

**ESTUDO DA FREQUÊNCIA DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DE
EPSTEIN-BARR EM ADENOCARCINOMAS GÁSTRICOS,
SUA RELAÇÃO COM O CICLO CELULAR E SINTASES DO
ÓXIDO NÍTRICO**

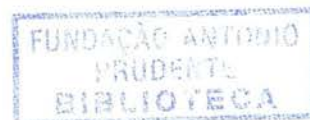
MARIA DIRLEI FERREIRA DE SOUZA BEGNAMI

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio Prudente
para a obtenção do título de Mestre em Ciências.**

Área de concentração: Oncologia

**Orientador: Prof. Dr.
Fernando Augusto Soares**

**São Paulo
2003**



FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do Centro de Tratamento e Pesquisa
Hospital do Câncer A.C. Camargo

Begnami, Maria Dirlei Ferreira de Souza

Estudo da frequência da infecção pelo vírus de Epstein-Barr em adenocarcinomas gástricos, sua relação com o ciclo celular e sintases do óxido nítrico / Maria Dirlei Ferreira de Souza Begnami – São Paulo, 2003.

70p.

Dissertação(mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências-Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Fernando Augusto Soares

Descritores: 1. VÍRUS EPSTEIN-BARR. 2. CÂNCER GÁSTRICO. 3. CICLO CELULAR. 4. APOPTOSE. 5. ÓXIDO NÍTRICO. 6. PROTEINA P53.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **João e Nair**, exemplos de humildade e dedicação que nortearam o caminho por mim trilhado.

Ao **Marcos**, pelo companheirismo e carinho, que me ajudaram a finalizar mais esta etapa da minha vida.

Aos meus filhos **Bruno e Maria Olívia**, por darem sentido à minha vida.

Fundação Antonio Prudente
Ana Maria Rodrigues Alves Kunhert
Coordenadora Pós-Graduação

EXEMPLAR
ESPECIAL

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma maneira ajudaram na realização deste trabalho, em especial:

Ao **Profº. Dr. Fernando Augusto Soares**, meu orientador, pela confiança, dedicação, paciência e conhecimentos a mim direcionados.

Aos colegas patologistas do Hospital do Câncer, **Dr. Clóvis A. Pinto, Dr. Gilles Landmann e Dra. Nara Granja** pelo companheirismo e espírito de equipe que permitiram com que este trabalho fosse finalizado.

Aos residentes do **Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer**, que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

À **Sra. Carmen Varoli e Dr. Reinaldo Garcia** cuja apoio e participação foram essenciais para a finalização deste trabalho.

À **Alexandra Cardozo Longo** pela paciência, empenho e presteza com que se apresentou nestes anos de convívio.

À **Márcia e Ana**, secretárias da pós-graduação da Fundação Antonio Prudente, pela ajuda e dedicação durante a realização deste trabalho.

À **Sra. Sueli Nonogaki** pelo apoio técnico na realização das reações imunohistoquímicas e de hibridização *in situ*.

Aos participantes da **Banca de Qualificação Dra Ana Margarida Nogueira, Dra Maria Betânia M Araújo, Dra Mirian Trevisan e Dr André L Montagnini**, pela atenção e colaboração fundamentais para o bom êxito deste trabalho.

À **Profª Dra. Maria do Rosário** pela atenção e dedicação, fundamentais na análise estatística dos resultados.

A todos os funcionários do **Departamento de Anatomia Patológica**, cujo empenho e presteza, permitiram que este trabalho fosse concluído.

À **Sra. Suely Francisco**, chefe da Biblioteca do Hospital do Câncer, pela atenção e colaboração na realização deste trabalho.

RESUMO

O vírus de Epstein-Barr (EBV) está diretamente implicado na patogênese de uma variedade de neoplasias principalmente em alguns tipos de linfomas. Recentemente a associação de infecção pelo EBV e carcinomas tem sido demonstrada na literatura e a associação de EBV e carcinomas gástricos tem sido relatada.

O EBV é um vírus da família dos herpesvirus que infecta linfócitos B e células epiteliais, conferindo às células um estado de latência, estabelecendo uma infecção persistente no hospedeiro. A associação entre a infecção pelo EBV e expressão de proteínas associadas à apoptose nos carcinomas gástricos já foi relatada na literatura, porém os resultados entre os diversos autores ainda são controversos.

O óxido nítrico (NO, do inglês *nitric oxide*) é um importante agente bioativo e uma molécula sinalizante mediadora de diversas funções como vasodilatação, neurotransmissão e metabolismo do ferro. Na biologia tumoral, os seus efeitos são complexos e ambíguos. A atuação do NO e de suas sintases (NOS, do inglês *nitric oxide synthases*) tem sido demonstrada em vários tumores com implicação na carcinogênese, resposta imune, citotoxicidade e angiogênese.

Em nosso estudo, a presença de EBV, através de hibridação *in situ* foi pesquisada em 118 casos de carcinomas gástricos, utilizando-se transcritos de RNA (EBER-1). A comparação entre carcinomas gástricos EBV positivos

e EBV negativos em relação à pesquisa de proteína de membrana latente (LMP-1), proteínas da família do Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-x, Bak e Bax) e sintases do óxido nítrico (NOS1, NOS2 e NOS3) foi realizada.

A presença de EBER-1 foi detectada em 9 dos 118 (7%) casos. A positividade para a LMP1 foi detectada em 5 dos 9 casos EBER-1 positivos. A expressão das proteínas associadas à apoptose, p53 e sintases do óxido nítrico (NOS 1, NOS2 e NOS3) estavam aumentadas de maneira geral nos carcinomas gástricos, mas não mostraram diferenças de expressão nos grupos de carcinomas gástricos EBV+ e EBV-.

Em relação às características demográficas e histopatológicas, os carcinomas gástricos EBV+ apresentaram maior frequência no sexo masculino, com localização na região da cárdia, sendo comuns no tipo difuso, acompanhados por infiltrado inflamatório linfocitário de moderada a intensa quantidade.

Este estudo, portanto demonstrou a frequência de infecção por EBV nos carcinomas gástricos, correlacionando-se com algumas características demográficas e histopatológicas que permitissem uma melhor distinção entre os grupos de carcinomas EBV+ e EBV-. A pesquisa de marcadores imuno-histoquímicos de proteínas associadas à apoptose, ciclo celular e sintases do óxido nítrico, mostrou que embora os grupos exibissem expressões semelhantes destas proteínas, pequenas diferenças de expressão puderam ser observadas. Estas diferenças poderiam representar um mecanismo de escape do controle da divisão celular e apoptose que permitiriam uma disseminação tumoral e resistência ao tratamento.

SUMMARY

Epstein- Barr virus (EBV) is directly implicated in the pathogenesis of a variety of undifferentiated carcinomas and has also been identified in conventional adenocarcinomas of the stomach. EBV is an ubiquitous herpesvirus that infects and establishes a persistent infection in the host. There have been several studies that compare the occurrence of EBV in gastric carcinomas with apoptotic molecules, with disparate results. However, the roles of these apoptotic molecules in EBV+ gastric tumors need to be elucidated.

Nitric oxide (NO) is an important bioactive agent and signaling molecule that mediates a diverse array of actions such as vasodilatation, neurotransmission, and iron metabolism. There has been mounting evidence that NO acts as a carcinogen. Recent studies have examined the expression and activity of the NOS isoforms in human cancer and its relationship with angiogenesis, apoptosis and cell proliferation.

In this study, 118 cases of gastric carcinomas were evaluated for the presence of EBV using a sensitive in situ hybridization assay targeting Epstein-Barr virus- encoded RNA1 (EBER1) transcripts. Immunohistochemistry was performed to evaluate the expression of latent membrane protein-1 (LMP-1), proteins of the Bcl-2 family (Bcl-2, Bcl-x, Bax and Bak), p53 and NOS. Five cases of 9 EBER-1+ were positive for LMP1. EBER1 was detected in 9 of 118 (7%) of cases. The expression of apoptosis-

associated proteins, p53 and NOS showed no correlation with EBV infection, except the expression of Bak, that was lower in cases EBER1- positive than EBER1- negative.

Clinicopathological data of EBV+ showed male predominance, preferentially localization in the cardiac region, diffuse patterns accompany relatively strong lymphocyte infiltration.

In conclusion, it is clear that EBV is associated with some cases of gastric carcinomas. EBER1-positive carcinomas were characterized by male dominance, preferential location in cardia region, prevalence in the diffuse type with intense lymphoid infiltrate. No association was showed with proteins of apoptosis (Bcl-2, Bcl-x , Bak and Bax). Expression of NOS and p53 also showed no correlation with EBV positivity. Some cases reveled immunoposivity cells for LMP1 latent membrane antigen. This suggests that the EBV-positive gastric carcinomas may have on oncogenic pathway similar to that of other EBV-associated carcinomas and is distinct from the EBV-negative gastric carcinomas.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1A** HIS demonstrando marcação por EBER1, com intensa positividade das células neoplásicas (aumento original 200x) 29
- Figura 1B** HIS demonstrando intensa marcação nuclear das células neoplásicas (aumento original 400x) 29
- Figura 2A** carcinoma gástrico do tipo difuso, exibindo células em anel de sinete (H&E, aumento original 200x) 30
- Figura 2B** carcinoma gástrico do tipo intestinal com formação de estruturas glandulares (H&E, aumento original 100x) 30
- Figura 3A:** células neoplásicas acompanhadas por acentuada quantidade de linfócitos (H&E, aumento original 200x) 35
- Figura 3B** IHQ demonstrando marcação anti LMP1 com positividade citoplasmática das células neoplásicas (aumento original 200x) 35
- Figura 4A** IMQ demonstrando marcação anti p53 com positividade nuclear das células neoplásicas (aumento original 200x) 36
- Figura 4B** IHQ demonstrando marcação anti Bcl-2, nas células neoplásicas (aumento original 200x) 36
- Figura 5A** IHQ demonstrando marcação anti Bcl-x, com positividade citoplasmática nas células neoplásicas (aumento original 200x) 37
-

Figura 5B IHQ demonstrando marcação anti Bax, com intensa positividade das células neoplásicas (aumento original 200x) 37

Figura 6A IHQ demonstrando marcação anti Bak no citoplasma das células neoplásicas (aumento original 200x) 38

Figura 6B IHQ anti-NOS1: com forte marcação no citoplasma das células neoplásicas (aumento original 400x) 38

Figura 7A IHQ anti NOS2, com marcação nas células neoplásicas (aumento original 200x) 39

Figura 7B IMQ demonstrando marcação anti NOS3 nas células neoplásicas e células endoteliais (aumento original 200x) 39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Anticorpos utilizados, clones, origem e diluição	20
Tabela 2	Número e porcentagem de pacientes com carcinomas gástricos, segundo dados demográficos e clínicos	27
Tabela 3	Características clínicas e histopatológicas dos carcinomas gástricos EBV+ e EBV-	28
Tabela 4	Expressão imuno-histoquímica das proteínas associadas a apoptose, p53 e sintases do óxido nítrico nos carcinomas gástricos EBV+ e EBV-	34
Tabela 5	Características clínicas, histopatológicas e padrão de expressão imunohistoquímica da LMP1 nos carcinomas gástricos EBER1+	41

LISTA DE ABREVIATURAS

ADG EBV-	adenocarcinoma gástrico negativo para o vírus de Epstein-Barr
ADG EBV+	adenocarcinoma gástrico positivo para o vírus de Epstein-Barr
ADG	adenocarcinoma gástrico
BSA	solução de albumina bovina
cNOS	sintase do óxido nítrico constitucional
DNA	ácido desoxiribonucleico
EBER	RNA que codifica o vírus de Epstein-Barr
EBNA	antígeno nuclear do vírus de Epstein-Barr
EBV	vírus de Epstein-Barr
eNOS	sintase do óxido nítrico endotelial
HE	hematoxilina e eosina
HIS	hibridação in situ
IMQ	imuno-histoquímica
iNOS	sintase do óxido nítrico induzida
LMP	proteína latente de membrana
LP	proteínas latentes
nNOS	sintase do óxido nítrico neuronal
NO	óxido nítrico
NOS	sintase do óxido nítrico
PBS	do inglês <i>phosphate buffered saline</i>
pPLA	proteínas ligadas à apoptose
pPPC	proteínas ligadas à proliferação celular
RNA	ácido ribonucleico
TBS	do inglês <i>triphosphate buffered saline</i>
TP53	proteína p53
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	2
2	OBJETIVOS	13
3	MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1	Casuística	15
3.2	Imuno-histoquímica	16
3.3	Hibridação <i>In Situ</i>	21
3.4	Análise Estatística	23
4	RESULTADOS	25
5	DISCUSSÃO	43
6	CONCLUSÕES	57
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
	ANEXOS	
	Anexo 1 - Banco de dados	
	Anexo 2 - Artigo submetido	

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O trato gastrointestinal é sede muito freqüente de neoplasias malignas. Em nosso país o câncer de estômago ocupa o terceiro lugar em freqüência, sendo estimados cerca de 20420 casos novos de câncer por ano (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2002). Apresenta uma das maiores taxas de mortalidade de todos os tumores no homem quando comparados a outros tipos de tumores malignos (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2002). Muitos são os fatores etiológicos ligados ao desenvolvimento dos adenocarcinomas gástricos (ADG), como fatores genéticos, dietéticos e ambientais. Nos últimos anos ganhou bastante evidência a importância do *H. pylori* no desenvolvimento do adenocarcinoma gástrico (BLASER et al. 1995; WU et al. 2000). Estudos moleculares tem demonstrado que as células do epitélio gástrico infectadas pelo *H. pylori* podem alterar o sistema de transdução de sinal e promover proliferação das próprias células (JONES et al. 1997; HAHM et al. 1998). Em adição aos fatores dietéticos e ao *H. pylori*, a associação da infecção pelo vírus de *Epstein-Barr* e o ADG têm sido descrita (SHIBATA et al. 1991; MORI et al. 1994), embora em nosso meio existam poucos trabalhos sobre o assunto (HAYASHI et al. 1998).

O vírus de Epstein-Barr (EBV) é um membro da família herpesvírus que infecta e causa uma infecção persistente no hospedeiro. O EBV é o agente causal da mononucleose infecciosa em adultos e adolescentes, ele infecta

as células epiteliais da orofaringe, replicando-se e subseqüentemente disseminando através dos linfócitos da mucosa. O EBV está diretamente implicado na oncogênese de algumas neoplasias malignas humanas, como linfoma de Burkitt, linfomas de células B em imunossuprimidos, alguns tipos de doença de Hodgkin e alguns tipos de carcinomas, principalmente os carcinomas indiferenciados de rinofaringe, bem como de outras localizações (glândula salivar, mama, pulmão, vias biliares, colo uterino e estômago) (MILLS et al. 1985; SAW et al. 1986; BUTLER et al. 1989; SHIBATA et al. 1991; LABRECQUE et al. 1995; HSU et al. 1996). A infecção pelo EBV é latente, isto é, o vírus não se replica e as células infectadas não são destruídas. Esta latência traz junto à propriedade de imortalização da célula e a capacidade de se propagar indefinidamente *in vitro*. Em contraste com outros vírus, não há evidência convincente que os genes supressores de tumor são alvo da inativação do EBV. A infecção pelo EBV aparentemente ativa vários outros genes, estimulando a atividade proliferativa, impedindo a apoptose, favorecendo a disseminação tumoral (ISHII et al. 2001; ZUR HAUSEN et al. 2001). O EBV codifica um RNA nuclear (EBER) que tem se mostrado um importante alvo na detecção do EBV em materiais fixados em formol e emblocados em parafina, devido à grande quantidade do número de cópias de EBER nas células infectadas pelo EBV nestes materiais.

Cerca de 2 a 18% dos adenocarcinomas gástricos (ADG) são positivos para EBV quando pesquisados por hibridização *in situ* (ROWLANDS et al. 1993; TOKUNAGA et al. 1993; IMAI et al. 1994; YUEN et al. 1994), embora frequência de 24% já tenha sido relatada (HSICH et al. 1998). No Brasil, em

estudo multicêntrico, a presença de EBV foi demonstrada em 4 de 80 pacientes estudados (HAYASHI et al. 1998). A participação do EBV na patogênese do ADG não está completamente esclarecida. Aparentemente, a expressão do genoma do EBV em carcinomas gástricos está mais relacionada ao tipo linfopitelioma-like (WEISS et al. 1991; WANG et al. 1999; KIJIMA et al. 2001; CHIARAVALLI et al. 2001) e não se demonstrou correlação com os demais tipos histológicos ou de diferenciação celular (TOKUNAGA et al. 1993; IMAI et al. 1994). Também é encontrado em mucosas de gastrite atrófica, especialmente ligadas a metaplasia intestinal (LI et al. 1992; ARIKAWA et al. 1997; YANAI et al. 1999). A frequência de ADG EBV+ é aparentemente maior quando comparados os ADG oriundos de coto gástrico com aqueles de estômagos não-operados (BASS et al. 1998; LUQMANI et al. 2001). Uma das características destes carcinomas EBV(+) é o intenso infiltrado inflamatório constituído principalmente por linfócitos citotóxicos CD8+ (SAIKI et al. 1996; KUZUSHIMA et al. 1999; CHO et al. 2001). Instabilidade de microsátélites, aspecto importante na patogênese dos tumores gástricos, não mostrou diferença quando comparados ADG EBV+ e os ADG EBV- (SCHNEIDER et al. 2000). Aparentemente, a presença de EBV é um bom biomarcador para metástases em linfonodos nos ADG (TOKUNAGA e LAND, 1998).

Embora a maioria dos carcinomas gástricos (90%) sejam esporádicos e somente poucos casos familiares tenham sido documentados, fatores genéticos ainda representam um importante papel na oncogênese destes tumores. Os carcinomas gástricos tem sido divididos histologicamente em 2

subtipos principais: tipos difuso e intestinal, segundo a classificação de Laurén (LAUREN 1965). Algumas alterações genéticas são comuns nos diferentes tipos, bem como mutações do gene p53 que vão atuar na regulação do ciclo celular e na regulação do reparo do DNA (MING 1998).

Dentre os fatores prognósticos bem estabelecidos na carcinogênese gástrica, dois deles são de grande importância na prática clínica: a profundidade de infiltração do tumor na parede gástrica e a presença de metástases em linfonodos regionais. Estes fatores ainda não foram extensamente estudados em relação à presença de infecção pelo EBV.

Apoptose é um fenômeno biológico de grande importância na regulação de inúmeras situações fisiológicas ou patológicas, como no desenvolvimento do câncer.

O sistema FAS- ligante/FAS induz apoptose em vários tecidos, e o sinal de morte celular pelo FAS tem um papel importante no sistema imune. Recentes estudos tem demonstrado que tumores gástricos EBV+ mostram uma significativa redução no número de células tumorais em apoptose. Esses achados indicam que o sistema Fas/ Fas-L exerce um importante papel na evasão das células tumorais do sistema imune nos casos EBV+ (KUME et al. 1999). Também já foi demonstrado que os ADG EBV+ expressam mais frequentemente outras moléculas associadas à apoptose como as proteínas Bcl-2, Bcl-x, Bax, Bak e caspases. Alguns estudos tem comparado a presença do EBV em carcinomas gástricos e sua relação com as proteínas associadas a apoptose, com resultados bastante distintos. Em

estudos *in vitro*, ADG que expressam LMP-1 têm maior índice de apoptose do que aqueles nos quais a proteína não é expressa ou inibida (SHEU et al. 1998). OHFUJI et al. (1996), por outro lado, encontraram menor índice de apoptose e de proliferação celular nos ADG EBV+. Outros grupos não encontraram relação entre índices de apoptose e EBV nos ADG (GULLEY et al. 1996; ISHII et al. 2001). Portanto a associação entre as moléculas associadas a apoptose e carcinomas gástricos EBV+ ainda não está bem estabelecida.

