por Leung et al.⁶⁹, 2/7 casos de carcinoma de ouvido médio (respectivamente, carcinoma de células escamosas não-queratinizado e carcinoma indiferenciado) foram positivos para EBER. A análise através de imuno-histoquímica demonstrou ausência de LMP-1 e EBNA-2, ambos os casos apresentavam histologia compatível com o tipo linfoepitelioma.

CONCLUSÕES

A associação do vírus Epstein-Barr a muitas das neoplasias sólidas, tem sido demonstrada em estudos recentes, o que justifica a pouca quantidade de literatura e as evidências algumas vezes inconclusivas à respeito da participação viral no processo oncogênico de alguns tumores. Entretanto, a verificação da clonalidade do EBV na maioria desses tumores, sugere que as infecções tenham precedido o processo tumorigênico, apontando fortemente para a participação do vírus nesse processo. A detecção de EBV policlonal ou a expressão parcial de antígenos virais em apenas uma fração das células podem

sugerir mecanismos distintos no processo tumorigênico. Bonnet et al.⁴⁷ e Hausen et al.³⁴ atribuem a expressão de EBNA-1 em apenas uma fração de células tumorais, relatada em alguns trabalhos, a uma baixa expressão dessa proteína ou uma menor sensibilidade da técnica por alguns autores. Entretanto, como discorrido por Ambinder⁷⁰, esse fenômeno pode ser decorrente da perda do genoma viral durante o processo tumorigênico, decorrente de um mecanismo viral do tipo “hit and run”.

Um achado interessante refere-se a maior frequência de alguns tipos tumorais EBV-positivos em indivíduos de etnia asiática, sugerindo que fatores comportamentais e genéticos contribuam para o desenvolvimento dessas neoplasias. A imunossupressão, assim como nas Doenças Linfoproliferativas Pós-transplante (DLPT) e Linfomas Não-Hodgkin em pacientes aidéticos, parece favorecer o desenvolvimento de neoplasias sólidas associadas ao EBV, particularmente os leiomiomas e leiomiossarcomas, permitindo a disseminação do vírus para diversos tecidos, bem como a expressão de vários genes latentes nas células portadoras.

A diversidade de padrões de expressão de genes latentes observados denota a complexidade da infecção pelo EBV. Evidências da heterogeneidade de expressão do EBV associada ao tecido infectado vem com os estudos de Sugawara et al.²⁶ e Chu et al.⁴⁵ referente a CHC e os de Bonnet et al.⁴⁷ e Grinstein et al.⁴⁸, relativos a câncer de mama. Os achados desses autores apresentaram uma característica comum: a presença de EBNA-1 e ausência de EBERs e apontam para a possibilidade de que o EBV estabeleça uma infecção latente com padrão semelhante nesses dois tipos neoplásicos, diferindo de todos os padrões já conhecidos, pela ausência de EBERs.

Devido a essa diversidade de expressão é possível que o vírus esteja associado a neoplasias de outros sítios, mas não tenha sido detectado pela falta de expressão do alvo da técnica empregada. Em alguns estudos observa-se a necessidade de mais de uma abordagem técnica para confirmação da frequência do EBV. A presença do vírus nos infiltrados linfocíticos também deve ser considerada quando se usa a técnica de PCR. Esta técnica, entretanto, torna-se uma ferramenta importante para detecção em tumores onde não se tem conhecimento do padrão de latência. Associada à hibridização *in situ* e a imuno-histoquímica pode posteriormente confirmar e estabelecer o padrão de latência. O comportamento do EBV e o mecanismo pelo qual contribui para o desenvolvimento em algumas neoplasias, ainda requerem mais estudos, mas certamente possui participação relevante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kieff E. Epstein-Barr virus and its replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM. Fundamental Virology. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996. p. 1109-1163.