O papel da proteína p53 na carcinogênese humana tem sido amplamente estudado. Aparentemente, a mutação do gene p53 é o evento genético mais comum nas neoplasias malignas. ADG EBV+ mostraram expressão aumentada da proteína p53 em praticamente todos os casos estudados por LEUNG et al. (1998), enquanto que os ADG EBV- apresentaram dois padrões de apresentação, ou fortemente positivos em 100% das células ou negativo. Este resultado é contrastante com aquele obtido por outros grupos, que encontraram baixo índice de positividade para p53 em ADG EBV+ (OJIMA et al. 1997; MORITANI et al. 2002). Ainda um terceiro padrão de resultado foi obtido por OHFUJI et al. (1996) que não observaram diferenças de expressão da proteína p53 quando compararam ADG EBV+ e EBV-.

O óxido nítrico (do inglês nitric oxide-NO) é um importante agente bioativo e uma molécula sinalizante mediadora de diversas funções como vasodilatação, neurotransmissão e metabolismo do ferro (MONCADA et al.

1991; BREDT e SNYDER, 1992). O NO é produzido a partir de uma reação enzimática, na qual o substrato L-arginina é convertido em L-citrulina e NO. Sabe-se que a reação de conversão é catalizada por uma família de enzimas, conhecidas como sintases do óxido nítrico (NOS, do inglês *nitric oxide synthases*).

As NOS apresentam três isoformas. Podemos classificá-las, respeitando-se a ordem histórica de purificação das enzimas, ou baseando-se no tipo celular ou órgão no qual a enzima foi originalmente descrita, ou ainda baseados na sua expressão constante ou somente após indução, nos diversos tipos celulares, a saber:

- NOS tipo 1, neuronal ou cerebral (nNOS), ou nNOS constitutiva;
- NOS tipo 2, macrófago induzida (iNOS), ou iNOS induzida;
- NOS tipo 3, endotelial (eNOS), ou eNOS constitutiva.

A princípio as isoformas foram divididas em 2 grupos: constitutivas ou constitucionais (cNOS) e as induzidas (iNOS). As cNOS são aquelas que alguns grupos celulares, como as células endoteliais e os neurônios, expressam em condições normais, enquanto que a iNOS é aquela que é produzida após a estimulação celular. As NOS 1 e NOS 3 são constitutivas.

A atividade da cNOS é dependente de cálcio e calmodulina. Os agonistas ativam as cNOS, promovendo um rápido aumento na concentração de cálcio intracelular, que dispara o sítio de ligação da

calmodulina da NOS, estimulando a atividade catalítica, resultando na produção de NO em poucos segundos ou minutos (SCHMIDT et al. 1992).

A NOS 2 não é expressa normalmente, mas apenas após a sua ativação por citocinas inflamatórias e lipopolissacarídeos bacterianos. Uma das características da NOS 2 é ser cálcio e calmodulina independente, pois apresenta uma firme ligação covalente com a calmodulina, que impede a ligação do cálcio em condições fisiológicas (WOLF 1997). A regulação da NOS 2 permite que altos níveis de NO (nmoles) possam ser produzidos e mantidos, ao contrário do que ocorre nas NOS 1 e NOS 3, que produzem baixos níveis de NO (pmoles) (MONCADA et al. 1991; LOWENSTEIN et al. 1994). Tanto a quantidade de NO produzido, quanto a duração desta produção, são fundamentais para definir se o efeito produzido pela NOS será benéfico ou prejudicial à saúde. Em geral, as ações tóxicas do NO estão relacionadas com o produto da NOS 2 e não com os produtos da NOS 1 e 3 (MONCADA et al. 1991).

Os efeitos do NO são complexos em relação a biologia tumoral. Sua ação pode ser multidimensional e ambígua. As ações anti-tumorais ocorrem durante a atividade das células natural *killer* e dos macrófagos, que destroem as células neoplásicas, no início do seu crescimento, através de mecanismos mediados pelo óxido nítrico (LALA e ORUCEVIC, 1998). Outra ação anti-tumoral exercida pelo NO, é exercida através da indução da apoptose.

Por outro lado, a ação pró tumoral é identificada quando o NO impede a resposta anti-tumoral do hospedeiro (ao interagir e inibir enzimas-chave das células do sistema imune), ao promover a angiogênese, com neovascularização do tumor, permitindo seu crescimento, invasão e formação de metástases (LALA e ORUCEVIC, 1998). Também, a exposição ao NO por longos períodos de tempo, como acontece em alguns processos inflamatórios crônicos, resulta em alterações no microambiente celular, favorecendo a ocorrência de mutações. Como se sabe, as doenças inflamatórias crônicas e infecções são fatores de risco conhecidos para o câncer (OHSHIMA e BARTSCH, 1994).

Estudos recentes tem demonstrado a expressão e atividade das 3 isoformas das sintases do óxido nítrico (NOS) em tumores humanos. A atuação de NO e a presença de NOS têm sido demonstrada em tumores humanos de vários sítios, incluindo o estômago (KOH et al. 1999). A participação da NOS2 nas neoplasias gástricas como potencial agente na progressão da neoplasia tem sido investigada (AMBS et al. 1998). Esta atividade está aumentada em tumores avançados e nas metástases hepáticas ou pulmonares (GOTO et al. 1999). Posteriormente, o mesmo grupo demonstrou correlação positiva entre a presença de NOS2 e mutação no gene TP53 em neoplasias do cólon (AMBS et al. 1999; RAJNAKOVA et al. 2001). KOJIMA et al. (1999), também observaram expressão aumentada de NOS2 e nitrotirosina em adenocarcinomas do intestino grosso. Sobrenadantes de culturas destes carcinomas foram capazes de reduzir a proliferação de linfócitos estimulados, sugerindo que o NO esteja

relacionado com a imunossupressão, facilitando o crescimento tumoral. Por outro lado, MOOCHHALA et al. (1996), encontraram significativa redução da expressão de NOS nas células cancerosas, quando comparadas com a mucosa colônica normal.

Em estudo de peças de adenocarcinomas gástricos, RAJNAKOVA et al. (1997), mostraram que o tecido tumoral expressa menores quantidades de NOS do que a mucosa normal, e que carcinomas avançados T4 expressam menor quantidade de NOS1 e NOS3 do que aqueles T2. Por outro lado, no mesmo estudo, tumores avançados tinham maior expressão de NOS2 do que aqueles mais precoces. A expressão imuno-histoquímica de NOS2 e nitrotirosina foi significativamente maior em biópsias com a presença de *H. pylori* do que nas biópsias *H. pylori*-negativas e também significativamente maior na mucosa de pacientes que desenvolveram adenocarcinomas gástricos até 2 anos depois da biópsia (GOTO et al. 1999). Resultado semelhante em mucosas gástricas foi obtido por HAHM et al. (1998), onde mucosas de pacientes com infecção pelo *H. pylori* apresentaram maiores quantidades de NOS2 e de índice apoptótico. Estes resultados abrem uma interessante associação entre a nitrificação produzida pela infecção pelo *H. pylori* via NOS, dano oxidativo do DNA, apoptose e a carcinogênese gástrica.

Portanto o estudo da carcinogênese gástrica continua sendo de grande interesse para muitos autores e associações distintas entre fatores anti e pró tumorais demonstrado na literatura, faz com que haja necessidade

de realização de mais estudos na tentativa de estabelecer verdadeiras correlações entre os diversos fatores associados à carcinogênese e prognóstico dos tumores gástricos. A participação da infecção pelo EBV já foi demonstrada em tumores gástricos da população oriental, porém no nosso meio esta correlação não está bem estabelecida, nem tão pouco as repercussões que esta associação poderá trazer em relação ao diagnóstico inicial e tratamento destes tumores. Este estudo pretende determinar fatores associados à carcinogênese gástrica em nosso meio, bem como estabelecer possíveis associações entre estes fatores que demonstrem algum tipo de relevância no tratamento e prognóstico destes tumores.

OBJETIVO

2 OBJETIVO

Os objetivos do presente trabalho são:

1. estabelecer a frequência de infecção pelo EBV em uma série de carcinomas do estômago operados no Hospital do Câncer A C Camargo no período de 1996 a 1998 ;
2. comparar as características demográficas dos carcinomas gástricos EBV+ com os carcinomas gástricos EBV-;
3. comparar as características histopatológicas dos tumores EBV+ com aqueles EBV- quanto ao tipo histológico, localização anatômica da lesão, profundidade de infiltração da parede gástrica, intensidade do infiltrado linfocitário peri e intratumoral, presença de metástases em linfonodos e infecção pelo *H. pylori*);
4. estudar a expressão de proteínas associadas à apoptose (Bcl-2, Bcl-x, Bax e Bak) nos ADG e comparar o padrão de expressão nos carcinomas EBV+ com aqueles EBV-
5. estudar a expressão das sintases do óxido nítrico (NOS 1, NOS 2 e NOS 3) nos ADG e comparar o padrão de expressão das NOS nos casos EBV+ com aqueles EBV-;
6. estudar a expressão da proteína p53 nos ADG e comparar se há diferenças de expressão nos carcinomas EBV+ em relação aos ADG EBV-.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Foram selecionados 118 casos de carcinomas gástricos operados no Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer A C Camargo no período de 1996 a 1998 que continham material emblocados em parafina, suficientes para o estudo. Estes casos foram obtidos através dos arquivos da anatomia patológica. Foram resgatadas todas as respectivas lâminas e blocos de parafina. Blocos representativos do tumor e de mucosa histologicamente normal foram separados e novos cortes foram realizados, inclusive da mucosa de transição normal-tumoral. O primeiro corte obtido de cada bloco foi corado pela técnica tradicional de hematoxilina-eosina (HE). A revisão da lâmina permitiu o diagnóstico e tipo histológico da neoplasia, utilizando-se a classificação de Laurén, separando os tumores nos tipos intestinal e difuso. A pesquisa de infecção pelo *H. pylori* foi feita em cortes corados pelo HE e pelo Giemsa em mucosa não tumoral distante da neoplasia.

Os prontuários médicos dos casos selecionados para o estudo foram revistos estabelecendo o estadiamento anatomopatológico, bem como os aspectos macroscópicos correspondentes, como localização,

tamanho e tipo da lesão; e dados demográficos como idade, gênero e etnia. Os carcinomas foram classificados como superficialmente invasivos (quando se observa a infiltração da mucosa e submucosa) e profundamente invasivos (infiltração da camada muscular, subserosa, e além da serosa). O infiltrado inflamatório linfocitário peritumoral foi estabelecido de acordo com a porcentagem dos linfócitos no total das células na área de maior infiltração neoplásica sendo graduado como ausente (0%), leve (até 10% de linfócitos), moderado (10 a 30% de linfócitos) ou acentuado (>30% de linfócitos). Para as análises estatísticas, foram considerados apenas dois grupos. O primeiro grupo foi constituído pela fusão dos casos com infiltrado inflamatório ausente e leve e o segundo grupo pelos casos com moderado ou acentuado infiltrado inflamatório.

3.1.1 Imuno-histoquímica

As reações imuno-histoquímicas foram realizadas nos cortes histológicos representativos da neoplasia e da mucosa adjacente; pela técnica de complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (StreptABC, DAKO®). Os passos técnicos realizados foram os já tradicionalmente descritos na literatura e podem ser visto em livros texto (SANTOS et al. 1999).

Resumidamente, as lâminas são previamente revestidas por solução de 3-aminopropyltriethoxy-silano (APTS – Sigma® A3648) diluído

a 4% em acetona. Os cortes obtidos são de 3 μ m de espessura após microtomia mecânica. Os cortes são desparafinizados e preparados por passagens sucessivas por xilol e etanol e submetidos à recuperação antigênica pelo calor com irradiação por panela de pressão (Eterna, Nigro) utilizando-se tampão citrato 10mM pH 6.0 por 15 minutos, deixando mais 10 minutos à temperatura ambiente. A seguir é realizado o bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 3% (água oxigenada 10 vol) com 4 trocas de 5 minutos cada, seguida de lavagens com solução salina tamponada com fosfatos (PBS-phosphate buffered saline) 10mM pH 7.4 por 5 minutos. A seguir as lâminas são incubadas com os anticorpos primários pesquisados diluídos em títulos pré-estabelecidos (tabela 1) em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (SIGMA, A9647, USA) e azida sódica (NaN₃) 0,1%, por 18 horas a 4°C em câmara úmida. Após a incubação as lâminas são lavadas em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada. A seguir são incubadas com o Link (DAKO A/S, K0690, Denmark) por 30 minutos a 37°C, seguidas por incubação com o Streptavidina HRP (DAKO A/S, K0690, Denmark) por 30 minutos a 37°C. Sofrem banhos seguidos com o tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada. As reações são reveladas com solução de Diaminobenzidina (DAB, Sigma®) a 60mg% e contracoradas com hematoxilina de Harris (Merck®).

As reações sempre são acompanhadas de controle positivo, em tecido sabidamente positivo para o anticorpo testado e dois controles

negativos. O primeiro deles é realizado pelo não uso do anticorpo primário e o segundo através da retirada do anticorpo secundário durante os passos da reação.

Nas reações que não necessitem de recuperação antigênica, a etapa da recuperação antigênica pelo calor, não é realizada, seguindo imediatamente à desparafinização o bloqueio da peroxidase endógena.

Os anticorpos que foram utilizados estão divididos em 4 painéis específicos. A Tabela 1 abaixo apresenta a lista completa dos anticorpos, respectivos clones e origem de fabricação.

O primeiro painel é identificado como aquele de proteínas ligadas à proliferação celular (pPPC), que inclui os antígenos da proteína p53. O segundo painel é o que identifica as proteínas ligadas a apoptose (pPLA) que inclui os antígenos Bcl-2, Bcl-x, Bax, Bak. O terceiro painel é aquele que pesquisa a expressão das isoformas das sintases do óxido nítrico (pNOS) que abrange as isoformas neuronal (NOS1), induzida (NOS2) e endotelial (NOS3). O quarto painel é aquele que identifica a infecção pelo vírus de EBV (pEBV) e deste faz parte a proteína LMP e a sonda EBER para hibridação *in situ*.

A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico comum e avaliada de acordo com um escore calculado pela somatória da intensidade da coloração com o número de células positivas (escore = intensidade + porcentagem das células coradas na área de “hot spot”). A

intensidade da coloração foi dividida em 4 graus com a seguinte graduação:

Grau	Descrição
0	Sem reação detectável.
1+	Discreta intensidade de marcação
2+	Moderada intensidade de marcação
3+	Forte intensidade de marcação

A área de marcação foi dada pela porcentagem das células positivas. Foram divididos em 5 graus de acordo com o número de células positivas a saber:

Grau	Descrição
0	Sem reação detectável.
1+	<25% das células tumorais positivas
2+	25- 50% das células tumorais positivas
3+	50-75% da células tumorais positivas
4+	>75% das células tumorais positivas

O escore final foi obtido através da somatória das duas graduações, sendo o máximo de 7 pontos e o mínimo de 0. Para as

análises estatísticas, os tumores foram classificados como positivos (escore 4-7) ou negativos (escore 0-3).

O critério de positividade das células foi estabelecido de acordo com o antígeno pesquisado. A expressão da proteína p53 foi considerado positivo apenas a positividade nuclear. Para os marcadores associados à apoptose e síntese do óxido nítrico foram consideradas positivas as células com padrão de marcação citoplasmática difusa ou em padrão granular. A marcação positiva para LMP1 também foi considerada o padrão citoplasmático de membrana ou granular em dot.

Tabela 1 - Anticorpos utilizados, clones, origem e diluição.

ANTÍGENO	CLONES	ORIGEM	DILUIÇÃO
Proteína p53	DO7	DAKO	1:100
NOS 1	nNOS	TRANSDUCTION	1:200
NOS 2	iNOS	TRANSDUCTION	1:40
NOS 3	eNOS	TRANSDUCTION	1:100
Proteína Bcl-2	124	DAKO	1:50
Proteína Bax	Bax	DAKO	1:50
Proteína Bak	Bak	DAKO	1:400
Proteína Bcl-x	Bcl-x	DAKO	1:50
Proteína LMP-1	CS1-4	DAKO	1:300

3.1.2 Hibridação *In Situ*

A técnica de hibridação *in situ* foi realizada essencialmente na detecção da presença de EBV. Para a demonstração da presença do EBV foi utilizada a sonda de oligonucleotídeo EBER (*Epstein-Barr virus* encoded RNA, NCL-EBV, Novocastra®), marcado com fluoresceína, sobre os cortes histológicos emblocados em parafina. A revelação da reação foi feita com o kit de detecção para HIS para sondas fluoresceinadas (NCL-ISH-D, Novocastra, UK). Por se tratar de kits, o procedimento foi seguido rigorosamente como indica o fabricante. Resumidamente:

1. desparafinação dos cortes em xilol, 2 x 3 minutos;
 2. hidratação em etanol 99%, 2 x 3 minutos;
 3. hidratação em etanol 95%, 2 x 3 minutos;
 4. imersão em água por 3 minutos;
 5. incubação dos cortes com 100 µl de proteinase k em tampão Tris-HCl 0,05M pH 7,6, por 10 a 15 minutos a 37° C;
 6. imersão em água 2 x 3 minutos;
 7. desidratação em etanol 95% por 3 minutos;
 8. desidratação em etanol 99% por 3 minutos;
 9. secagem do corte ao ar;
 10. aplicação de 20 µl de sonda, cobrindo-se os cortes com lamínula, deixando-se por toda a noite a 37° C (cerca de 16 horas);
-

10. aplicação de 20 µl de sonda, cobrindo-se os cortes com lamínula, deixando-se por toda a noite a 37° C (cerca de 16 horas);
 11. retirada das lamínulas delicadamente com tampão;
 12. lavagem em tampão 0,05 M Tris-HCl- 0,3 M NaCl, pH 7,6 (TBS), com 0,1% de Triton X-100, 3 x 3 minutos;
 13. aplicação de 100 µl de tampão TBS, com soroalbumina bovina (BSA) a 3%, 0,1% de Triton X-100 e 20% de soro normal de coelho, por 10 minutos;
 14. retirada do excesso de soro normal e, sem lavagem, aplicação de anticorpo anti-fluoresceína diluído a 1:150 em tampão TBS com BSA 3% e Triton X-100 a 0,1%; incubação por 30 minutos;
 15. lavagem dos cortes em tampão TBS por 2 x 3 minutos;
 16. lavagem dos cortes em tampão do substrato da fosfatase alcalina pH 9,0 por 5 minutos;
 17. incubação com substrato da fosfatase alcalina (BCIP-NBT, 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate e nitroblue tetrazolium), preparado a 1:50 em tampão Tris-HCl 100 mM, mais MgCl₂ 50mM, NaCl 100mM, pH 9,0, mais 1 µl de Levamisole (inibidor da fosfatase alcalina) para cada ml de substrato; incubar por toda a noite (cerca de 16 horas), à temperatura ambiente;
 18. lavagem em água corrente por 5 minutos;
-

19. contra-coloração com hematoxilina de Meyer por um minuto;
20. passagem em água amoniacal por segundos;
21. montagem no meio aquoso.