2. Callan MF. The immune response to Epstein-Barr virus. *Microbes Infect.* 2004 Aug;6(10):937-45.
3. Tsuchiya S. Diagnosis of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2002 Dec;44(3):227-38.
4. Hsieh WS, Lemas MV, Ambinder RF. The biology of Epstein-Barr virus in post-transplant lymphoproliferative disease. *Transpl Infect Dis.* 1999 Sep;1(3):204-12.
5. Murray PG, Young LS. Epstein-Barr virus infection: basis of malignancy and potential for therapy. *Expert Rev Mol Med.* 2001 Nov;15:1-20.
6. Gulley ML. Molecular diagnosis of Epstein-Barr virus-related diseases. *J Mol Diagn.* 2001 Feb;3(1):1-10.
7. Okano M. Haematological associations of Epstein-Barr virus infection. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol.* 2000 Jun;13(2):199-214.
8. Ambinder RF, Mann RB. Detection and characterization of Epstein-Barr virus in clinical specimens. *Am J Pathol.* 1994 Aug;145(2):239-52.
9. zur Hausen A, Brink AA, Craanen ME, Middeldorp JM, Meijer CJ, van den Brule AJ. Unique transcription pattern of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV-carrying gastric adenocarcinomas: expression of the transforming BARTF1 gene. *Cancer Res.* 2000 May 15;60(10):2745-8.
10. Ohga S, Nomura A, Takada H, Hara T. Immunological aspects of Epstein-Barr virus infection. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2002 Dec;44(3):203-15.
11. Chuang TC, Way TD, Lin YS, Lee YC, Law SL, Kao MC. The Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 may act as a transforming suppressor of the HER2/neu oncogene. *FEBS Letters.* 2002; 532: 135-42
12. Shimakage M, Sasagawa T. Detection of Epstein--Barr virus-determined nuclear antigen-2 mRNA by in situ hybridization. *J Virol Methods.* 2001 Apr;93(1-2):23-32.
13. Kaiser C, Laux G, Eick D, Jochner N, Bornkamm GW, Kempkes B. The proto-oncogene c-myc is a direct target gene of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *J Virol.* 1999 May;73(5):4481-4.
14. Higa M, Kinjo T, Kamiyama K, Iwamasa T, Hamada T, Iyama K. Epstein-Barr virus (EBV) subtype in EBV related oral squamous cell carcinoma in Okinawa, a subtropical island, in southern Japan, compared with Kitakyushu and Kumamoto in mainland Japan. *J Clin Pathol* 2002;55:414-23.
15. Niller HH, Salamon D, Ilg K, Koroknai A, Banati F, Schwarzmann F, et al. EBV-associated neoplasms: alternative pathogenetic pathways. *Med Hypotheses.* 2004;62(3):387-91.
16. Cludts I, Farrell PJ. Multiple functions within the Epstein-Barr virus EBNA-3A protein. *J Virol.* 1998 Mar;72(3):1862-9.
17. Knecht H, Berger C, al-Homsi AS, McQuain C, Brousset P. Epstein-Barr virus oncogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1997 Jul;26(2):117-35.
18. Takada K, Nanbo A. The role of EBERs in oncogenesis. *Semin Cancer Biol.* 2001 Dec;11(6):461-7.
19. Niller HH, Salamon D, Ilg K, Koroknai A, Banati F, Bauml G, et al. The in vivo binding site for oncoprotein c-Myc in the promoter for Epstein-Barr virus (EBV) encoding RNA (EBER) 1 suggests a specific role for EBV in lymphomagenesis. *Med Sci Monit.* 2003 Jan;9(1):HY1-9.
20. Dolcetti R, Boiocchi M. Epstein-Barr virus in the pathogenesis of Hodgkin's disease. *Biomed & Pharmacother.* 1998; 52: 13-25.
21. Sarac S, Akyol U, Kanbur B, Pouraz A, Akyol G, Yilamz T, et al. Bcl-2 and LMP1 Expression in Nasopharyngeal Carcinomas. *Am J Otolaryngol.* 2001 Nov; 22(6):377-382.