A visualização da reação de HIS é expressa através da coloração enegrecida do núcleo das células tumorais. Como nas reações imuno-histoquímicas, nas reações de hibridação *in situ*, foram corados simultaneamente uma lâmina com controle positivo externo e outra com controle negativo (a mesma lâmina do controle positivo, com aplicação de tampão TBS no lugar dos anticorpos primários e da sonda EBER), para validar a reação.

3.1.3 Análise Estatística

Para a análise estatística dos dados utilizou-se teste não paramétrico, levando-se em consideração a natureza das variáveis de interesse e a variabilidade das medidas estudadas. As análises foram realizadas utilizando-se o programa de computador SPSS 10.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Para a análise da associação entre a presença de EBV e as demais variáveis de estudo foi utilizado o teste Qui-quadrado ou teste exato de Fisher quando necessário. As diferenças com os valores de *P* menores que 0.05 foram considerados estatisticamente significativos, assinalando-se com asteriscos os valores significantes.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

Transcritos de EBER1 detectados por hibridação *in situ* foram encontrados em 9 (7%) dos 118 casos estudados. Em todos os casos, a positividade foi detectada somente nas células tumorais e não no epitélio normal ou nos linfócitos de permeio (Figuras 1A e 1B).

Os dados demográficos dos 118 casos de carcinomas gástricos estudados podem ser vistos na Tabela 2. A Tabela 3 mostra estes mesmos dados separando-se os casos em EBV+ e EBV-. A média de idade dos pacientes dos casos EBV+, é muito semelhante à dos casos EBV-, não exibindo diferença significativa entre os dois grupos: 60 e 61 anos, respectivamente. Em ambos os grupos, foi observado o predomínio do sexo masculino, em uma proporção de aproximadamente 3:1, bem como um predomínio da raça branca, sendo estes achados semelhantes em relação ao grupo total de 118 casos onde 68% dos casos eram do sexo masculino e 83% deles eram da raça branca. Os tumores EBV+ mostraram localização preferencial na região do cárdia; estando 5 (56%) dos 9 casos EBER1 positivos localizados no cárdia, enquanto 21 (19%) dos 109 casos EBER1 negativos estavam nesta localização. 50% dos 118 casos estudados eram de localização antral. Esta diferença entre os casos EBV+ e EBV- quanto à localização do tumor, mostrou-se estatisticamente significativa ($P=0.025^*$). Todos os 9 casos EBV+ eram

constituídos por carcinomas que infiltravam a camada muscular própria, a subserosa, a serosa ou além da serosa. Porém este padrão de infiltração foi observado também na maioria dos casos EBV-, portanto não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos em relação ao nível de infiltração dos tumores. Portanto, da amostra total dos 118 casos estudados, 71% deles eram constituídos por tumores avançados, com infiltração profunda da parede gástrica.

Em relação ao tipo histológico, 8 (89%) dos 9 casos EBV+ eram do tipo difuso (Figura 2A), enquanto que no grupo dos carcinomas EBV-, a maioria dos casos eram do tipo intestinal (Figura 2B), sendo somente 46 (42%) dos casos do tipo difuso. A análise estatística destes resultados, mostrou uma forte associação entre a variável tipo histológico e positividade para EBV ($P=0.008^*$). Outro parâmetro histológico que mostrou correlação com a presença de infecção pelo EBV, foi a presença de infiltrado inflamatório linfocitário peri e intratumoral (Figura 3A). Os carcinomas EBV+ exibiam estroma constituído por moderada à acentuada quantidade de linfócitos, enquanto que nos casos EBV-, este estroma exibia discreta/leve quantidade de infiltrado linfocitário peri ou intratumoral ou mesmo ausência de linfócitos ($P= 0.006^*$).

Tabela 2 - Número e porcentagem de pacientes com carcinomas gástricos, segundo dados demográficos e clínicos.

VARIÁVEL	CATEGORIA	NÚMERO DE CASOS
Sexo	Masculino	80 (68%)
	Feminino	38 (32%)
Raça	Branco	98 (83%)
	Não-branco	20 (17%)
Tipo histológico	Intestinal	64 (54%)
	Difuso	54 (46%)
Infecção pelo <i>H.pylori</i>	Presente	38 (32%)
	Ausente	80 (68%)
Metástases em linfonodos	Presente	70 (60%)
	Ausente	48 (40%)
Total		118 (100%)

Tabela 3 - Características clínicas e histopatológicas dos carcinomas gástricos EBV+ e EBV-

	EBV Positivo (n = 9)	EBV Negativo (n = 109)	Valor de P
Gênero			0.49
Masculino	7	73	
Feminino	2	36	
Idade média (anos)	60,5 [35-78]	61,2 [25-84]	
Raça			0.61
Branca	8	90	
Não branca	1	19	
Localização do tumor			0.025*
Cárdia	5	21	
Corpo/ Antro	4	88	
Nível de infiltração			0.18
Superficial		18	
Profundamente invasivo	9	91	
Metástases linfonodais			0.46
Ausente	3	45	
Presente	6	64	
Tipo histológico			0.008*
Difuso	8	46	
Intestinal	1	63	
<i>H. pylori</i>			0.12
Ausente	8	72	
Presente	1	37	
Infiltrado linfóide			0.006*
Mínimo/leve	2	75	
Moderado/intenso	7	34	

P: nível descritivo do teste de associação pelo qui- quadrado

n = número de casos

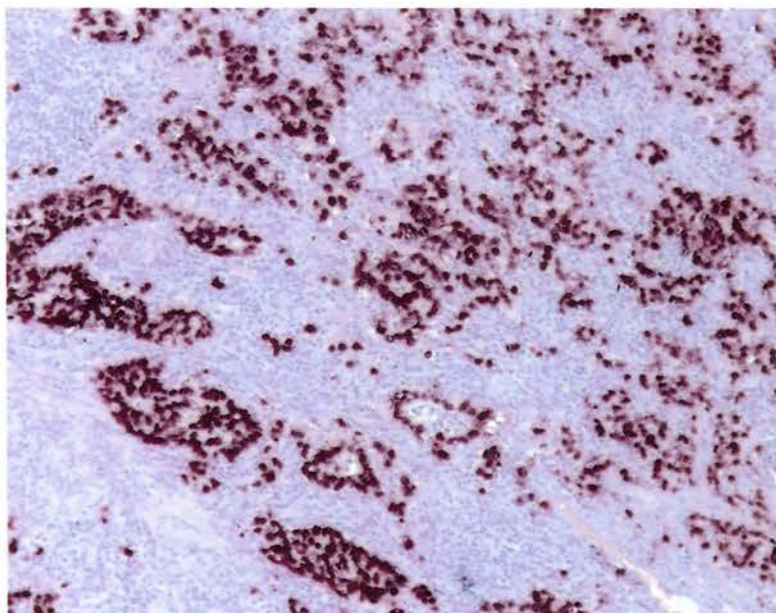


Figura 1A: HIS demonstrando marcação por EBER-1, com positividade exclusiva nas células neoplásicas (aumento original 200X)

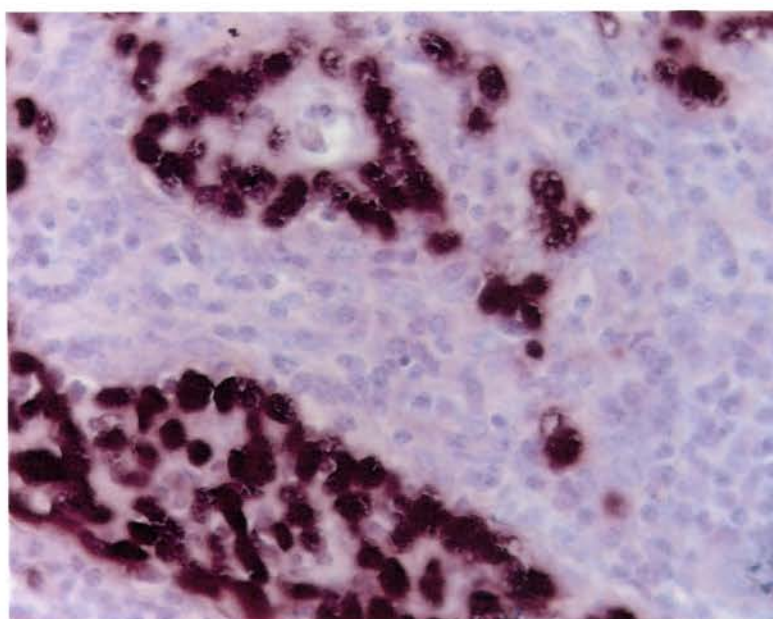


Figura 1B: HIS demonstrando intensa marcação nuclear das células neoplásicas (aumento original 400x).

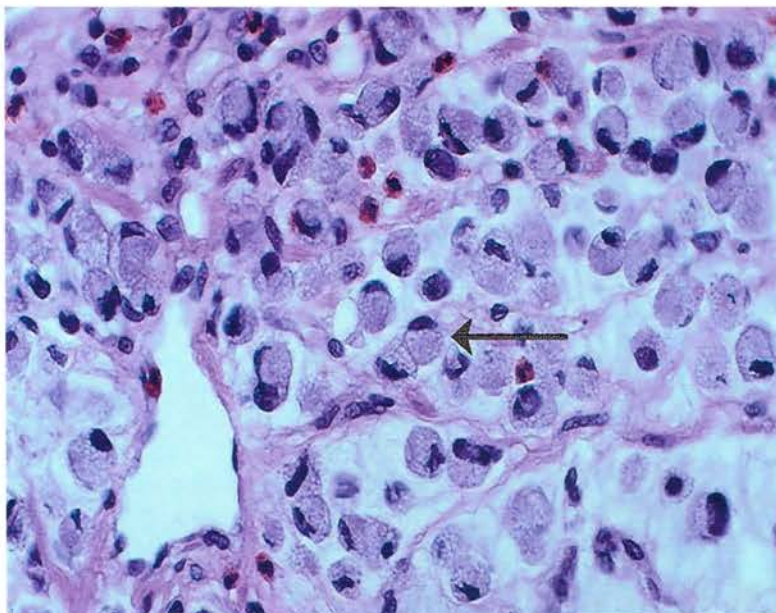


Figura 2A: carcinoma gástrico do tipo difuso exibindo células em anel de sinete (H&E, aumento original 200x)

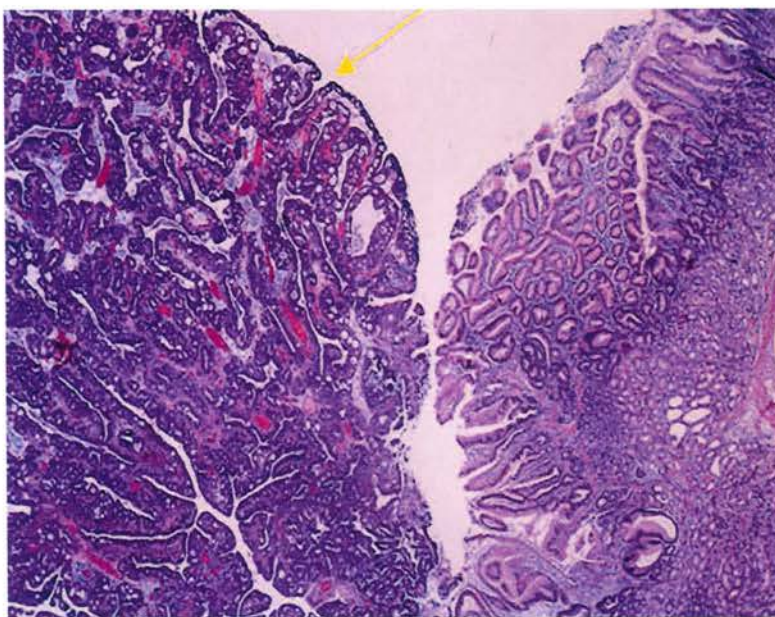


Figura 2B: carcinoma gástrico do tipo intestinal com formação de estruturas glandulares (H&E, aumento original 100x).

Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os casos EBV+ e EBV- em relação à presença de metástases em linfonodos. Metástases em linfonodos estavam presentes em 6 (67%) casos do grupo dos EBV+ e em 64 (59%) dos casos do grupo dos EBV-, mostrando portanto, uma semelhança entre os dois grupos ($P= 0.46$). Porém esta variável não pode ser considerada um indicador de diferenças na história natural da neoplasia, assim como em relação ao nível de infiltração da parede gástrica, uma vez que a maioria dos casos estudados eram constituídos por tumores avançados.

Infecção pelo *H. pylori* no total dos 118 casos estudados, foi baixa, sendo detectada em 38 (32%) casos. Frequência ainda menor foi detectada nos casos EBV+, estando presente em somente 1 (12%) dentre os 9 casos EBV+. Estes resultados apesar de demonstrarem uma ligeira diferença percentual de casos associados à infecção pelo *H. pylori* nos dois grupos, estes achados não mostraram correlação estatística ou diferenças significantes entre positividade para EBV e infecção por *H. pylori* ($P= 0.12$).

Os resultados das reações imuno-histoquímicas dos diversos antígenos pesquisados nos subgrupos EBV+ e EBV-, podem ser vistos na Tabela 4. A presença da proteína de latência LMP1 foi detectada em 5 casos que mostraram positividade concomitante para EBER1 e em 8 casos EBER1 negativos (Tabela 5). Nestes tumores, LMP1 foi detectada

em células tumorais isoladas e com intensidade mais fraca quando comparada ao controle positivo (Figura 3B).

Imunopositividade para p53 foi detectada em 57 (53%) dos 109 casos de carcinomas gástricos EBV- estudados. Dentre os casos EBV+, a presença de marcação para p53, mostrou-se muito semelhante ao grupo já descrito, sendo detectada em 5 (56%) dos 9 casos. Em ambos os grupos e no grupo total, observamos um aumento da expressão de p53, porém não observamos diferenças de expressão desta proteína nos grupos EBV+ e EBV- (Figura 4A) .

Outros genes que regulam morte celular são os membros da família do bcl-2. No presente estudo, fizemos a pesquisa imuno-histoquímica de 4 membros desta família: Bcl-2, Bcl-x, Bax e Bak. A marcação imuno-histoquímica positiva foi determinada somente no citoplasma, por vezes em padrão granular (Figuras 4B, 5A, 5B, 6A). Marcação imuno-histoquímica para Bcl-2 foi detectada em 16 (15%) dos 109 casos EBV-. Dentre os casos positivos para EBV, o Bcl-2 estava expresso somente em 2 (22%) casos. Estes achados de maneira geral, mostraram uma baixa expressão desta proteína anti-apoptótica em ambos os grupos EBV+ e EBV-, não tendo diferenças estatísticas significantes, sugerindo que a expressão de Bcl-2 é independente da presença do EBV

A positividade para Bcl-x foi detectada em 111 (94%) dos 118 casos estudados, sendo que todos os casos EBV positivos mostraram marcação imuno-histoquímica para este marcador. Este resultado sugere

que esta proteína possa exercer um importante papel na biologia dos tumores gástricos apesar de não haver diferenças entre os casos EBV+ e EBV- ($P=0.28$). O resultado da pesquisa imuno-histoquímica para Bax foi bastante semelhante ao do Bcl-x. 102 (86%) casos de um total de 118 foram positivos para Bax, sendo 8 (89%) deles pertencentes ao grupo dos carcinomas EBV+. Este achado também não mostrou diferenças entre os dois grupos ($P= 0.64$) apesar da evidente participação do Bax, assim como do Bcl-x, na carcinogênese gástrica demonstrada por estes resultados. A expressão da proteína pró-apoptótica Bak, homólogo do Bax, mostrou um resultado bastante semelhante ao Bax no total dos 118 casos 81/118 (68%) foram positivos para Bak, sendo que no grupo dos 9 carcinomas EBV+ 4 (45%) casos foram Bak+ e 5 (55%) foram BAK-. Esta ligeira diferença não demonstrou significado estatisticamente significativo ($P= 0,10$).

As sintases do óxido nítrico (NOS) são enzimas citoplasmáticas detectadas em células tumorais, células endoteliais, células musculares e células inflamatórias. Para a análise final da expressão destas enzimas, nós consideramos somente a expressão nas células tumorais (Figuras 6B, 7A, 7B). Os resultados da expressão das três isoformas de NOS nos grupos EBV+ e EBV- podem ser vistos na Tabela 4.

Tabela 4 - Expressão imuno-histoquímica das proteínas associadas a apoptose, p53 e sintases do óxido nítrico nos carcinomas gástricos EBV+ e EBV-

	EBV Positivo (n = 9)	EBV Negativo (n= 109)	Valor de <i>P</i>
<i>P53</i>			0.56
Positivo	5 (56%)	57 (53%)	
Negativo	4 (44%)	52 (47%)	
<i>Bcl-2</i>			0.42
Positivo	2 (22%)	16 (15%)	
Negativo	7 (78%)	93 (85%)	
<i>Bcl-x</i>			0.28
Positivo	9 (100%)	102 (93%)	
Negativo		7 (7%)	
<i>Bak</i>			0.10*
Positivo	4 (45%)	77 (70%)	
Negativo	5 (55%)	32 (30%)	
<i>Bax</i>			0.64
Positivo	8 (89%)	94 (86%)	
Negativo	1(11%)	15 (14%)	
<i>NOS1(nNOS)</i>			0.55
Positivo	6 (66%)	76 (70%)	
Negativo	3 (34%)	33 (30%)	
<i>NOS2 (iNOS)</i>			0.19
Positivo	1 (11%)	34 (31%)	
Negativo	8 (89%)	75 (69%)	
<i>NOS3 (eNOS))</i>			0.27
Positivo	2 (22%)	42 (38%)	
Negativo	7 (78%)	67 (62%)	

P: nível descritivo do teste de associação pelo qui- quadrado

n = número de casos

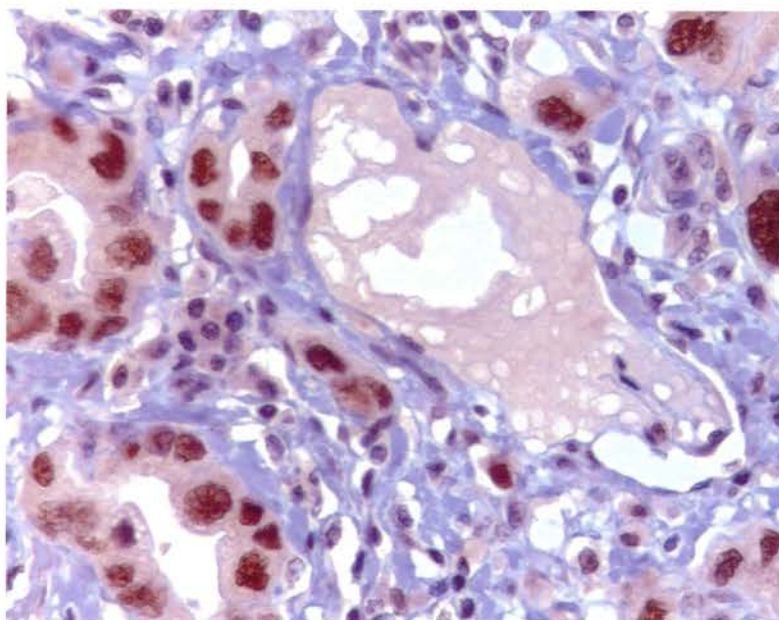


Figura 4A: IHQ demonstrando marcação nuclear anti p53 nas células neoplásicas (aumento original 200x).