22. Tao Q, Srivastava G, Loke SL, Ho FC. Lack of correlation between expression of Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein and bcl-2 oncoprotein in vivo. *J Clin Pathol.* 1994 Jul;47(7):589-91.
23. Raab-Traub N. Epstein-Barr virus in the pathogenesis of NPC. *Semin Cancer Biol.* 2002 Dec;12(6):431-41.
24. Niedobitek G. Epstein-Barr virus infection in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma. *Mol Pathol.* 2000 Oct;53(5):248-54.
25. Thorley-Lawson DA. Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2001 Oct;1(1):75-82.
26. Sugawara Y, Mizugaki Y, Uchida T, Torii T, Imai S, Makuuchi M, et al. Detection of Epstein-Barr virus (EBV) in hepatocellular carcinoma tissue: a novel EBV latency characterized by the absence of EBV-encoded small RNA expression. *Virology.* 1999 Apr 10;256(2):196-202.
27. Lee ES, Locker J, Nalesnik M, Reyes J, Jaffe R, Alashari M, et al. The association of Epstein-Barr virus with smooth-muscle tumors occurring after organ transplantation. *N Engl J Med.* 1995 Jan 5;332(1):19-25.
28. Wolf H, zur Hausen H, Becker V. EB viral genomes in epithelial nasopharyngeal carcinoma cells. *Nature* 1973 ;244: 245–7.
29. Fan H, Gulley ML. Epstein-Barr viral load measurement as a marker of EBV-related disease. *Mol Diagn.* 2001 Dec;6(4):279-89.
30. Raab-Traub N, Rajadurai P, Flynn K, Lanier AP. Epstein-Barr virus infection in carcinoma of the salivary gland. *J Virol.* 1991 Dec;65(12):7032-6.
31. Niemhom S, Kitazawa S, Murao S, Kunachak S, Maeda S. Co-expression of p53 and bcl-2 may correlate to the presence of Epstein-Barr virus genome and the expression of proliferating cell nuclear antigen in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Lett.* 2000 Nov 28;160(2):199-208.
32. Chang MS, Kim HS, Kim CW, Kim YI, Lan Lee B, Kim WH. Epstein-Barr virus, p53 protein, and microsatellite instability in the adenoma-carcinoma sequence of the stomach. *Hum Pathol.* 2002 Apr;33(4):415-20.
33. Koriyama C, Akiba S, Iriya K, Yamaguti T., Hamada GS, Itoh T, et al. Epstein-Barr Virus-associated Gastric Carcinoma in Japanese Brazilians and Non-Japanese Brazilians in Jpn. *J. Cancer Res.* 2001 Sep;92: 911–917.
34. zur Hausen A, van Rees BP, van Beek J, Craanen ME, Bloemena E, Offerhaus GJ, et al. Epstein-Barr virus in gastric carcinomas and gastric stump carcinomas: a late event in gastric carcinogenesis. *J Clin Pathol.* 2004 May;57(5):487-91.
35. Kang GH, Lee S, Kim WH, Lee HW, Kim JC, Rhyu MG, et al. Epstein-Barr virus-Positive Gastric Carcinoma Demonstrates Frequent Aberrant Methylation of Multiple Genes and Constitutes CpG Island Methylator Phenotype-Positive Gastric Carcinoma. *Am J Pathol.* 2002; 160(3): 787-94.
36. Osawa T, Chong JM, Sudo M, Sakuma K, Uozaki H, Shibahara J, et al. Reduced expression and promoter methylation of p16 gene in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Jpn J Cancer Res.* 2002 Nov;93(11):1195-200.
37. Chong JM, Sakuma K, Sudo M, Ushiku T, Uozaki H, Shibahara J, et al. Global and non-random CpG-island methylation in gastric carcinoma associated with Epstein-Barr virus. *Cancer Sci.* 2003 Jan;94(1):76-80.
38. McClain KL, Leach CT, Jenson HB, Joshi VV, Pollock BH, Parmley RT, et al. Association of Epstein-Barr virus with leiomyosarcomas in children with AIDS. *N Engl J Med.* 1995 Jan 5;332(1):12-8.
39. Lander RJ, O'Leary JJ, Crowley M, Healy I, Annis P, Burke L, et al. Epstein-Barr virus in normal, pre-malignant, and malignant lesions of the uterine cervix. *J Clin Pathol.* 1993 Oct;46(10):931-35.

40. Hording U, Daugaard S, Bock JE. Human papillomavirus, Epstein-Barr virus, and cervical carcinoma in Greenland. *Int J Gynecol Cancer*. 1992 Nov;2(6):314-317.
41. Li W, Wu BA, Zeng YM, Chen GC, Li XX, Chen JT, et al. Epstein-Barr virus in hepatocellular carcinogenesis. *World J Gastroenterol*. 2004;10(23):3409-3413.
42. zur Hausen A, van Beek J, Bloemena E, ten Kate FJ, Meijer CJ, van den Brule AJ. No role for Epstein-Barr virus in Dutch hepatocellular carcinoma: a study at the DNA, RNA and protein levels. *J Gen Virol*. 2003 Jul;84(Pt 7):1863-9.
43. Junying J, Herrmann K, Davies G, Lissauer D, Bell A, Timms J, et al. Absence of Epstein-Barr virus DNA in the tumor cells of European hepatocellular carcinoma. *Virology*. 306 (2003) 236-243.
44. Akhter S, Liu H, Prabhu R, DeLucca C, Bastian F, Garry RF, et al. Epstein-Barr virus and human hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*. 2003 Mar 20;192(1):49-57.
45. Chu PG, Chen YY, Chen W, Weiss LM. No direct role for Epstein-Barr virus in American hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol*. 2001 Oct;159(4):1287-92.
46. Labrecque LG, Barnes DM, Fentiman IS, Griffin BE. Epstein-Barr virus in epithelial cell tumors: a breast cancer study. *Cancer Res*. 1995 Jan 1;55(1):39-45.
47. Bonnet M, Guinebretiere JM, Kremmer E, Grunewald V, Benhamou E, Contesso G, et al. Detection of Epstein-Barr virus in invasive breast cancers. *J Natl Cancer Inst*. 1999 Aug 18;91(16):1376-81.
48. Grinstein S, Preciado MV, Gattuso P, Chabay PA, Warren WH, De Matteo E, et al. Demonstration of Epstein-Barr virus in carcinomas of various sites. *Cancer Res*. 2002 Sep 1;62(17):4876-8.
49. Ribeiro-Silva A, Ramalho LN, Garcia SB, Zucoloto S. Does the correlation between EBNA-1 and p63 expression in breast carcinomas provide a clue to tumorigenesis in Epstein-Barr virus-related breast malignancies? *Braz J Med Biol Res*. 2004 Jan;37(1):89-95.
50. Chu JS, Chen CC, Chang KJ. In situ detection of Epstein-Barr virus in breast cancer. *Cancer Lett*. 1998 Feb 13;124(1):53-7.
51. Herrmann K, Niedobitek G. Lack of evidence for an association of Epstein-Barr virus infection with breast carcinoma. *Breast Cancer Res*. 2003;5(1):13-7.
52. Pittaluga S, Wong MP, Chung LP, Loke SL. Clonal Epstein-Barr virus in lymphoepithelioma-like carcinoma of the lung. *Am J Surg Pathol*. 1993 Jul;17(7):678-82.
53. Wong MP, Chung LP, Yuen ST, Leung SY, Chan SY, Wang E, et al. In situ detection of Epstein-Barr virus in non-small cell lung carcinomas. *J Pathol*. 1995 Nov;177(3):233-40.
54. Castro CY, Ostrowski ML, Barrios R, Green LK, Popper HH, Powell S, et al. Relationship between Epstein-Barr virus and lymphoepithelioma-like carcinoma of the lung: a clinicopathologic study of 6 cases and review of the literature. *Hum Pathol*. 2001 Aug;32(8):863-72.
55. Leung SY, Chung LP, Yuen ST, Ho CM, Wong MP, Chan SY. Lymphoepithelial carcinoma of the salivary gland: in situ detection of Epstein-Barr virus. *J Clin Pathol*. 1995 Nov;48(11):1022-7.
56. Mao E, Smith C. Detection of Epstein-Barr virus (EBV) DNA by the polymerase chain reaction (PCR) in oral smears from healthy individuals and patients with squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1993;22:12-7.
57. D'Costa J, Saranath D, Sanghvi V, Mehta A. Epstein-Barr virus in tobacco-induced oral cancers and oral lesions in patients from India. *J Oral Pathol Med* 1998;27:78-82.
58. Gonzalez-Moles MA, Galindo P, Gutierrez J, Rodriguez-Archilla A, Ruiz-Avilla I, Sanchez-Fernandez E. Expression of the p53 protein in oral squamous cell carcinomas associated with Epstein-Barr virus. *Microbios*. 2000;102(403):147-54.