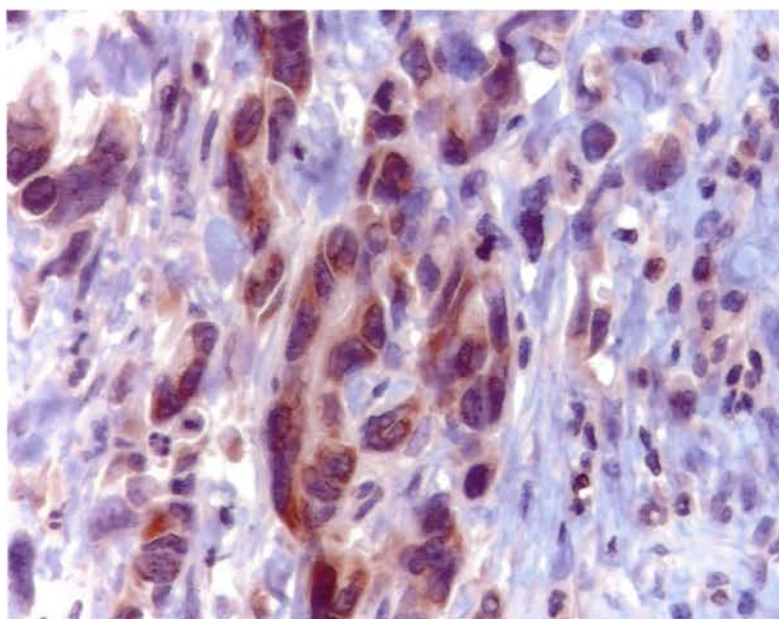


Figura 4B: IHQ demonstrando marcação nuclear anti Bcl-2 nas células neoplásicas (aumento original 200x).

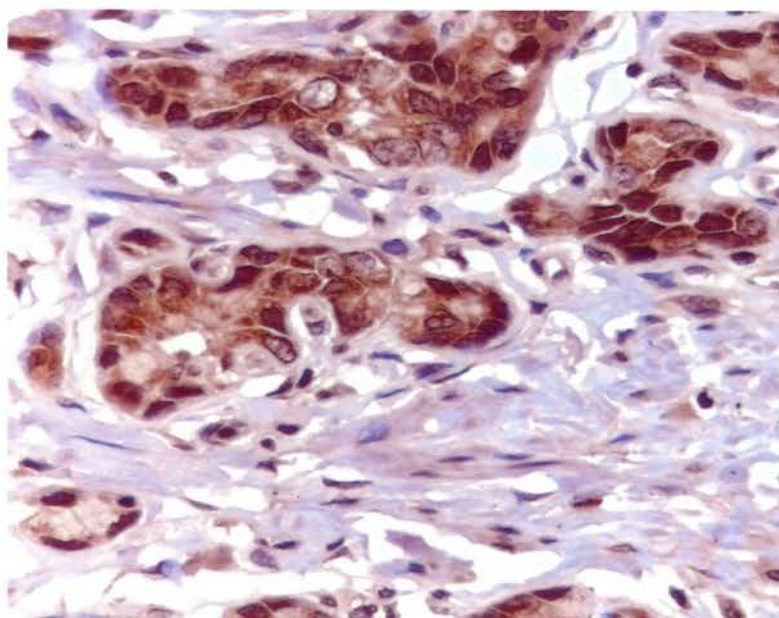


Figura 5A: IHQ demonstrando marcação anti- Bcl-x, com positividade citoplasmática nas células neoplásicas (aumento original 200x)

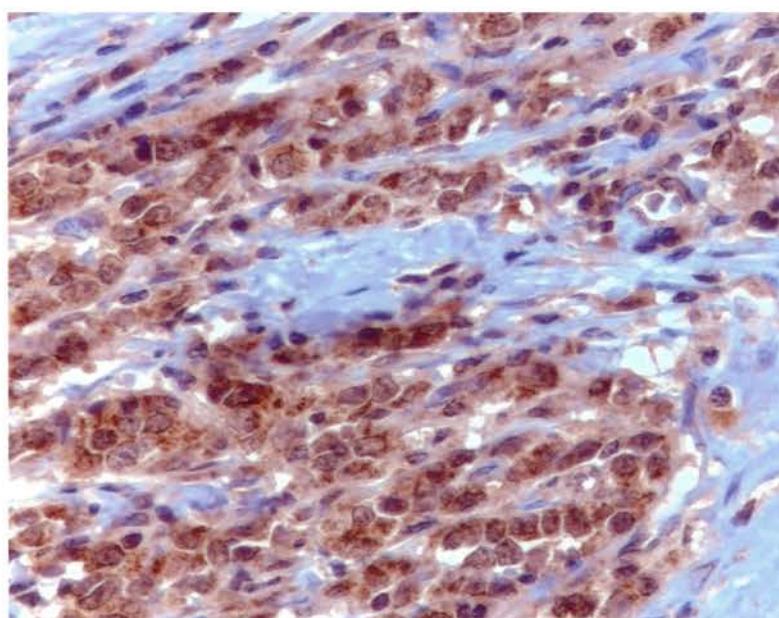


Figura 5B: IHQ demonstrando marcação anti- Bax, com positividade citoplasmática nas células neoplásicas (aumento original 200x)

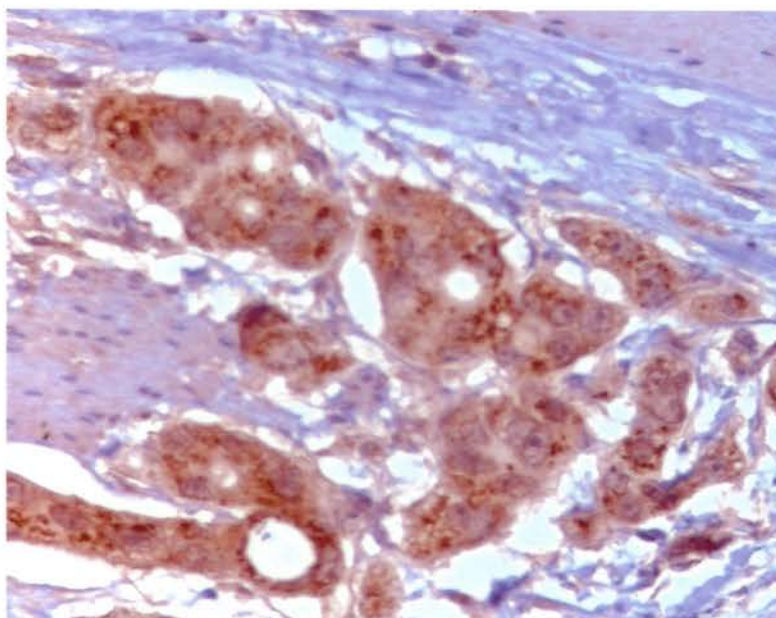


Figura 6A: IHQ demonstrando marcação anti-Bak no citoplasma as células neoplásicas (aumento original 200x)

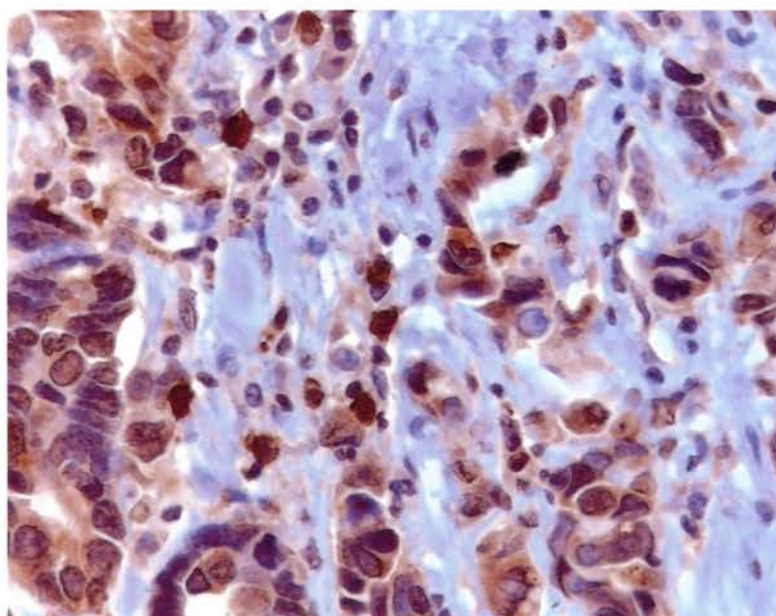


Figura 6B: IHQ anti-NOS 1 com forte marcação no citoplasma das células neoplásicas (aumento original 400x)

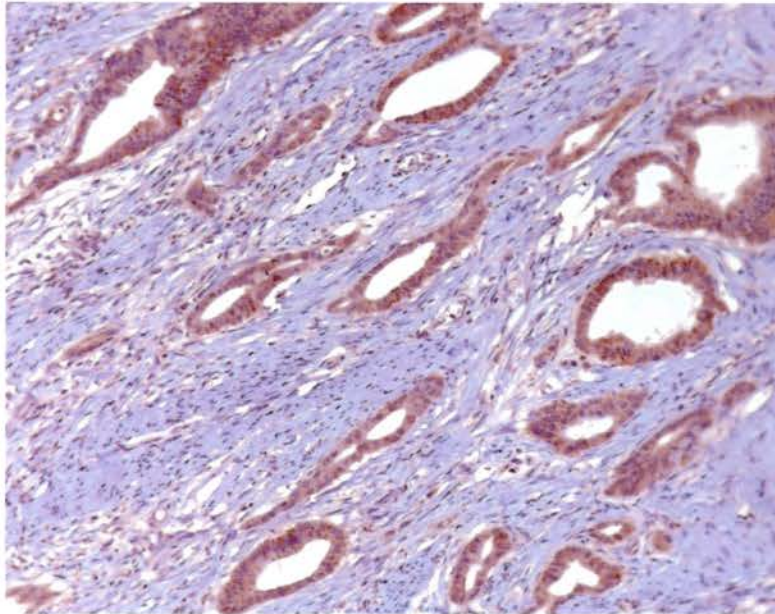


Figura 7A: IHQ anti-NOS2 exibindo marcação nas células neoplásicas
(aumento original 200x)

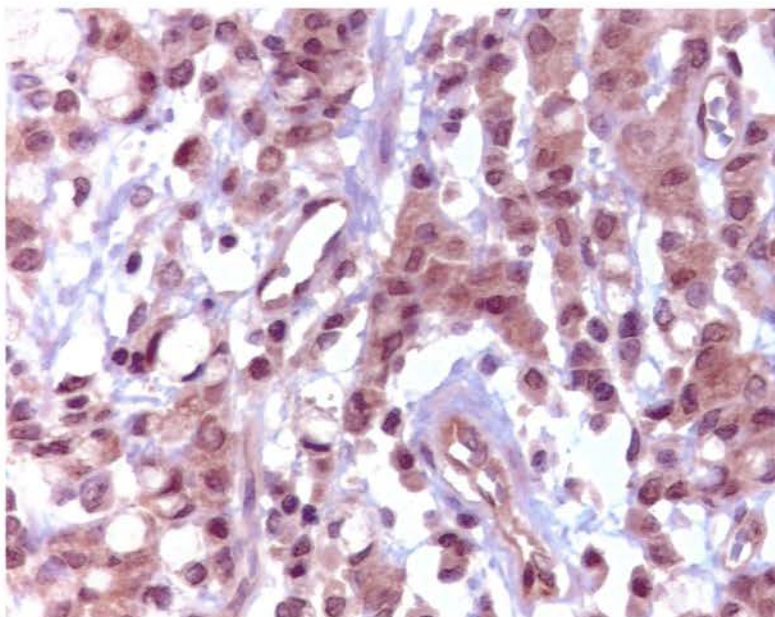


Figura 7B: IHQ demonstrando marcação anti-NOS3 nas células
neoplásicas e células endoteliais (aumento original 200x)

As isoformas constitutivas de NOS (NOS1 e NOS3) foram detectadas em 82 (70%) e 44 (37%) dos 118 casos estudados de carcinomas gástricos, respectivamente. Dentre os 9 casos EBV+, 6 (66%) mostraram-se positivos para NOS1 e somente 2 (22%) casos foram positivos para NOS3. A expressão de NOS 1 está portanto aumentada nos carcinomas gástricos e a de NOS2 está diminuída, porém estes resultados não mostram diferenças estatísticas em relação aos grupos EBV+ e EBV- ($P=0.53$ para NOS1 e $P= 0.27$ para NOS3).

A forma induzida de NOS (NOS2), foi detectada em 35 (30%) casos do total de 118. No grupo dos carcinomas EBV+ somente 1/9 (11%) casos foram positivos para NOS2, sendo observada frequência um pouco maior no grupo dos carcinomas EBV-, onde tivemos 34/109 (31%) casos positivos para NOS2. Estes resultados, apesar de discretas diferenças na frequência da expressão nos grupos EBV+ e EBV-, não mostraram significado estatisticamente significativos ($P= 0.19$).

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A presença de infecção pelo vírus de Epstein-Barr foi pesquisada em 118 casos de carcinomas gástricos. Através do método de hibridação *in situ*, 9 (7%) casos mostraram-se positivos para a sonda EBER1 RNA. A frequência de infecção pelo vírus em carcinomas gástricos na literatura, varia em torno de 2 a 24% (IMAI et al. 1994; GULLEY et al. 1996). No nosso estudo esta frequência (7%) corresponde ao da literatura e é muito semelhante ao descrito por TAKANO et al. (1999) e KIJIMA et al. (2001) cuja frequência descrita de casos EBV+ em carcinomas gástricos foi de 6.4% e 7.3%, respectivamente. Em todos os nossos casos EBV+, a presença do vírus foi detectada somente nas células neoplásicas e não foram detectados sinais de infecção viral no epitélio normal, nas áreas com metaplasia intestinal ou nos linfócitos que acompanham o tumor. Este resultado é muito semelhante ao descrito por SHIBATA e WEISS (1992) que também não demonstraram positividade para EBV nos linfócitos peri ou intratumorais. Os carcinomas EBV+ mostraram uma forte associação com a presença de infiltrado inflamatório linfocitário. A grande maioria dos carcinomas EBV+, exibiam uma quantidade moderada ou acentuada de linfócitos acompanhando o tumor. Dentre os 9 casos EBV+, 4 deles exibiam características morfológicas de carcinomas linfoepitelioma- like. MATSUNOU et al. (1996), demonstraram que a

consistente presença de linfócitos é característica dos carcinomas EBV+ e estão associados a um melhor comportamento clínico destes tumores. A presença de uma reação linfóide demonstrada nestes tumores está associada a uma resposta imune citotóxica específica do hospedeiro em resposta aos antígenos virais ou proteínas celulares dos carcinomas associados à infecção pelo vírus de Epstein-Barr (KUZUSHIMA et al. 1999).

Ainda é controverso na literatura, a associação de algumas características demográficas e histopatológicas com a infecção pelo vírus de Epstein-Barr em carcinomas gástricos. Alguns autores demonstraram que carcinomas EBV+ eram predominantes no sexo masculino, exibiam localização preferencial no estômago proximal, com alta prevalência no tipo difuso (SHIBATA et al. 1992; TOKUNAGA et al. 1993). No presente estudo, dados demográficos e histopatológicos como idade, gênero, raça, profundidade de infiltração da parede gástrica e metástases linfonodais, não mostraram diferenças entre os casos EBV+ e EBV-. O nosso estudo porém, demonstrou associação entre localização e tipo histológico e infecção pelo EBV. Os carcinomas EBV+, no nosso trabalho mostraram localização preferencial na região do cárdia e o tipo histológico mais comum era o difuso. Na literatura, porém, a maioria dos autores descrevem uma associação entre os carcinomas do tipo linfóepitelioma-*like* e a presença de infecção pelo EBV (KIJIMA et al. 2001). Por outro lado, trabalhos como de TOKUNAGA e LAND (1998) e TAKADA (2000),

não encontraram associação entre qualquer tipo histológico e presença de infecção pelo EBV.

A presença de gastrite atrófica e subsequente metaplasia intestinal, são condições associadas à carcinogênese gástrica. Nos últimos anos, muitos trabalhos têm demonstrado que a infecção associada ao *H. pylori* na mucosa gástrica cria condições que favorecem o quadro de gastrite atrófica, metaplasia intestinal e eventualmente progressão para neoplasias malignas. A infecção pelo *H. pylori* não está associada a um tipo histológico específico, sendo que na literatura observamos uma discreta preferência pelo tipo intestinal e colonização preferencial na região distal do estômago (HANSSON et al. 1995). A presença concomitante de infecção pelo *H. pylori* e Epstein-Barr vírus na mucosa gástrica, podem apresentar papéis distintos ou associados na patogênese das neoplasias gástricas. A presença de mucosa atrófica e áreas de metaplasia intestinal são vistas tanto nos casos EBV+ quanto nos casos EBV-. Também é possível que um carcinoma EBV+ se desenvolva em mucosa gástrica atrófica colonizada previamente por *H. pylori*. Portanto, torna-se difícil identificar o verdadeiro papel do *H. pylori* nos casos de carcinomas gástricos EBV+ em que coexistam gastrite atrófica e metaplasia intestinal. No nosso estudo demonstramos uma baixa frequência de casos de carcinomas gástricos *H. pylori*+, sendo esta frequência ainda menor nos casos EBV+. Estes resultados são semelhantes ao descrito por THAM et al. (2001) e CHAN et al. (2002) que

demonstraram uma relação inversa entre os títulos de *H. pylori* e a presença de EBV. Ao contrário, YANAI et al. (1999) demonstraram que a infecção pelo *H. pylori* é maior nos casos EBV+ do que nos casos EBV-. Os mecanismos fisiológicos de resposta imune ativados por uma infecção (pelo *H. pylori* ou EBV) podem proteger ou agravar uma segunda infecção concomitante, portanto, outros estudos são necessários para esclarecer a verdadeira relação entre *H. pylori* e EBV nos carcinomas gástricos.

Carcinogênese é um processo de múltiplos passos, que tem origem no epitélio normal que pode desenvolver lesões pré-neoplásicas, que por sua vez podem se transformar em neoplasias altamente malignas. Este processo é acompanhado por múltiplas alterações genéticas acumulativas (CORREA et al. 1992). Nos carcinomas gástricos associados à infecção pelo EBV, a presença do vírus foi encontrada em algumas lesões pré-cancerosas e na maioria das células tumorais, sob a forma epissomal monoclonal, sugerindo que as células são infectadas pelo EBV antes da sua transformação maligna (IMAI et al. 1994). No nosso estudo, a positividade das células para EBV estava presente na maioria das células tumorais, porém, não vimos positividade no epitélio displásico nos raros casos em que este estava presente.

Mutação do gene p53 e sua hiperexpressão são achados comuns nos carcinomas gástricos, sendo detectadas não somente nos tumores, mas também em áreas de displasia e metaplasia intestinal (SHIAO et al. 1994). Os carcinomas gástricos EBV+ tendem a apresentar uma super-

expressão de p53 quando comparamos com os casos EBV- (OJIMA et al. 1997). No presente estudo, demonstramos que 59% dos carcinomas gástricos de uma maneira geral expressam p53, porém essa expressão não é diferente nos casos EBV+ e EBV-. Estes resultados são semelhantes aos descritos por GULLEY et al. (1996) e OHFUJI et al. (1996), que não demonstraram associação entre expressão de p53 e infecção pelo EBV nos carcinomas gástricos. Esta super-expressão do p53 por nós encontrada não representa exclusivamente a sua forma mutada, uma vez que o anticorpo por nós utilizado não reconhece somente a forma mutante do p53. Portanto o nosso resultado deve ser analisado com cautela e a pesquisa da forma mutante através do seu reconhecimento por um anticorpo específico ou através da análise indireta através da pesquisa do p21 é fundamental para a análise destes resultados com precisão. Alguns estudos *in vitro* mostraram que as proteínas codificadas pelo EBV podem se ligar à p53, interferindo na sua função, resultando em um possível aumento da sua meia vida e acúmulo na célula.