59. Sand LP, Jalouli J, Larsson PA, Hirsch JM. Prevalence of Epstein-Barr virus in oral squamous cell carcinoma, oral lichen planus, and normal oral mucosa. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology*. 2002 May;93(5):586-92.
60. Szkaradkiewicz A, Kruk-Zagajewska A, Wal M, Jopek A, Wierzbicka M, Kuch A. Epstein-Barr virus and human papillomavirus infections and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Clin Exp Med*. 2002 Nov;2(3):137-41.
61. Cruz I, Brule A, Brink A, et al. No direct role for Epstein-Barr virus in oral carcinogenesis: a study at the DNA, RNA and protein levels. *Int J Cancer* 2000;86:356-61.
62. Kobayashi I, Shima K, Saito I, et al. Prevalence of Epstein-Barr virus in oral squamous cell carcinoma. *J Pathol* 1999;189:34-9.
63. Gonzalez-Moles MA, Gutierrez J, Rodriguez MJ, Ruiz-Avila I, Rodriguez-Archilla A. Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP-1) expression in oral squamous cell carcinoma Laryngoscope. 2002 Mar;112(3):482-7.
64. Shimakage M, Horii K, Tempaku A, Kakudo K, Shirasaka T, Sasagawa T. Association of Epstein-Barr virus with oral cancers. *Hum Pathol*. 2002 Jun;33(6):608-14.
65. Leung SY, Yuen ST, Chung LP, Kwong WK, Wong MP, Chan SY. Epstein-Barr virus is present in a wide histological spectrum of sinonasal carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 1995 Sep;19(9):994-1001.
66. Leung SY, Chung LP, Ho CM, Yuen ST, Wong MP, Kwong WK. An Epstein-Barr virus positive undifferentiated carcinoma in the lacrimal sac. *Histopathology*. 1996 Jan;28(1):71-5.
67. Shimakage M, Oka T, Shinka T, Kurata A, Sasagawa T, Yutsudo M. Involvement of Epstein-Barr virus expression in testicular tumors. *J Urol*. 1996 Jul;156(1):253-7.
68. Kekis PB, Murtin C, Kunzli BM, Kappler A, Buchholz B, Buchler MW, et al. Epstein-Barr virus-associated lymphoepithelial carcinoma in the pancreas. *Pancreas*. 2004 Jan;28(1):98-102.
69. Leung SY, Yuen ST, Ho CM, Kwong WK, Chung LP. Presence of Epstein-Barr virus in lymphoepithelioma-like carcinoma of the middle ear. *J Clin Pathol* 1998;51:602-605.
70. Ambinder RF. Gammaherpesviruses and "Hit-and-Run" oncogenesis. *Am J Pathol*. 2000 Jan;156(1):1-3.

Tabela 1: Genes expressos do EBV quanto aos tipos de latência e tecido associado.

Tipo de Latência	TECIDO ASSOCIADO	Genes expressos pelo EBV											
		EBNA-1	-2	-3A	-3B	-3C	LP	LMP1	LMP2A	LMP2B	EBERs	BARF0	BARF1
I	Linfoma de Burkitt	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
	Carcinoma Gástrico	+	-	-	-	-	-	-	+/-	-	+	+	+
II	Carcinoma de Nasofaringe	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	DH ^I ; Linfoma de células T	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
III	DLPT ^{II} ; Linfoma-AIDS ^{III}	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
IV	Linf. B circulantes ^{IV}	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+		
Outros	Hepatocarcinoma	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
	Leiomiossarcoma ^V			+				-			+		