As relações entre os genes e proteínas associadas à apoptose e a carcinogênese gástrica são bastante complexas. Neste estudo, nós pesquisamos a expressão de várias proteínas que fazem parte da família do Bcl-2 nos casos de carcinomas gástricos. Foram pesquisadas as expressões de Bcl-2, Bcl-x, Bax e Bak. A maioria dos tumores mostraram expressão destas proteínas, porém a porcentagem de células positivas foi

variável entre as várias proteínas e diferenças de expressão não foram detectadas nos grupos de carcinomas EBV+ e EBV-. A expressão de Bcl-2, uma proteína com atividade anti-apoptótica, foi de somente 15% nos carcinomas gástricos e estava presente somente em 2/9 dos casos EBV+, enquanto que a expressão de Bcl-x, proteína pertencente também ao grupo das anti-apoptóticas, mostrou-se bastante elevada, estando presente em 93% dos casos EBV+ e em 100% dos casos EBV-. Este balanço de expressão entre estas proteínas pode ter um significado importante na biologia do carcinoma gástrico, uma vez que a expressão baixa de Bcl-2 e uma alta frequência de expressão de Bcl-x nas células tumorais, poderia representar um mecanismo alternativo que favoreceria a disseminação tumoral, e, poderia estar associado ao mecanismo de latência e imortalização das células observado nos carcinomas gástricos EBV+. A fenômeno similar foi observado por KRAJEWSKA et al. (1996 b) em adenocarcinomas retais, sugerindo que graus de expressão elevados da proteína Bcl-x pode representar um evento comum na patogênese e/ou progressão de neoplasias epiteliais malignas do trato gastrointestinal. Estudos *in vitro* têm mostrado que a presença de LMP1 pode induzir a expressão da oncoproteína Bcl-2 (HENDERSON et al. 1991), porém estes achados não são confirmados *in vivo*. Os nossos achados também não demonstraram aumento de expressão de Bcl-2 nos carcinomas gástricos que mostraram expressão de LMP1.

Fundação Antonio Prudente
Ana Maria Rodrigues Alves Kumari
Coordenadora Pós-Graduação

A expressão das proteínas pró-apoptóticas também estavam elevadas nos nossos casos, sendo que cerca de 86% dos casos expressaram Bax e 68% dos casos eram Bak positivos. Este padrão de expressão destas proteínas é semelhante ao descrito por KRAJEWSKA et al. (1996a) nas células epiteliais normais da mucosa gástrica onde os autores observaram uma super-expressão das proteínas pró-apoptóticas da família do Bcl-2.

Nossos resultados mostraram que os carcinomas gástricos EBV+ apresentaram expressão um pouco mais baixa de Bak, quando comparados aos casos EBV-. Semelhante ao Bax, o gene Bak através de estímulo apropriado induz a célula à apoptose. Porém ao contrário do Bax, o gene Bak pode inibir a morte celular em linhagem de células transformadas pelo EBV (KIEFER et al. 1995). O mecanismo no qual a super-expressão de Bak pode inibir a apoptose em células transformadas pelo EBV ainda não está totalmente esclarecido. O Bak pode induzir a liberação de fatores anti-apoptóticos como o homólogo do Bcl-2 BHRF-1 nos casos EBV+ que favorecem a proliferação celular destes casos (HENDERSON et al. 1991). No nosso estudo, a presença de baixa expressão de Bak, nos casos EBV+ é acompanhada por uma expressão aumentada de Bax e Bcl-x (proteína inibidora da apoptose) e apesar de não se demonstrar significado estatístico, esse aumento de expressão das demais proteínas, pode estar associados em um mecanismo interligado que controlam a apoptose, favorecendo ou inibindo a

proliferação celular e disseminação tumoral. A compreensão dos mecanismos moleculares pelos quais o vírus pode evadir o sistema normal de controle de crescimento tumoral é muito importante para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos específicos nestes casos.

Um outro fator relacionado à oncogênese de neoplasias malignas em relação a presença de infecção pelo EBV é a expressão da proteína de membrana latente LMP1. Alguns trabalhos têm demonstrado que esta proteína não é comumente expressa nos casos de carcinomas gástricos (TAKANO e KATO, 1995). A deleção de 30pb na região C-terminal do gene LMP1 está associada à patogênese do carcinoma de rinofaringe e doença de Hodgkin. Porém essa deleção não é relevante na patogênese do carcinoma gástrico associado ao EBV (MORI et al. 1999).

Os produtos do gene EBV que iniciam e mantêm as células infectadas em crescimento *in vitro*, incluem 6 antígenos nucleares (EBNAs 1,2,3a,3b, 3c) e LP e 2 proteínas de membrana (LMPs 1 e 2). Embora os mecanismos individuais de ação de cada proteína ainda não estejam totalmente estabelecidos, o efeito acumulativo destas 8 proteínas parece ser o responsável pelo mesmo mecanismo em situações *in vivo*. Em tecidos infectados pelo vírus do EBV, 3 padrões de latência causada pela expressão gênica viral podem ser observados. A latência tipo I refere-se a um espectro muito limitado de expressão gênica, chamada de transcritos EBER juntamente com as proteínas EBNA1 e LMP2A. Este padrão é

encontrado nos linfócitos circulantes em indivíduos hígidos, e também é característico dos linfomas de Burkitt e carcinoma gástrico. A latência do tipo II é caracterizada pela coexpressão de LMP1 e LMP2B e é vista nos linfomas de Hodgkin, linfomas de células T e carcinomas de nasofaringe. A latência do tipo III refere-se a um amplo espectro de expressão gênica, é encontrada na mononucleose infecciosa e em doenças linfoproliferativas associadas ao EBV em pacientes imunodeprimidos. A expressão gênica viral deste tipo de latência inclui todos os EBNAs, LMPs e EBER. Embora o padrão de expressão gênica descrito acima seja útil no diagnóstico das lesões, na prática, o que se observa é que há uma variedade de expressão destas proteínas nas células de um mesmo tumor (GULLEY 2001). No nosso estudo observou-se positividade para LMP1 em 13 casos, sendo que 5 deles mostraram positividade concomitante para EBER1. A expressão desta proteína em carcinomas gástricos já foi descrita anteriormente por OHFUJI et al. (1996) e HAYASHI et al. (1998). Porém é discordante da maioria dos autores que demonstraram positividade para as proteínas de latência do tipo I (LMP2A, BARF1 BARF0) (ZUR HAUSEN et al. 2000; VO et al. 2002). Os casos que expressaram LMP1 na nossa casuística podem estar associados à imunossupressão, porém não foi possível concluir esta hipótese, uma vez que nossos casos eram constituídos por tumores avançados e a maioria dos casos evoluíram para o óbito, sem a confirmação de imunossupressão associada.

A baixa expressão de LMP1 em carcinomas gástricos de pacientes imunocompetentes ainda não é satisfatoriamente explicada. A expressão de LMP1 está associada à resposta do sistema imune de cada indivíduo e parece estar relacionada com a função de diferenciação celular, uma vez que estudos *in vitro* mostraram que células de linhagem epitelial infectadas pelo EBV não expressaram LMP1, exceto quando havia indução da replicação viral por outros agentes (LI et al. 1992). Os nossos achados, portanto permite concluir que a pesquisa de EBV por hibridação *in situ* ainda é o método *gold-standard* nos carcinomas gástricos e que a pesquisa de LMP1 por imuno-histoquímica pode ser útil, quando associada à outros métodos.

Recentemente, o óxido nítrico tem mostrado um importante papel na carcinogênese, atuando nos fatores angiogênicos, na regulação da microcirculação e no dano celular. O presente estudo demonstra que carcinomas gástricos expressam alguma isoforma de NOS na grande maioria dos casos. A isoforma mais frequentemente expressa é a NOS neuronal, onde cerca de 70% (82 amostras) foram positivos, seguidos de NOS endotelial (37%) e finalmente NOS induzida (30%). Poucos trabalhos na literatura realizaram o estudo com as três isoformas de NOS. Em estudo através da detecção de mRNA, DOI et al. (1999) demonstraram que praticamente todos os casos de adenocarcinomas gástricos expressam NOS 3, mas em quantidade similar à mucosa normal. Desta

forma, nosso trabalho mostra que as células neoplásicas dos carcinomas gástricos tem o aparato enzimático para a produção de NO.

O NO é produzido a partir do substrato L-arginina que é convertido através das enzimas em L- citrulina e NO. As NOS constitutivas são responsáveis por produção de pequenas quantidades de NO, enquanto que a NOS induzida é responsável por quantidades maiores e ação mais duradoura (SCHMIDT et al. 1992). Os resultados do presente estudo mostram que apesar de mais do que 80% dos tumores expressarem alguma de NOS, somente 30% expressam a NOS 2. A revisão da literatura mostra resultados similares (RAJNAKOVA et al. 2001) ou discretamente mais elevados, em torno de 44-50% dos casos (SON et al. 2001; SONG et al. 2002; FENG et al. 2002). Maiores quantidades e freqüência de expressão de NOS induzida tem sido associado a doenças em estágio mais avançado (DOI et al. 1999; RAJNAKOVA et al. 2001). O significado desta diferença em relação à produção de NO necessita ainda ser avaliado pela quantificação sérica e tecidual. No nosso estudo, não fizemos a correlação da expressão das sintases do óxido nítrico com o estadiamento, porém a correlação com metástases linfonodais não mostraram diferença estatisticamente significativa. Não observamos correlações entre as expressões de NOS e demais variáveis demográficas e histopatológicas como idade, sexo e localização do tumor.

Os efeitos do óxido nítrico nas células são dose dependente. Embora altas concentrações de NO possam ter efeito citostático e

citotóxico, baixas concentrações de NO podem proteger alguns tipos de células de agressões e inibir a apoptose. O óxido nítrico pode agir diretamente pelo estímulo das células endoteliais ou podem induzir a expressão de outros fatores angiogênicos com o fator de crescimento endotelial (VEGF). A produção de NO em tumores humanos podem causar danos ao DNA e alterações no p53 que afetam o ciclo celular e apoptose. Como resultado, a produção de NOS pode contribuir para a progressão tumoral. Em particular, a produção de NO pelos macrófagos tem se mostrado associado à resistência contra patógenos intracelulares, como parasitas, fungos e vírus. No caso do EBV, o óxido nítrico tem mostrado uma ação inibidora da reativação viral das células B infectadas (MANNICK et al. 1994). Embora os mecanismos de ação antiviral do óxido nítrico ainda não estejam totalmente esclarecidas, a multiplicidade de enzimas e alterações nas células do hospedeiro associadas a ação viral podem de uma maneira complexa atuar concomitantemente no desenvolvimento tumoral. Estes achados nos leva a propor que a latência do EBV pode diretamente ou indiretamente agir na expressão das sintases do óxido nítrico e ser um importante fator na resposta do hospedeiro em relação à ação viral. No nosso estudo, embora tenhamos demonstrado uma discreta diferença de expressão das isoformas de NOS nos carcinomas gástricos de uma maneira geral, não encontramos diferenças estatisticamente significantes entre as expressões das sintases do óxido nítrico e a presença de infecção pelo EBV nos carcinomas

gástricos. Portanto, os carcinomas gástricos estão associados à infecção por EBV em torno de 7%. A maioria dos carcinomas EBV+ são do tipo difuso, localizam-se na região do cárdia, são tumores infiltrativos (além da camada muscular), com frequentes metástases em linfonodos e mostram estroma rico em linfócitos. Os carcinomas gástricos EBV+ mostraram hiper-expressão imuno-istoquímica de p53, Bcl-x, Bak e NOS 1 e baixa expressão de Bcl-2, Bak, NOS2 e NOS3.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

1. Em nosso meio os carcinomas gástricos estão associados à infecção pelo vírus de Epstein-Barr em torno de 7%;
 2. carcinomas gástricos EBV+ localizam-se preferencialmente na região do cárdia;
 3. carcinomas gástricos EBV+ são freqüentemente do tipo difuso e estão acompanhados por infiltrado inflamatório linfocitário de moderada a intensa quantidade;
 4. carcinomas gástricos EBV+ mostram hiper-expressão de Bcl-x e Bax e baixa expressão de Bcl-2 e Bak
 5. carcinomas gástricos EBV+ não mostram diferenças de expressão de p53 em relação aos carcinomas EBV-;
 6. carcinomas gástricos EBV+ mostram aumento de expressão de NOS neuronal (NOS1) e baixa expressão das sintases do óxido nítrico macrofágica e endotelial (NOS2 e NOS3).
-

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ambs S, Merriam WG, Ogunfusika MO, et al. p53 and vascular endothelial growth factor regulate tumor growth of NOS2- expressing human carcinoma cells. **Nat Med** 1998; 4:1371-6.

Ambs S, Bennett WP, Merriam WG, et al. Relation between p53 mutations and inducible nitric oxide synthase expression in human colorectal cancer. **J Natl Cancer Inst** 1999; 92:86-8.

Arikawa J, Tokinaga M, Satoh E, Tanaka S, Land CE. Morphological characteristics of Epstein-Barr virus-related early gastric carcinoma: a case-control study. **Pathol Int** 1997; 47:360-7.

Bass IO, Van Rees BP, Musler A, et al. *Helicobacter pylori* and Epstein Barr virus infection and the p53 tumour suppressor pathway in gastric stump cancer compared with carcinoma in the non-operated stomach. **J Clin Pathol** 1998; 51:662-6.

Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, et al. Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. **Cancer Res** 1995; 55:2111-5.

Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide, a novel neuronal messenger. **Neuron** 1992; 8:3-11.

Butler A, Colby TV, Weiss L, Lombard C. Lympho- epithelioma-like carcinoma of the lung. **Am J Surg Pathol** 1989; 13: 632-9.

Chan WY, Liu Y, Li CYS, et al. Recurrent genomic aberrations in gastric carcinomas associated with *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr virus. **Diagn Mol Pathol** 2002; 11:127-34.

Chiaravalli AM, Cornaggia M, Furlan D, et al. The role of histological investigation in prognostic evaluation of advanced gastric cancer. **Virchows Arch** 2001; 439:158-69.

Cho YJ, Chang BSMS, Park SH, Kim HS, Kim WH. *In situ* hybridization of Epstein-Barr virus in tumor cells and tumor- infiltrating lymphocytes of the gastrointestinal tract. **Hum Pathol** 2001; 32:297-301.

Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process. **Cancer Res** 1992; 52:6735-40.

Doi C, Noguchi Y, Marat D, et al. Expression of nitric oxide synthase in gastric cancer. **Cancer Lett** 1999, 144:161-7

Feng CW, Wang LD, Jiao LH, Liu B, Zheng S, Xie XJ. Expression of p53, inducible nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in gastric precancerous and cancerous lesions: correlation with clinical features. **BMC Cancer** 2002; 2:8.

Goto T, Haruma K, Kitadai Y, et al. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in gastric mucosa of gastric cancer patients.

Clin Cancer Res 1999; 5:1411-5.

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; 27:20-7.

Gulley ML. Molecular diagnosis of Epstein-Barr virus- related diseases. **J Mol Diagn** 2001; 3:1-10.

Hahm KB, Lee KJ, Kim JH, Cho SW, Chung MH. *Helicobacter pylori*, oxidative DNA damage, gastric carcinogenesis, and reversibility by rebamipide. **Diag Dis Sci** 1998; 43:72S-77S.

Hansson LE, Engstrand L, Nyren O, Lindgren A. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in subtypes of gastric cancer. **Gastroenterology** 1995; 109:885-8.

Hayashi K, Chen WG, Chen YY, et al. Deletion of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 gene in Japanese and Brazilian gastric carcinomas, metastatic lesions, and reactive lymphocytes. **Am J Pathol** 1998; 152:191-8.

Henderson S, Rowe M, Gregory C, et al. Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. **Cell** 1991; 65:1107-15.

Hsich LL, Lin PJ, Chen TC, Ou JT. Frequency of Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinoma in Taiwan. **Cancer Lett** 1998; 129:125-9.

Hsu HC, Cehn CC, Huang GT, Lee PH. Clonal Epstein-Barr virus associated cholangiocarcinoma with lymphoepithelioma-like component. **Hum Pathol** 1996; 27: 848-50.

Imai S, Koizumi S, Sugiuri M, et al. Gastric carcinoma: monoclonal epithelial malignant cells expressing Epstein-Barr virus latent infection protein. **Proc Natl Acad Sci USA** 1994; 91:9131-5.

Ishii H, Gobe 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: 111-9.

Jones NL, Shannon PT, Cutz E, Yeger H, Sherman PM. Increase in proliferation and apoptosis of gastric epithelial cells early in the natural history of *Helicobacter pylori* infection. **Am J Pathol** 1997; 151:1695-703.

Kiefer MC, Brauer MJ, Powers VC, et al. Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak. **Nature** 1995; 374:736-9.

Kijima Y, Hokita S, Takao S, et al. Epstein-Barr virus involvement is mainly restricted to lymphoepithelial type of gastric carcinoma among various epithelial neoplasms. **J Med Virol** 2001; 64: 513-8.

Koh E, Noh SH, Lee YD, Han LW, Lee HW, Hong S. Differential expression of nitric oxide synthase in human stomach cancer. **Cancer Lett** 1999; 146:173-80.

Kojima M, Morisaki T, Tsukahara Y, et al. Nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in human colon carcinoma tissue. **J Surg Oncol** 1999; 70:222-9.

Krajewska M, Fenoglio- Preiser CM, Krajewski S, K, Macdonald JS, Stemmerman G. Immunohistochemical analysis of bcl-2 family proteins in adenocarcinomas of the stomach. **Am J Pathol** 1996a, 149: 1449-57.

Krajewska M, Moss S, Krajewski S, K, Holt P, Reed JC. Elevated expression of Bcl-x and reduced Bak in primary colorectal adenocarcinomas. **Cancer Res** 1996b, 56:2422-7.

Kume T, Oshima K, Yamashita Y, Shirakusa T, Kikuchi M. Relationship between Fas-ligand expression on carcinoma cell and cytotoxic T-lymphocyte response in lymphoepithelioma- like cancer of the stomach. **Int J Cancer** 1999; 84:339-43.

Kuzushima K, Nakamura S, Nakamura T, et al. Increased frequency of antigen-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes infiltrating an Epstein-Barr virus- associated gastric carcinoma. **J Clin Invest** 1999; 104:163-71.

Labrecque LG, Barners DM, Fentiman IS, Griffin BE. Epstein-Barr virus in epithelial cells tumors: a breast cancer study. **Cancer Res** 1995; 55: 39-45.

Lala PK, Orucevic A. Role of nitric oxide in tumor progression: lessons from experimental tumors. **Cancer Metastasis Rev** 1998; 17:91-106.

Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal type carcinoma: an attempt at histoclinical classification. **Acta Pathol Microbiol Scand** 1965; 64:31-49.

Leung SY, Chau KY, Yuen ST, Chu KM, Branicki FJ, Chung LP. p53 overexpression is different in Epstein-Barr virus- associated and Epstein-Barr virus- negative carcinoma. **Histopathology** 1998; 33:311-7.

Li QX, Yong LS, Niedobitek G, et al. Epstein-Barr virus infection and replication in human epithelial cell system. **Nature** 1992; 356:347-50.

Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger. **Ann Intern Med** 1994; 120:227-37.

Luqmani YA, Linjawi SO, Shousha S. Detection of Epstein –Barr in gastrectomy specimens. **Oncol Rep** 2001; 8:995-9.

Mannick JB, Asano K, Izumi K, Kieff E, Stamler JS. Nitric oxide produced by human B lymphocytes inhibits apoptosis and Epstein-Barr virus reactivation. **Cell** 1994; 79:1137-46.

Matsunou H, Konishi F, Hori H, et al. Characteristics of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma with lymphoid stroma in Japan. **Cancer** 1996; 77:1998-2004.

Mills SE, Austin MB, Randall ME. Lympho-epithelioma- like carcinoma of the uterine cervix: a distinctive, undifferentiated carcinoma with inflammatory stroma. **Am J Surg Pathol** 1985; 9: 883-9.

Ming SC. Cellular and molecular pathology of gastric carcinoma and precursor lesions: a critical review. **Gastric Cancer** 1998; 1:31-50.

Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2002.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev** 1991; 43:109-42.

Moochhala S, Chhatwal VJS, Chan STF, Ngoi SS, Chia YW, Rauff A. Nitric oxide synthase activity and expression in human colorectal cancer. **Carcinogenesis** 1996; 17:1171-4.

Mori M, Watanabe M, Tanaka S, Mimori K, Kuwano H, Sugimachi K. Epstein-Barr virus-associated carcinomas of the esophagus and stomach. **Arch Pathol Lab Med** 1994; 118:998-1001.

Mori S, Itoh T, Tokunaga M, et al. Deletions and single- base mutations within the carboxy-terminal region of the latent membrane protein 1 oncogene in Epstein-Barr virus- related gastric cancers of Southern Japan. **J Med Virol** 1999; 57:152-8.

Moritani S, Sugihara H, Kushima R, Hattori H. Different roles of p53 between Epstein-Barr virus- positive and –negative gastric carcinomas of matched histology. **Virchows Arch** 2002; 440:367-75.

Ohfuji S, Osaki M, Tsujitani S, et al. Low frequency of apoptosis in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma with lymphoid stroma. **Int J Cancer** 1996; 68:710-5.

Ohshima H, Bartsch H. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. **Mutat Res** 1994; 305:253-64.

Ojima H, Fukuda T, Nakajima T, et al. Infrequent overexpression of p53 protein in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinomas. **Jpn J Cancer Res** 1997; 88:262-6.

Rajnakova A, Goh PMY, Chan STF, Ngoi SS, Alponat A, Moolchhala S. Expression of differential nitric oxide synthase isoforms in human normal gastric mucosa and gastric cancer tissue. **Carcinogenesis** 1997; 18:1841-5.

Rajnakova A, Moolchhala S, Goh PMY, Ngoi SS. Expression of nitric oxide synthase, cyclooxygenase, and p53 in different stages of human gastric cancer. **Cancer Lett** 2001; 172:177-85.

Rowlands DC, Ito M, Mangham DC, et al. Epstein-Barr virus and carcinomas: rare association of the virus with gastric adenocarcinomas. **Br J Cancer** 1993; 68:1014-9.

Saiki Y, Ohtani H, Naito Y, et al. Immunophenotypic characterization of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: massive infiltration by proliferating CD8+ T-lymphocytes. **Lab Invest** 1996; 75:67-76.

Santos RTM, Wakamatsu A, Kanamura CI, Honogaki S, Pinto GA. Procedimentos laboratoriais em imunohistoquímica e hibridização *in situ*. In: Alves VAF, Bacchi CE, Vassalo J, editores. **Manual de imunohistoquímica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia; 1999; p.237-59.

Saw D, Lau WH, Ho JHC, Chan JKC, NG CS. Malignant lympho- epithelial lesion of the salivary gland. **Hum Pathol** 1986; 17: 914-23.

Schmidt HH, Pollock JS, Nakane M, Forstermann U, Murad F. Ca²⁺/calmodulin- regulated nitric oxide synthases. **Cell Calcium** 1992; 13:427- 34.

Schneider BG, Gulley ML, Eagan P, Bravo JC, Mera R, Geradts J. Loss of p16/CDKN2A tumor supressor protein in gastric adenocarcinoma is associated with Epstein-Barr virus and anatomic location in the body of the stomach. **Hum Pathol** 2000; 31:45-50.

Sheu LF, Chen A, Wei YH, et al. Epstein-Barr virus LMP1 modulates the malignant potential of gastric carcinoma cells involving apoptosis. **Am J Pathol** 1998; 152:63-74.

Shiao YH, Rugge M, Correa P, Lehmann HP, Scheer WD. P53 alteration in gastric precancerous lesions. **Am J Pathol** 1994; 144: 511-517.

Shibata D, Tokunaga M, Uemura Y, Sato E, Tanaka S, Weiss LM. Association of Epstein-Barr virus with undifferentiated gastric carcinomas with intense lymphoid infiltration. **Am J Pathol** 1991; 139:469-74.

Shibata D, Weiss LM. Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinoma. **Am J Pathol** 1992; 140:769-74.

Son HJ, Kim YH, Park D, et al. Interaction between cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in gastric cancer. **J Clin Gastroenterol** 2001, 33:383-8

ZJ, Gong P, Wu YE. Relationship between the expression of iNOS, VEGF, tumor angiogenesis and gastric cancer. **World J Gastroenterol** 2002, 8: 591-5.

Takada K. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. **Mol Pathol** 2000; 53:255-61.

Takano Y, Kato Y. Epstein-Barr virus association with early cancers found together with gastric medullary carcinomas demonstrating lymphoid infiltration. **J Pathol** 1995; 175:39-44.

Takano Y, Kato Y, Saegusa M, et al. The role of the Epstein-Barr virus in the oncogenesis of EBV(+) gastric carcinomas. **Virchows Arch** 1999; 434:17-22.

Tham KT, Peek RM Jr, Atherton JC, Cover TL, Perez-Perez GI, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* genotypes, host factors, and gastric mucosal histopathology in peptic ulcer disease. **Hum Pathol** 2001; 32:264-73.

Tokunaga M, Land CE, Uemura Y, Tokudome T, Tanaka S, Sato E. Epstein-Barr virus in gastric carcinoma. **Am J Pathol** 1993; 143:1250-4.

Tokunaga M, Land CE. Epstein-Barr virus involvement in gastric cancer: biomarker for lymph node metastasis. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 1998; 7:449-50.

Vo QN, Geradts J, Gulley ML, Boudreau DA, Bravo JC, Schneider BG. Epstein-Barr virus in gastric adenocarcinomas: association with ethnicity and CDKN2A promoter methylation. **J Clin Pathol** 2002; 55:669-75.

Wang HH, Wu MS, Shun CT, Wang HP, Lin CC, Lin JT. Lymphoepithelioma-like carcinoma of the stomach: a subset of gastric carcinoma with distinct clinicopathological features and high prevalence of Epstein-Barr virus infection. **Hepatogastroenterology** 1999; 46:1214-19.

Weiss LM, Gaffey MJ, Shibata D. Lymphoepithelioma-like carcinoma and its relationship to Epstein-Barr virus. **Am J Clin Pathol** 1991; 96:156-8.

Wolf G. Nitric oxide and nitric oxide synthase: biology, pathology, localization. **Histol Histopathol** 1997; 12:251-61.

Wu MS, Shun CT, Wu CC, et al. Epstein-Barr virus- associated gastric carcinomas: relation to *H. pylori* infection and genetic alterations.

Gastroenterology 2000; 118:1031-8.

Yanai H, Murakami T, Yoshiyama H, et al. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma and atrophic gastritis. **J Clin Gastroenterol** 1999; 29:39-43.

Yuen ST, Chung LP, Leung SY, et al. *In situ* detection of Epstein-Barr virus in gastric and colorectal adenocarcinomas. **Am J Surg Pathol** 1994; 18:1158-63.

Zur Hausen A, Brink ATP, Craanen ME, et al. Unique transcription pattern of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV-carrying gastric adenocarcinomas: expression of the transforming *BARF1* gene. **Cancer Res** 2000; 60:2745-8.

Zur Hausen A, Grieken NCTV, Meijer GA, Hermesen MAJA, Bloemena E, Meuwissen SGM. Distinct chromosomal aberrations in Epstein-Barr virus-carrying gastric carcinomas tested by comparative genomic hybridization. **Gastroenterology** 2001; 121:612-8.

ANEXOS

RGH	AP	idade	sexo	raça	local	tipo histo	nível infiltr	H. pylori	infiltr linfoc	metást	p53	Bcl-2	Bcl-x	Bax	Bak	LMP1	EBER1	NOS1	NOS2	NOS3
9405396	320289	74	masc	branco	antro	intestinal	serosa	negativo	leve	presente	2(1+1)	0(0+0)	6 (2+4)	5(2+3)	4 (2+2)	neg	neg	4(2+2)	4(2+2)	2(1+1)
9404726	321782	69	masc	branco	antro	difuso	serosa	negativo	leve	presente	7(3+4)	0(0+0)	5 (2+3)	7(3+4)	5 (2+3)	neg	neg	5(2+3)	4(2+2)	4(2+2)
9600568	332602	60	masc	branco	corpo	difuso	muscular	negativo	leve	ausente	7(3+4)	0(0+0)	5 (2+3)	5(2+3)	5 (2+3)	neg	neg	4(2+2)	3(1+2)	2(1+1)
9600735	332699	60	masc	branco	corpo	intestinal	serosa	negativo	leve	presente	5(2+3)	0(0+0)	7 (3+4)	7(3+4)	5 (2+3)	neg	neg	4(2+2)	4(2+2)	4(2+2)
9600699	332706	53	masc	branco	antro	intestinal	muscular	positivo	leve	ausente	0(0+0)	0(0+0)	6 (3+3)	5(2+3)	5 (2+3)	neg	neg	5(2+3)	0(0+0)	2(1+1)
9104458	332944	51	fem	amarelo	antro	intestinal	mucosa	negativo	leve	ausente	3(1+2)	0(0+0)	6 (2+4)	6(2+4)	5 (2+3)	neg	neg	4(1+3)	5(2+3)	2(1+1)
9600940	333357	65	fem	branco	corpo	intestinal	serosa	negativo	moderado	presente	0(0+0)	0(0+0)	5 (2+3)	5 (2+3)	6 (3+3)	neg	neg	3(1+2)	4(2+2)	2(1+1)
9601108	333363	84	fem	branco	corpo	difuso	serosa	positivo	moderado	ausente	5(2+3)	0(0+0)	7 (3+4)	5(2+3)	4 (2+2)	neg	neg	0(0+0)	0(0+0)	4(2+2)
9600564	333388	69	masc	branco	corpo	difuso	serosa	positivo	leve	ausente	7(3+4)	2(1+1)	7 (3+4)	7(3+4)	7 (3+4)	neg	neg	4(2+2)	5(2+3)	2(1+1)
9600771	333390	63	masc	branco	antro	intestinal	serosa	negativo	leve	presente	0(0+0)	0(0+0)	6 (3+3)	7(3+4)	4 (2+2)	neg	neg	5(2+3)	4(2+2)	4(2+2)
9401973	333810	82	fem	branco	corpo	intestinal	serosa	negativo	intenso	presente	7(4+3)	0(0+0)	5 (2+3)	5(2+3)	3 (1+2)	neg	neg	5(2+3)	0(0+0)	3(1+2)
9601474	334268	60	masc	branco	corpo	intestinal	serosa	positivo	leve	ausente	0(0+0)	0(0+0)	3 (1+2)	5 (2+3)	5 (2+3)	neg	neg	4(2+2)	4(2+2)	2(1+1)
9601391	334453	70	masc	branco	corpo	intestinal	serosa	positivo	leve	presente	0(0+0)	2(1+1)	5 (2+3)	5 (2+3)	2 (1+1)	neg	neg	4(2+2)	3(1+2)	0(0+0)
9601669	335111	84	masc	branco	cárdia	intestinal	serosa	positivo	leve	ausente	0(0+0)	0(0+0)	6 (3+3)	6 (2+4)	4 (2+2)	neg	neg	2(1+1)	4(2+2)	2(1+1)
9601818	335167	75	masc	branco	corpo	difuso	serosa	positivo	leve	presente	0(0+0)	0(0+0)	6 (3+3)	7(3+4)	5 (2+3)	posit	neg	5(2+3)	4(2+2)	2(1+1)
9601948	335285	53	masc	branco	cárdia	difuso	serosa	negativo	leve	presente	7(3+4)	0(0+0)	6 (3+3)	5(2+3)	6 (3+3)	neg	posit	5(2+3)	0(0+0)	2(1+1)
9601624	335350	64	fem	branco	corpo	difuso	serosa	negativo	intenso	ausente	4(2+2)	0(0+0)	7 (3+4)	5(2+3)	2 (1+1)	neg	neg	4(2+2)	4(2+2)	2(1+1)
9602539	335967	65	fem	branco	cárdia	difuso	serosa	negativo	intenso	presente	6(3+3)	0(0+0)	5 (2+3)	2(1+1)	3 (1+2)	neg	posit	2(1+1)	3(1+2)	2(1+1)
9602387	336096	42	masc	branco	antro	intestinal	serosa	negativo	leve	ausente	7(3+4)	0(0+0)	6 (3+3)	7(3+4)	2 (1+1)	neg	neg	4(2+2)	4(2+2)	2(1+1)
9601597	336253	57	masc	branco	antro	intestinal	serosa	positivo	leve	presente	7(3+4)	0(0+0)	5 (2+3)	5(2+3)	3 (1+2)	neg	neg	6(3+3)	3(1+2)	0(0+0)
9602202	336319	75	masc	branco	corpo	difuso	muscular	negativo	leve	presente	0(0+0)	0(0+0)	5 (2+3)	5(2+3)	3 (1+2)	posit	neg	4(1+3)	0(0+0)	4(2+2)
9602119	336410	37	masc	branco	antro	difuso	muscular	positivo	intenso	ausente	0(0+0)	2 (1+1)	5 (2+3)	6(3+3)	5 (2+3)	neg	neg	4(1+3)	0(0+0)	4(2+2)
9602660	336489	63	fem	branco	antro	intestinal	serosa	positivo	leve	ausente	3(1+2)	0(0+0)	5 (2+3)	3(1+2)	5 (2+3)	neg	neg	3(1+2)	3(1+2)	4(2+2)
9602957	336614	72	masc	branco	antro	intestinal	submucosa	positivo	moderado	ausente	0(0+0)	2(1+1)	4 (2+2)	2(1+1)	4 (2+2)	neg	neg	2(1+1)	0(0+0)	2(1+1)
9204788	336685	77	masc	branco	antro	intestinal	serosa	negativo	moderado	presente	4(2+2)	0(0+0)	5 (2+3)	4(2+2)	4 (2+2)	neg	neg	4(2+2)	0(0+0)	0(0+0)
9603039	337042	60	masc	branco	antro	intestinal	serosa	positivo	leve	presente	0(0+0)	0(0+0)	7 (3+4)	7(3+4)	7(3+4)	neg	neg	0(0+0)	0(0+0)	3(1+2)
9603326	337136	35	masc	branco	cárdia	difuso	serosa	negativo	leve	presente	7(3+4)	4(2+2)	7 (3+4)	7(3+4)	7 (3+4)	posit	posit	5(2+3)	0(0+0)	5(2+3)
9603273	337265	81	masc	branco	corpo	intestinal	serosa	negativo	leve	presente	2(1+1)	2(1+1)	3 (1+2)	2(1+1)	2(1+1)	neg	neg	0(0+0)	2(1+1)	0(0+0)
9680216	337522	25	fem	branco	corpo	difuso	mucosa	positivo	moderado	ausente	5(2+3)	0(0+0)	5 (2+3)	6(3+3)	5(2+3)	neg	neg	4(2+2)	5(2+3)	4(2+2)
9603244	337585	42	fem	amarelo	corpo	difuso	serosa	negativo	leve	ausente	0(0+0)	2(1+1)	6 (3+3)	7(3+4)	5(2+3)	neg	neg	5(2+3)	4(2+2)	6(3+3)
9602754	337593	55	masc	branco	antro	difuso	serosa	negativo	leve	ausente	7(3+4)	2(1+1)	7 (3+4)	7(3+4)	6 (3+3)	neg	neg	5(2+3)	4(3+1)	6(3+3)
9603484	337702	60	masc	negro	cárdia	difuso	serosa	negativo	leve	presente	7(3+4)	2(1+1)	5 (2+3)	7(3+4)	5 (2+3)	neg	neg	4(2+2)	0(0+0)	4(2+2)