I. DH, Doença de Hodgkin

II. DLPT, Doença Linfoproliferativa Pós-transplante

III. Linfoma não-Hodgkin associado a AIDS

IV. Linfócitos B circulantes de indivíduos saudáveis portadores

V. Leiomiossarcoma em indivíduos imunocomprometidos

Referências 3,7,8,10,18,26,27,29

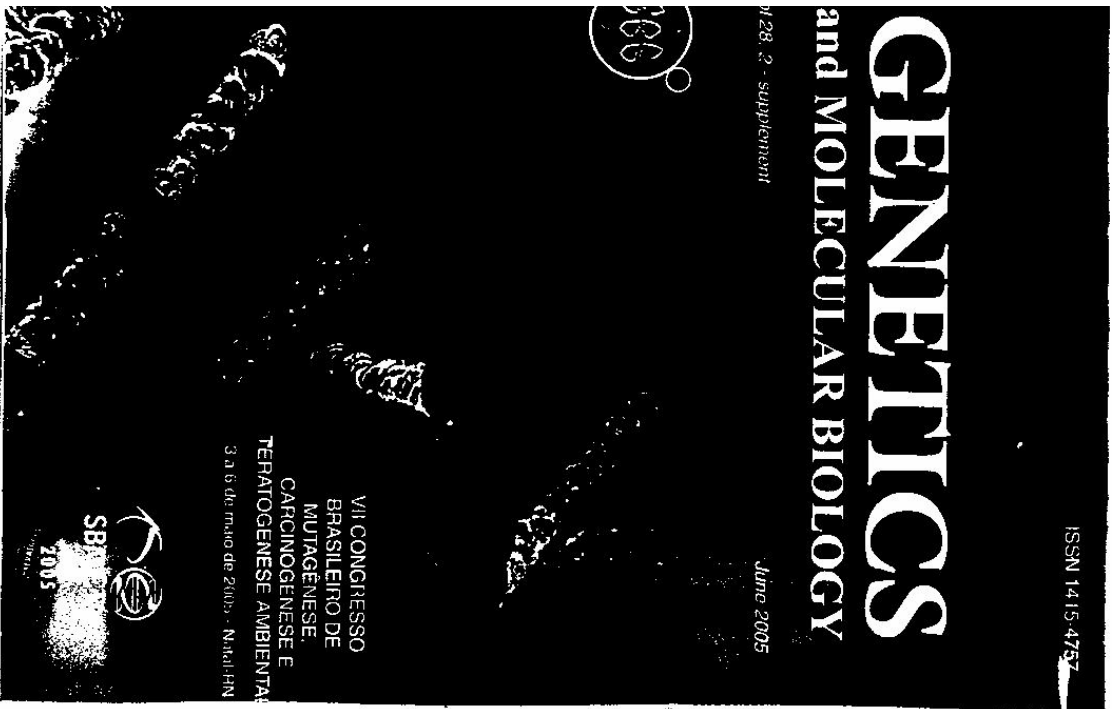
Anexo VIII

ISSN 1415-4752

June 2005

Volume 28, 2 - supplement

GENETICS and MOLECULAR BIOLOGY



VII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
MUTAGÊNESE,
CARCINOGENESE E
TERATOGENESE AMBIENTAL
3 a 6 de maio de 2005 - Natal/ RN

SBI
2005

P105 PERFIL DE EXPRESSÃO DE BCL-2 E BAX EM CASOS DE ADENOCARCINOMA GÁSTRICO DO ESTADO DO CEARÁ.

Marcos Antonio Pereira de Lima 1, Marcos Aurélio Pessoa Barros 2, Luciana Gomes Rocha de Aranda 3, Leila Carla da Cunha Guimarães 1, Tiziane Gonçalves de Carvalho 1, Márcia Valéria Pionbeira Ferreira 1, Silvia Helena B. Rabenhorst 1, 1 Departamento de Patologia e Medicina Legal - Universidade Federal do Ceará; 2 Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza; 3 LaboRocha.

O câncer de estômago é o segundo tipo de neoplasia mais frequente e a segunda maior causa de mortalidade por câncer no mundo. Dentre os tumores gástricos malignos, os mais observados são os adenocarcinomas, que compreendem cerca 95% do total. Como em outros tipos tumorais, a desregulação de genes codificadores de proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular ou na morte celular programada (apoptose), possuem papel relevante na tumorigênese gástrica. Das proteínas envolvidas na apoptose, podemos destacar a família de proteínas Bcl-2, que regulam esta via através de um equilíbrio dinâmico entre seus membros, tais como Bax e Bad (pró-apoptóticos) e Bcl-2 e Bcl-xL (anti-apoptóticos). Relatos na literatura sobre a contribuição da inibição da apoptose no processo tumorigênico gástrico tem sido contraditórios. Assim o objetivo deste estudo foi avaliar a apoptose, através da detecção das proteínas Bcl-2 e Bax, em 29 casos de adenocarcinoma gástrico. O método utilizado foi o imunohistoquímico Streptavidina Biotina-Peroxidase (SABP), utilizando anticorpos monoclonais (DAKO) nas diluições 1:40 e 1:300 respectivamente. Dos casos estudados, 19 (65,5%) foram positivos para Bax, 1 (3,4%) para Bcl-2 e 1 (3,4%) para ambas as proteínas, com marcação mais intensa para Bax. Os 8 (27,5%) casos restantes, foram negativos para ambas proteínas. A localização predominante dos tumores estudados foi a região distal, com classificação T3. Dos 29 casos, dois apresentaram metástase à distância, mas nenhum estava associado às refurcadas proteínas. Os resultados acima demonstram uma predominância do padrão pró-apoptótico, sugerindo que neste tipo tumoral, o controle da apoptose, não seja a principal via desregulada.