RGH	AP	idade	sexo	raça	local	tipo histo	nível de infi	H. pylori	infiltr linfocim	metástases	p53	Bcl-2	Bcl-x	Bax	Bak	LMP1	EBER1	NOS1	NOS2	NOS3
9603633	337954	75	masc	branco	antro	intestinal	subserosa	positivo	leve	presente	7(3+4)	0(0+0)	5 (2+3)	6(3+3)	5 (2+3)	neg	neg	0(0+0)	0(0+0)	0(0+0)
9604020	338541	68	masc	branco	antro	difuso	serosa	positivo	leve	ausente	5(2+3)	2(1+1)	6 (3+3)	5(2+3)	5 (2+3)	neg	neg	6(3+3)	6(3+3)	5(2+3)
9604087	338619	78	masc	amarelo	corpo	difuso	serosa	negativo	moderado	presente	7(3+4)	4(2+2)	7 (3+4)	7(3+4)	6 (3+3)	posit	posit	6(3+3)	5(2+3)	6(3+3)
9604197	338962	74	fem	branco	antro	intestinal	serosa	positivo	leve	presente	5(2+3)	2(1+1)	7 (3+4)	7(3+4)	6 (3+3)	neg	neg	4(2+2)	0(0+0)	4(2+2)
9604389	339116	45	masc	amarelo	antro	difuso	subserosa	negativo	leve	presente	7(3+4)	0(0+0)	7 (3+4)	7(3+4)	6 (3+3)	neg	neg	6(3+3)	0(0+0)	4(2+2)
9604487	339230	72	masc	branco	antro	intestinal	serosa	positivo	moderado	presente	0(0+0)	0(0+0)	4 (2+2)	5(2+3)	2 (1+1)	neg	neg	6(3+3)	5(2+3)	0(0+0)
9604443	339231	68	masc	branco	antro	difuso	serosa	negativo	moderado	presente	5(2+3)	4(2+2)	6 (3+3)	7(3+4)	7 (3+4)	posit	neg	6(3+3)	4(2+2)	4(2+2)
9604114	339407	65	masc	branco	antro	difuso	serosa	negativo	intenso	presente	5(2+3)	0(0+0)	5 (2+3)	7(3+4)	3 (1+2)	posit	posit	4(2+2)	3(1+2)	0(0+0)
9604568	339695	76	masc	branco	corpo	intestinal	serosa	negativo	moderado	presente	7(3+4)	0(0+0)	6 (3+3)	5(2+3)	2 (1+1)	neg	neg	0(0+0)	5(3+2)	2(1+1)
9604766	339759	32	fem	branco	corpo	difuso	serosa	negativo	leve	ausente	5(2+3)	4(2+2)	7 (3+4)	8(4+4)	5 (2+3)	neg	neg	5(2+3)	5(3+2)	6(3+3)
9604328	340350	61	fem	branco	corpo	intestinal	serosa	negativo	moderado	ausente	0(0+0)	0(0+0)	5 (2+3)	6(2+4)	2 (1+1)	posit	posit	3(1+2)	0(0+0)	0(0+0)
9605498	341068	77	fem	branco	antro	difuso	serosa	positivo	moderado	presente	0(0+0)	0(0+0)	5 (2+3)	7(3+4)	2 (1+1)	neg	neg	4(2+2)	0(0+0)	2(1+1)
9605357	341434	51	fem	amarelo	antro	intestinal	mucosa	negativo	leve	ausente	0(0+0)	0(0+0)	5 (2+3)	2(1+1)	2 (1+1)	neg	neg	0(0+0)	0(0+0)	0(0+0)
9700214	341975	67	fem	branco	cárdia	intestinal	serosa	positivo	leve	presente	7(3+4)	0(0+0)	4 (2+2)	4(1+3)	5 (2+3)	neg	neg	4(2+2)	3(1+2)	4(2+2)
9605524	341977	51	fem	branco	cárdia	difuso	serosa	negativo	intenso	presente	5(2+3)	0(0+0)	5 (2+3)	5(2+3)	4 (2+2)	neg	neg	5(3+2)	3(1+2)	4(2+2)
9700491	9700189	64	fem	branco	antro	intestinal	serosa	negativo	leve	presente	7(3+4)	0(0+0)	5 (2+3)	6(3+3)	4 (2+2)	neg	neg	3(1+2)	4(2+2)	0(0+0)
9605534	9700710	73	fem	branco	antro	intestinal	serosa	positivo	leve	presente	4(2+2)	0(0+0)	5 (2+3)	3(1+2)	3 (1+2)	neg	neg	2(1+1)	0(0+0)	0(0+0)
9700602	9700905	64	masc	negro	cárdia	intestinal	muscular	positivo	moderado	ausente	7(3+4)	0(0+0)	4 (2+2)	3(1+2)	0 (0+0)	neg	neg	0(0+0)	0(0+0)	0(0+0)
9700694	9701045	58	masc	branco	antro	intestinal	serosa	negativo	leve	presente	6(3+3)	0(0+0)	5 (2+3)	3(1+2)	4 (2+2)	neg	neg	0(0+0)	0(0+0)	4(2+2)
9701048	9701460	71	fem	amarelo	cárdia	intestinal	serosa	negativo	moderado	presente	7(3+4)	0(0+0)	4 (2+2)	4(2+2)	2 (1+1)	neg	neg	4(1+3)	0(0+0)	2(1+1)
9602237	9702114	75	fem	amarelo	antro	intestinal	mucosa	negativo	leve	ausente	0(0+0)	0(0+0)	4 (2+2)	3(1+2)	2 (1+1)	neg	neg	5(2+3)	3(1+2)	2(1+1)
9701628	9702685	59	masc	branco	cárdia	intestinal	serosa	negativo	moderado	ausente	0(0+0)	4(2+2)	5 (2+3)	5(2+3)	4 (2+2)	posit	neg	4(2+2)	3(1+2)	4(2+2)
9701704	9702882	31	masc	branco	antro	intestinal	subserosa	negativo	moderado	ausente	0(0+0)	0(0+0)	4 (2+2)	5(2+3)	4 (2+2)	neg	neg	4(1+3)	4(2+2)	2(1+1)
9701891	9703114	38	masc	amarelo	corpo	intestinal	muscular	negativo	moderado	ausente	7(3+4)	2(1+1)	5 (2+3)	6(2+4)	5 (2+3)	neg	neg	4(1+3)	5(2+3)	4(2+2)
9701775	9703254	50	masc	branco	antro	difuso	serosa	negativo	leve	presente	7(3+4)	0(0+0)	6 (3+3)	7(3+4)	5 (2+3)	neg	neg	5(2+3)	4(2+2)	4(2+2)
9702073	9703710	69	masc	amarelo	antro	intestinal	submucosa	negativo	leve	ausente	6(3+3)	0(0+0)	6 (3+3)	6(3+3)	3 (1+2)	neg	neg	3(1+2)	0(0+0)	6(3+3)
9702085	9703985	73	fem	amarelo	antro	intestinal	mucosa	positivo	leve	ausente	0(0+0)	2(1+1)	4 (2+2)	5(2+3)	3 (1+2)	neg	neg	0(0+0)	0(0+0)	0(0+0)
9780166	9704071	70	masc	branco	cárdia	intestinal	serosa	negativo	leve	presente	0(0+0)	2(1+1)	6 (3+3)	8(4+4)	5 (2+3)	neg	neg	4(2+2)	5(2+3)	4(2+2)
9702629	9704723	73	masc	branco	antro	difuso	submucosa	negativo	moderado	ausente	0(0+0)	0(0+0)	4 (2+2)	5(2+3)	2 (1+1)	neg	neg	0(0+0)	0(0+0)	0(0+0)
9702992	9705265	47	fem	branco	corpo	difuso	serosa	negativo	moderado	presente	0(0+0)	2(1+1)	5 (2+3)	2(1+1)	6 (3+3)	neg	neg	3(1+2)	0(0+0)	2(1+1)
9702925	9705340	43	masc	branco	antro	intestinal	serosa	positivo	leve	presente	7(3+4)	4(2+2)	6 (3+3)	7(3+4)	6 (3+3)	neg	neg	3(1+2)	5(2+3)	4(2+2)
9703245	9705794	73	masc	branco	cárdia	intestinal	muscular	positivo	moderado	presente	6(2+4)	0(0+0)	7 (3+4)	5(2+3)	5 (2+3)	neh	neg	5(2+3)	0(0+0)	2(1+1)

RGH	AP	idade	sexo	raça	local	tipo histol	nível de infi	H. pylori	infil. linfocit	metástases	p53	Bcl-2	Bcl-x	Bax	Bak	LMP1	EBER1	NOS1	NOS2	NOS3
9703490	9705896	34	fem	branco	corpo	difuso	serosa	negativo	leve	ausente	6(3+3)	4(2+2)	7 (3+4)	7(3+4)	7 (3+4)	posit	neg	5(2+3)	3(1+2)	4(2+2)
9703402	9706008	28	masc	branco	cárdia	difuso	subserosa	negativo	leve	ausente	5(2+3)	2(1+1)	7 (3+4)	7(3+4)	4 (2+2)	neg	neg	4(2+2)	0(0+0)	0(0+0)
9703398	9706109	66	masc	branco	antro	intestinal	subserosa	positivo	moderado	presente	5(2+3)	4(2+2)	5 (2+3)	5(2+3)	5 (2+3)	neg	neg	6(3+3)	0(0+0)	4(2+2)
9703396	9706389	56	masc	branco	corpo	difuso	muscular	negativo	moderado	presente	5(2+3)	2(1+1)	6 (3+3)	5(2+3)	5 (2+3)	neg	neg	5(2+3)	0(0+0)	5(2+3)
8600097	9706499	67	masc	branco	cárdia	intestinal	submucosa	negativo	moderado	ausente	7(3+4)	5 (2+3)	6 (3+3)	7(3+4)	6 (3+3)	posit	neg	5(2+3)	0(0+0)	5(2+3)
9703710	9707329	76	fem	amarelo	antro	intestinal	serosa	negativo	leve	presente	0(0+0)	4 (2+2)	6 (3+3)	5(2+3)	6 (3+3)	neg	neg	5(2+3)	5(2+3)	4(2+2)
9703821	9707523	75	masc	branco	antro	difuso	muscular	negativo	moderado	ausente	0(0+0)	4(2+2)	7 (3+4)	7(3+4)	6 (3+3)	posit	neg	6(3+3)	0(0+0)	6(3+3)
9704401	9707715	74	fem	branco	corpo	intestinal	subserosa	positivo	leve	ausente	6(3+3)	2 (1+1)	7 (3+4)	6(3+3)	5 (2+3)	neg	neg	5(2+3)	3(1+2)	4(2+2)
9704387	9708035	43	masc	branco	corpo	difuso	subserosa	negativo	leve	ausente	0(0+0)	4 (2+2)	7 (3+4)	7(3+4)	5 (2+3)	neg	neg	5(2+3)	0(0+0)	6(3+3)
9704741	9708460	73	fem	branco	corpo	intestinal	serosa	negativo	leve	ausente	4(2+2)	2 (1+1)	5 (2+3)	6(3+3)	5 (2+3)	neg	neg	4(2+2)	3(1+2)	4(2+2)
9704746	9708528	50	masc	amarelo	corpo	intestinal	serosa	positivo	leve	presente	5(2+3)	4 (2+2)	5 (2+3)	7(3+4)	5 (2+3)	neg	neg	4(2+2)	3(1+2)	4(2+2)
9704847	9708543	52	masc	branco	cárdia	intestinal	serosa	positivo	moderado	presente	0(0+0)	3 (1+2)	6 (3+3)	6(3+3)	5 (2+3)	neg	neg	4(2+2)	0(0+0)	2(1+1)
9704953	9708658	59	masc	branco	antro	intestinal	mucosa	negativo	leve	ausente	0(0+0)	2 (1+1)	4 (2+2)	6(3+3)	2 (1+1)	neg	neg	4(2+2)	0(0+0)	2(1+1)
9704580	9708709	63	masc	branco	antro	difuso	serosa	negativo	leve	presente	0(0+0)	4(2+2)	7 (3+4)	7(3+4)	7 (3+4)	posit	neg	6(3+3)	5(2+3)	6(3+3)
9704876	9800047	72	fem	branco	antro	intestinal	mucosa	negativo	leve	ausente	6(3+3)	2 (1+1)	5 (2+3)	5(2+3)	3 (1+2)	neg	neg	0(0+0)	0(0+0)	0(0+0)
9800114	9800316	68	masc	branco	cárdia	intestinal	serosa	negativo	moderado	presente	7(3+4)	4 (2+2)	6 (3+3)	5(2+3)	5 (2+3)	neg	neg	5(2+3)	0(0+0)	3(1+2)
9800204	9800653	57	fem	amarelo	cárdia	intestinal	submucosa	negativo	leve	ausente	6(3+3)	2 (1+1)	5 (2+3)	6(3+3)	4 (2+2)	neg	neg	4(2+2)	3(1+2)	4(2+2)
9704600	9800724	67	masc	branco	antro	difuso	serosa	negativo	moderado	presente	0(0+0)	2 (1+1)	6 (3+3)	5(2+3)	5 (2+3)	neg	neg	5(2+3)	4(2+2)	4(2+2)
9800411	9800922	71	masc	branco	corpo	difuso	serosa	negativo	moderado	ausente	2(1+1)	2 (1+1)	6 (3+3)	5(2+3)	4 (2+2)	neg	posit	5(2+3)	0(0+0)	2(1+1)
9800566	9801041	62	fem	branco	antro	difuso	mucosa	negativo	leve	ausente	0(0+0)	0(0+0)	4 (2+2)	2(1+1)	4 (2+2)	neg	neg	3(1+2)	4(2+2)	0(0+0)
9800488	9801042	67	fem	branco	antro	difuso	muscular	negativo	leve	presente	0(0+0)	0(0+0)	7 (3+4)	5(2+3)	4 (2+2)	neg	neg	2(1+1)	0(0+0)	0(0+0)
9704748	9801127	50	masc	branco	antro	difuso	submucosa	positivo	leve	ausente	2(1+1)	0(0+0)	3 (1+2)	2(1+1)	4 (2+2)	neg	neg	0(0+0)	0(0+0)	0(0+0)
9800375	9801563	73	masc	branco	cárdia	intestinal	subserosa	negativo	leve	ausente	0(0+0)	2 (1+1)	5 (2+3)	5(2+3)	5 (2+3)	neg	neg	2(1+1)	0(0+0)	0(0+0)
9800921	9801948	56	masc	amarelo	antro	difuso	serosa	positivo	leve	presente	5(2+3)	0(0+0)	5 (2+3)	5(2+3)	5 (2+3)	neg	neg	4(2+2)	0(0+0)	0(0+0)
9800490	9801950	62	masc	branco	corpo	intestinal	serosa	negativo	moderado	ausente	0(0+0)	0(0+0)	5 (2+3)	4(1+3)	2 (1+1)	neg	neg	2(1+1)	0(0+0)	0(0+0)
9300345	9802243	73	masc	branco	corpo	intestinal	serosa	positivo	leve	presente	0(0+0)	0(0+0)	5 (2+3)	5(2+3)	5 (2+3)	neg	neg	0(0+0)	0(0+0)	0(0+0)
9801475	9802959	72	masc	branco	cárdia	difuso	serosa	negativo	leve	presente	5(2+3)	0(0+0)	6 (3+3)	6(2+4)	6 (3+3)	neg	neg	6(3+3)	0(0+0)	0(0+0)
9801869	9803674	50	masc	branco	antro	intestinal	serosa	negativo	leve	presente	0(0+0)	0(0+0)	6 (3+3)	5(2+3)	5 (2+3)	neg	neg	3(1+2)	0(0+0)	0(0+0)
9801556	9803676	78	fem	branco	corpo	intestinal	muscular	negativo	leve	presente	0(0+0)	0(0+0)	5 (2+3)	4(2+2)	2 (1+1)	neg	neg	4(2+2)	0(0+0)	0(0+0)
9801994	9803688	67	masc	branco	antro	intestinal	serosa	negativo	leve	presente	4(2+2)	0(0+0)	5 (2+3)	5(2+3)	2 (1+1)	neg	neg	4(1+3)	0(0+0)	0(0+0)
9801934	9803750	56	fem	branco	antro	difuso	muscular	negativo	moderado	presente	5(2+3)	0(0+0)	4 (2+2)	2(1+1)	2 (1+1)	neg	neg	2(1+1)	0(0+0)	0(0+0)
9801793	9804051	63	masc	branco	antro	difuso	serosa	positivo	moderado	presente	7(3+4)	4(2+2)	7 (3+4)	7(3+4)	4 (2+2)	neg	neg	5(2+3)	5(2+3)	5(2+3)

RGH	AP	idade	sexo	raça	local	tipo histol	nível de infil	H. pylori	infil linfocit	metástases	p53	Bcl-2	Bcl-x	Bax	Bak	LMP1	EBER1	NOS1	NOS2	NOS3
9704387	9804241	44	masc	branco	cárdia	difuso	serosa	negativo	leve	ausente	0(0+0)	4 (2+2)	5 (2+3)	5(2+3)	3 (1+2)	neg	neg	4(2+2)	2(1+1)	2(1+1)
9802294	9804354	33	fem	branco	antro	difuso	muscular	negativo	leve	ausente	4(2+2)	3(1+2)	6 (3+3)	4(2+2)	4 (2+2)	neg	neg	3(1+2)	3(1+2)	3(1+2)
9802381	9804631	72	fem	branco	cárdia	difuso	serosa	negativo	moderado	presente	0(0+0)	0(0+0)	5 (2+3)	5(2+3)	5 (2+3)	neg	neg	4(2+2)	3(1+2)	3(1+2)
9802300	9804729	60	masc	branco	antro	difuso	serosa	negativo	leve	presente	3(1+2)	0(0+0)	4 (2+2)	5(2+3)	4 (2+2)	neg	neg	4(2+2)	0(0+0)	0(0+0)
9203748	9804747	60	masc	branco	cárdia	difuso	muscular	positivo	intenso	ausente	0(0+0)	0(0+0)	6 (3+3)	6(3+3)	2 (1+1)	neg	posit	2(1+1)	0(0+0)	0(0+0)
9802486	9805104	76	masc	branco	cárdia	intestinal	submucosa	negativo	leve	presente	6(3+3)	0(0+0)	5 (2+3)	6(3+3)	2 (1+1)	neg	neg	4(2+2)	3(1+2)	3(1+2)
9802302	9805117	68	masc	branco	antro	difuso	serosa	negativo	leve	presente	0(0+0)	3 (1+2)	7 (3+4)	6(3+3)	3 (1+2)	neg	neg	4(2+2)	3(1+2)	3(1+2)
9802395	9805163	38	masc	branco	cárdia	intestinal	serosa	negativo	leve	presente	0(0+0)	3 (1+2)	5 (2+3)	4(2+2)	5 (2+3)	neg	neg	0(0+0)	3(1+2)	3(1+2)
9802527	9805366	57	masc	branco	cárdia	difuso	serosa	negativo	intenso	presente	0(0+0)	0(0+0)	4 (2+2)	5(2+3)	3 (1+2)	posit	posit	4(2+2)	0(0+0)	0(0+0)
9802930	9805468	45	masc	branco	antro	intestinal	submucosa	positivo	leve	ausente	7(3+4)	0(0+0)	4 (2+2)	3(1+2)	2 (1+1)	neg	neg	5(2+3)	0(0+0)	0(0+0)
9803180	9805973	55	masc	branco	antro	intestinal	subserosa	positivo	leve	presente	6(3+3)	0(0+0)	2 (1+1)	4(1+3)	1 (1+0)	neg	neg	4(2+2)	0(0+0)	0(0+0)
9803407	9806080	42	fem	amarelo	antro	difuso	serosa	negativo	moderado	presente	7(3+4)	0(0+0)	2 (1+1)	4(1+3)	0 (0+0)	neg	neg	5(2+3)	0(0+0)	0(0+0)
9603481	9806170	61	masc	branco	antro	difuso	mucosa	negativo	leve	presente	4(2+2)	0(0+0)	2 (1+1)	4(2+2)	0 (0+0)	neg	neg	4(2+2)	0(0+0)	0(0+0)
9880097	9806476	65	masc	amarelo	antro	difuso	serosa	positivo	leve	presente	5(2+3)	0(0+0)	4 (2+2)	5(2+3)	0 (0+0)	neg	neg	5(2+3)	0(0+0)	0(0+0)
9803599	9806881	69	masc	branco	cárdia	intestinal	muscular	negativo	leve	presente	5(2+3)	0(0+0)	5 (2+3)	2(1+1)	4 (2+2)	neg	neg	5(2+3)	0(0+0)	0(0+0)
9803712	9807139	78	masc	amarelo	antro	difuso	serosa	negativo	leve	presente	2(1+1)	0(0+0)	4 (2+2)	6(3+3)	4 (2+2)	neg	neg	3(1+2)	3(1+2)	3(1+2)
9403103	9807189	60	fem	branco	antro	intestinal	submucosa	positivo	leve	ausente	0(0+0)	2(1+1)	2 (1+1)	6(3+3)	5 (2+3)	neg	neg	4(2+2)	2(1+1)	2(1+1)
9804329	9807759	43	fem	branco	antro	difuso	serosa	negativo	leve	presente	5(2+3)	4(2+2)	6 (3+3)	6(3+3)	6 (3+3)	neg	neg	3(1+2)	4(2+2)	4(2+2)
9805738	9809124	55	masc	branco	antro	intestinal	muscular	negativo	leve	ausente	0(0+0)	2(1+1)	5 (2+3)	5(2+3)	5 (2+3)	neg	neg	4(2+2)	4(2+2)	4(2+2)
9805221	9809487	64	masc	amarelo	corpo	intestinal	subserosa	negativo	leve	presente	0(0+0)	0(0+0)	5 (2+3)	5(2+3)	5 (2+3)	neg	neg	3(1+2)	0(0+0)	0(0+0)
9805185	9809552	74	fem	branco	corpo	difuso	serosa	negativo	leve	presente	0(0+0)	2(1+1)	5 (2+3)	5(2+3)	5 (2+3)	neg	neg	4(2+2)	4(2+2)	4(2+2)
9805371	9809762	50	masc	branco	corpo	intestinal	serosa	positivo	moderado	presente	0(0+0)	0(0+0)	5 (2+3)	2(1+1)	5 (2+3)	neg	neg	5(2+3)	3(1+2)	3(1+2)

Maria Dirlei F S Begnami – André L Montagnini – Sueli Nonogaki –
Fernando A Soares

**Proteins related to apoptosis (p53, Bak, Bax, Bcl-2, Bcl-x) and
nitric oxide synthases expression in Gastric Carcinomas
Epstein-Barr Virus positive**

M D Begnami – F A Soares

Department of Anatomic Pathology and surgical

Medical and Research Center Hospital do Câncer A C Camargo.