Apoio Financeiro: CAPES

Anexo IX

ISSN 1413-4752

Vol. 28, 2 - supplement

GENETICS
and MOLECULAR BIOLOGY

Vol. 28, 2 - supplement

ISSN 1413-4752

VIL CONGRESSO
BRASILEIRO DE
MUTAGÊNESE
CARCINOGENESE E
TERATOGENESE AMBIENTAL

SBMCTA
2005

São de Inhamitanga - Natal-RN

P119 CORRELAÇÃO DA PRESENÇA DO VÍRUS DE EPSTEIN-BARR (EBV) EM
ADENOCARCINOMAS GÁSTRICO COM A EXPRESSÃO DE BCL-2.

Silvia Helena B. Robertazzi¹, Marcos Antonio P. de Lima¹, Angela Rosa André¹, Adriana Ferrasi², Luciana Gomes Rocha de Arruda³, Carlos Henrique Paiva Grangeiro¹, Maria Inês de Moura Campos Parini². 1)Departamento de Patologia e Medicina Legal – UFC; 2)Departamento de Clínica Médica- FM- Unesp- Botucatu; 3)IaboRocha.

Dentre os tumores malignos do estômago, os adenocarcinomas correspondem a aproximadamente 95% do total. Diversos fatores estão envolvidos na carcinogênese gástrica, tais como fatores ambientais, éticos e genéticos. Dentre os fatores etiológicos o mais relevante parece ser a presença do *H. pylori*, contudo, estudos em várias partes do mundo apontam para a participação do vírus de Epstein-Barr (EBV), nesse processo. Alguns autores correlacionam a presença do EBV com a ativação da expressão de algumas oncoproteínas, as quais poderiam explicar o seu papel na tumorigênese. Uma proteína comumente citada como ativada pelo EBV é a proteína anti-apoptótica Bcl-2. No intuito de verificar a presença do EBV em tumores de estômago, coletamos 20 casos de adenocarcinoma gástrico de pacientes submetidos à gastrectomia no Hospital da Santa Casa de Fortaleza e Universidade Walter Cantú da UFC. De cada paciente foram obtidos espécimes tumorais e de mucosa normal, para extração de DNA genômico e subsequente detecção viral através da técnica de PCR (utilizando primers específicos para o gene da proteína viral EBNA-1). A expressão de bcl-2, foi verificada através da técnica de imunohistoquímica Streptavidina Biotina-Peroxidase (SABP), utilizando anticorpo monoclonal na diluição 1:40 (Dako; clone 124) em 12 dos casos estudados. Dentre os 20 casos analisados, 7 (35%) espécimes tumorais foram positivos para o EBV, sendo que 5 destes foram positivos concomitantemente em espécimes normais e tumorais, 2 apenas em espécimes tumorais e 10 casos positivos apenas em tecido normal. Dos 12 tumores analisados quanto à expressão de Bcl-2, apenas um caso foi positivo, sendo o mesmo, negativo para EBV. Nossos achados superam o percentual de associação do EBV com carcinoma gástrico, descrito na literatura usando a técnica de hibridização *in situ* (2-18%). Isso pode ser justificado pelo fato da técnica empregada ser diferente. No entanto, a demonstração do vírus exclusivamente em tecido tumoral, aponta para o envolvimento deste no desenvolvimento dessas neoplasias. Nesta amostra estudada não foi verificada correlação entre a presença do EBV e a expressão de Bcl-2.

Apoio Financeiro: CAPES, CNPq

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)