Rua Prof Antonio Prudente 211

Liberdade - São Paulo (SP), Brazil

e-mail: mariadirlei@hotmail.com

Phone/Fax: +55.11.32725195

A L Montagnini

Department of Abdominal Surgery

Medical and Research Center Hospital do Câncer A C Camargo.

Rua Prof Antonio Prudente 211

Liberdade - São Paulo (SP), Brazil

Phone/Fax: +55.11.32725000

S Nonogaki

Institute Ludwig of Research

Rua Prof Antonio Prudente 211

Liberdade - São Paulo (SP), Brazil

Phone/Fax: +55.11.32725000



Abstract

Epstein-Barr virus (EBV) is directly implicated in the pathogenesis of a variety of undifferentiated carcinomas, including a subset of gastric carcinomas. EBV and its associated proteins may be protective against the occurrence of apoptosis in infected cells, contributing to inhibit cancer development and progression. Alternatively, the viral infection may cause altered or mutated expression of oncogenes or tumor development, an action that may also involve apoptosis. Also, the production of nitric oxide can induce apoptosis. In this study, 118 cases of gastric carcinomas were evaluated for the presence of EBV, by sensitive in situ hybridization assay targeting Epstein-Barr virus-encoded RNA1 (EBER1) transcripts, and by immunohistochemistry with antibody against latent membrane protein-1 (LMP-1). Other apoptosis related-proteins expression included proteins of the bcl-2 family (Bcl-2, Bcl-x, Bax and Bak), p53 and nitric oxide synthases isoforms were performed. EBV was detected in 9 of 118 (7%) of cases. There were no differences between the cases EBV-positive and EBV-negative cases, except the expression of Bak, which was significantly lower in EBV-related gastric cancer. In conclusion, neither apoptosis-related proteins nor nitric oxide synthases isoforms, but Bak protein, appear to be consistently associated with the presence of EBV in gastric carcinomas.

Keywords: gastric carcinoma, EBV, apoptosis, Bcl-2, Bcl-x, Bak, Bax, p53, NOS

INTRODUCTION

Cancer of the stomach is one of the most frequent types of cancer worldwide, although its incidence has gradually declined in recent years [38]. In Brazil, gastric cancer remains a prevalent neoplasm with high mortality, ranked as the third highest cause of cancer-related deaths [38]. Non-genetic factors play significant role in the tumor development. Among them, dietary factors are important, especially a high- salt diet and smoked- salted food. In addition, infectious agents, such as *Helicobacter pylori* and Epstein Barr virus (EBV), have been implicated in gastric cancer development [3,13,41,51,61].

EBV is a ubiquitous herpesvirus that infects and establishes a persistent infection in the host. The EBV is the causative agent of infectious mononucleosis in adults and adolescents. It infects oropharyngeal epithelial cells, replicates in them, and subsequently spreads to the mucosal lymphocytes. It is believed that the tissue reservoirs of EBV are epithelial cells and lymphocytes. EBV is closely related to Burkitt's lymphoma, nasopharyngeal carcinoma, and opportunistic B-cell lymphoma in immunocompromised hosts such as patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) or the recipients of organ transplants. EBV may also be related to the pathogenesis of Hodgkin's disease, peripheral T- cell lymphoma, and nasal T/NK- cell lymphoma.

EBV has been detected in several carcinomas including primary tumors of the salivary glands, middle ear, sinonasal tract, thymus, esophagus, lung, stomach, breast, biliary tract, and uterine cervix [41,50]. Detection rates of EBV in gastric carcinomas have varied in different studies from 4% to 18% [18,44,59,65]. EBV-associated gastric cancer was characterized by male predominance, preferential location in the upper and middle parts of the stomach, and a high prevalence in gastric remnant cancer [18,35,59]. Although EBV may be observed in all histological types, usually these cases are morphologically characterized by undifferentiated carcinoma with intense lymphoid stroma [18,59].

Fundação Antonio Prudente
Ana Maria Rodrigues Alves Kuninari
Coordenadora Pós-Graduação

Apoptosis is a biologic phenomenon of critical importance in the regulations in a number of physiologic and pathologic situations, such as cancer development. Among the genes that regulate apoptosis are the members of the *bcl-2* family. Superexpression of *bcl-2* gene delays normal cell turnover caused by apoptosis. The Bcl-2 protein functions through its interactions with other proteins, including several homologous proteins that constitute the Bcl-2 protein family. Some of the proteins of the family have protective effect against cell death, as Mcl-1 and Bcl-x proteins, whereas others are promoters of cell death, as Bax and Bak proteins. Expression of Bcl-2 protein family in stomach cancer cells are frequent and may differ according the histological type [26].

There are few studies that compare the relationship between the presence of EBV in gastric carcinomas with expression of apoptosis-related proteins [12,45]. Recent studies have demonstrated that EBV+ gastric tumors are associated with a reduction in the number of apoptotic tumor cells, probably secondary to activation the system FAS/FAS-ligand, which aloud cancer cells to evade evasion from intense immune response present in the EBV-related carcinoma [27,45]. Other studies reported no correlation between numbers of apoptotic cells and EBV infection [19].

TP-53 is a tumor suppressor gene with important regulatory function in the cell, and it is inactivated by mutation or viral oncogenes in several human tumors. Many viral proteins of DNA oncogenic viruses interact with p53 protein to modulated host cell function according to the need of the virus. The expression of p53 protein in gastric carcinomas is quite variable. Overall, p53 protein is overexpressed in 40% to 60% of cases [8,17,49], and the mutation is detected in 20 to 50% [34]. Ishii *et al* [19] and Leung *et al* [31] have shown that EBV-related gastric cancers present p53 protein overexpression inhibited, resulting in an inhibition of apoptosis. Similarly, the expression of p53 protein in EBV-related gastric cancer is unusual in deeply invasive tumors when compared with the frequency in EBV-negative gastric cancer, but this difference is not observed in superficial tumors [43].

Other papers have not shown the differentiated expression of p53 protein in EBV-related and EBV-negative gastric cancer [45].

Nitric oxide (NO) is an important bioactive agent and signaling molecule that mediates a diverse array of actions such as vasodilatation, neurotransmission, and iron metabolism [33,39]. NO is catalytically produced by different NO synthase (NOS) isoforms in a reaction involving L-arginine to form NO and citrulline. There are two groups of NOS isoforms, constitutive and inducible. The inducible isoform is characteristic upon immunoactivation of inflammatory cells, and it is designed as iNOS or NOS-2. There are two isoforms of constitutive NOS, neuronal NOS (NOS-1) and endothelial NOS (NOS-3). NO has been found with a dual role in cancer with positive and negative effects in tumor development and progression. NO acts as carcinogen and stimulates angiogenesis. Also, low concentrations of NO can protect tumor cells against apoptotic death [4]. Alternatively, high concentration of NO can induce tumor cell death [40]. Other anti-tumor effect is the fact of NO production in human tumors causes DNA damage and triggers p53-mediated growth arrest and apoptosis. As a result, NO production would contribute to human cancer progression by selection against wild-type p53 and for mutant p53 cells [1,47].

Recent studies have examined the expression and activity of three NOS isoforms in human cancer [25]. An increased level of NOS expression and/ or activity was observed in human gynecological [57], breast [58], central nervous system [6] and stomach tumors [1]. In stomach carcinoma, few papers have addressed the issue, and most of them shows an increased activity and expression of NOS in tumor tissue when compared with normal gastric mucosa [24,48,53]. Goto *et al* [10] showed an increased expression of iNOS and nitrotyrosine in non-neoplastic gastric mucosa in patients were later found to give gastric carcinoma at least two years after the biopsy when compared with a group of patients that have no evidence of cancer development in a long follow-up. NOS expression is higher in poorly differentiated gastric carcinomas when compared with well

differentiated and moderately differentiated adenocarcinomas [24]. Another interesting relationship is the fact of high levels of NO trigger p53 protein accumulation [1,2]. Rajkanova *et al* [47] showed that tumor-associated NO production in human gastric cancer may promote gastric cancer progression by providing a selective growth advantage to tumor cells with non-functioning p53 protein accumulation. The relationship between NOS expression and EBV-related gastric cancer has never been investigated.

In the presented study, we thus compared Bcl-2 family apoptosis proteins (Bcl-2, Bcl-x, Bax and Bak), p53 protein and NOS isoforms (NOS1, NOS2, NOS3) immunoexpression between EBV-related and EBV-free gastric carcinomas.

Materials and methods

A total of 118 cases of gastric carcinomas operated on at Hospital do Câncer AC Camargo from 1986 to 1988, which were selected from the files of the Department of Anatomic Pathology. The cases were reviewed, and representative formalin- fixed, paraffin- embedded blocks from the tumor and non-neoplastic gastric mucosa were selected.

Clinicopathological findings obtained from surgical records and pathology reports were patient age and gender; the location, size, macroscopic type, level of invasion and lymph node involvement.

New paraffin sections were stained with haematoxylin and eosin, and they were assessed independently by two pathologists (MDBFS & FAS). Histologic types were classified into two major categories as intestinal or diffuse, using Lauren's classification [29]. The tumors were divided in deeply invasive (invasion of the muscularis propria, subserosa or deeper) and superficial carcinomas (invasion of mucosa and submucosa). The amount of lymphoid infiltrate was graded as nil/ minimal, mild, moderate or intense, and for statistical purpose, the data was condensed in two categories by combining minimal and mild or moderate and intense. The presence and absence of *H. pylori* infection was determined histologically using Giemsa stained sections of the non- neoplastic mucosa.

Immunohistochemistry was performed using the standard streptavidin- biotin- peroxidase method. The staining was done on paraffin sections using microwave antigen retrieval techniques (95° C for 30 min in citrate buffer pH 6.0) for all antibodies. Sections were incubated with antibodies against p53 (DO-7, 1:100, Dako, Copenhagen, Denmark), Bcl-2 (124, 1:50, Dako, Copenhagen, Denmark), Bax (bax, 1:50, Dako, Copenhagen, Denmark), Bcl-xl (bcl-x, 1:50, Dako, Copenhagen, Denmark), Bak (bak, 1:400, Dako, Copenhagen, Denmark), LMP-1 (CS1-4, 1:300, Dako, Copenhagen, Denmark), NOS1 (nNOS, 1:200, Transduction Laboratories, USA), NOS2 (iNOS, 1:40, Transduction Laboratories, USA), NOS3 (eNOS, 1:50, Transduction Laboratories, USA) at 4° C overnight. After

reacting them with biotinylated secondary anti-mouse antibodies, the antigen- antibody reactions were visualized using streptavidin-horseradish peroxidase conjugate (Dako LSAB Kit, Los Angeles, CA). The peroxidase activity was localized by 0,05% 3,3'-diaminobenzidine and 0,03% hydrogen peroxide in Tris- buffered saline. The slides were counterstained with Mayer's hematoxylin.

Infection with EBV was screened with EBER in situ hybridization on paraffin sections in each case, with a fluorescein-conjugated oligonucleotide probe for EBER (Novocastra, Newcastle- Upon- Tyne, U.K.). Briefly, the 4- μ m paraffin sections were first deparaffinized and rehydrated, followed by digestion with proteinase K (Sigma, St. Louis, MO) for 15 minutes at 37° C. After washing and dehydration, the FITC- conjugated probe was applied and hybridized for overnight at 37° C. The hybridization was further detected by rabbit anti- FITC antibody conjugated with alkaline phosphate (Novocastra) for 30 minutes at room temperature. The slides were counterstained with a light Mayer's haematoxylin. A positive signal was recognized as intense dark-brown nuclear staining under a light microscope.

Samples were rated according to a score which was calculated by adding the intensity of the stain to the area of the stain (score = intensity + area). The intensity of staining has the following scale; 0, no staining of tumor cells; 1+, mild staining; 2+, moderate staining; 3+, strong staining. The area of staining was evaluated using the following scale: 0, no staining of tumor cells in any field; 1+, < 25% of tumor cells stain positive; 2+, 25 – 50% stain positive; 3+, 50 – 75% stain positive; 4+, > 75% stain positive. The maximum score after adding was 7 and the minimum 0. For statistical analysis, tumors were classified as negative (score 0-3) or positive (score 4- 7).

The results were statistically analyzed using the Chi- square test and Fisher's exact test. The differences with the *p* values smaller than 0.05 were considered to be significant. All statistical analyses were conducted using the SPSS 10.0 statistical software program (SPSS Inc, Chicago,IL).



Results

EBER1 transcripts were detected by in situ hybridization in 9 of 118 specimens of gastric carcinomas (7%). In these 9 cases, EBER1 was localized to virtually all of the malignant epithelial cells but was not found in normal epithelium (figure 1A).

Clinicopathological data of EBER1-related and -negative tumors are shown in Table 1. There was no difference in the age between the two groups. Patients with EBV-related tumors range between 35-78, mean 60.5 years-old and 25-84, mean 61.2 years-old in the EBV-negative group. Both groups showed male predominance with similar male/female ratio of 3:1. The EBV-related tumors were preferentially located in the cardiac region when compared with EBV-negative cases; Five out nine (55%) EBER1-positive tumours were located in cardiac region compared with 21 (20%) of the 109 EBER1-negative tumours. There were no superficial tumors in all 9 of the EBER1-positive carcinomas. However, most of the EBER1-negative carcinomas were also deeply invasive tumors, so there was no statistically significant difference between the two groups in relation to tumour level ($p=0.18$). Regarding the histological type all cases but one (88%) of 9 EBER1-positive tumors were characterized diffuse growth patterns, while only 46 (42%) of 109 EBER1-negative showed the same pattern, resulting in a strong association between histological type and EBV-related gastric carcinomas ($p=0.008$). Another histological parameter that correlated with EBER1 expression was the proportion of tumor-infiltrating lymphocytes. Seven (78%) of nine EBER1-positive tumors were accompanied by marked lymphoid stroma that were evenly distributed with the malignant epithelial cells ($p=0.006$). Lymphoid stroma was also observed in EBV-negative tumors (Figure 1B), but in a significantly small percentage (31%). There was no statistically significant difference between the two groups in relation to lymph node status. Metastasis in lymph node were in 6 (66%) of 9 EBER1-positive tumors and in 64 (59%) of 109 EBER1-negative ($p=0.46$).

The presence of *H. pylori* infection was detected in only 1 (12%) of 9 EBER1- positive tumors and 37 (34%) of 109 EBER1- negative. The results showed no differences between the two groups in relation to *H. pylori* histological detection ($P= 0.12$)

Table 2 lists the results of the paraffin immunostains in relation to other clinicopathological features of the EBV- associated carcinomas.

EBV LMP1 protein was detected in 5 cases of EBER-1 positive (Figure 1C) gastric carcinoma. In those tumors, LMP1 was expressed in single cells of the tumor and was weak in intensity compared to the control tissue, an EBV-associated Hodgkin's disease (Figure 1D).

The comparative results between cases EBV-related and EBV negative in relationship to apoptosis-related proteins, p53 protein and NOS isoforms are shown in Table 2. The only marker where that showed a significant statistically difference was Bak protein, which were less expressed in EBV-related gastric carcinomas. There were no differences between the groups when we analyzed the expression of p53, Bcl-2, Bcl-x, Bax, NOS1, NOS2, and NOS3 proteins.

Discussion

In the present study 118 cases of gastric carcinomas were analyzed for the presence of EBV. In this set of gastric carcinomas (GC), 7% were EBV related, as defined by in situ hybridization to EBER transcripts, a method that is considered the gold standard for defining EBV associated tumours. The EBV incorporation rate in gastric carcinomas has been variously reported as 2% to 16% [12,15,18,65]. Our result was similar to the percentage reported by Takano et al [56] and Kijima et al [23] 6.4% and 7.3% respectively. In all the EBV- associated carcinomas, the virus was detected in the neoplastic cells but not in the normal gastric epithelium or in those areas with intestinal metaplasia. Similar to the results of Shibata and Weiss [51] and Leoncini et al [30], we had not found EBV-positive lymphoid cell in all cases. EBV associated gastric carcinomas often were accompany

relatively strong lymphocyte infiltration. There is growing evidence that extensive lymphocyte infiltration is a consistent characteristic of EBER1 positive carcinomas and correlates with less aggressive behavior [36]. The striking lymphoid reaction in EBER1- positive carcinomas reflects the occurrence of specific cytotoxic immune response and might be triggered by certain viral antigens or cellular proteins in carcinoma cells [28]. EBV infection persists over decades, evading attempts by the immune system to eradicate it. Normal individuals live in symbiosis with the virus by mounting an effective defence against EBV driven cell proliferation through the response of CD8 positive T cells [28]. The T cells of individuals with EBV associated gastric cancer are able to cause regression of proliferating foci of exogenously infected autologous B cells [18].

It remains controversial whether there is a significant clinicopathologic difference between EBER1- positive and – negative GC. Earlier reports showed that EBV- associated GC was characterized by male predominance, preferential location in proximal stomach, and a high prevalence of the diffuse subtype [51,59]. In our series, age, male- to- female ratio, depth of invasion and lymph node metastasis were not different between EBV- positive and – negative GC. The association between localization of the tumor and histological subtype and the EBV status was further defined by the present results. EBER1- positive GC showed predominance of cardia localization and diffuse subtype in contrast with Takada [54] that showed no difference in EBV prevalence between intestinal and diffuse types of carcinoma. The preferential localization of the EBV- associated gastric carcinoma may be explained by the infection route. Although the exact mechanism remains unknown, it was assumed that the infection of gastric epithelium occurred through contiguous spread from the nasopharynx. However, the underlying pathogenetic factors are still unknown. Moreover, it seems likely that the two types of gastric carcinomas involve different genetic pathways since multiple gene alterations appear to differ between the two histological types.

Currently, chronic atrophic gastritis and subsequent intestinal metaplasia are thought to play a pivotal role in multistep carcinogenesis of GC. In recent years, abundant data have documented that chronic gastritis caused by *H.*

pylori infection may progress to intestinal metaplasia and gastric carcinoma. In contrast to EBV- associated GC, *H. pylori* infection is linked to all histological subtypes and distal location of GC, but not to cardia cancer [14]. It was assumed that these 2 pathogens may be affected by each other or may play important roles together directly or indirectly in the pathogenesis of gastric diseases. Gastric carcinoma tissues are surrounded by atrophic mucosa and intestinal metaplasia in both EBV positive and negative cases. It is conceivable that EBV infection occurs in the atrophic epithelial cells and leads to carcinoma development. However, it would be difficult to identify the role of *H.pylori* infection when EBV- associated GC had coexistent atrophic gastritis or intestinal metaplasia. Yanai et al [62] reported that the rate of *H. pylori* infection was higher in EBV- positive GC patients by histology [64]. In our series, there is no significant difference in the frequency of *H. pylori* infection between EBV positive and EBV negative GC similar the results of Chan et al [5]. Because mucosal immune or physiological mechanisms activated by one infection may protect or aggravate the second, more studies are needed to ascertain the relative contributory role of EBV and *H. pylori* in different subsets of GC [52].

Cancer development is a multistep event proceeding from normal to preneoplastic lesions to highly malignant tumors, accompanied by accumulations of multiple genetic alterations [7]. In EBV- associated GC, EBV genome is present in some precancerous lesions and most cancer cells in a monoclonal episomal form, [18] suggesting that EBV infects a cell before neoplastic transformation. p53 mutation and overexpression are common in gastric carcinoma, and are detected not only in cancerous regions but also in areas of precancerous dysplasia and metaplasia. EBV positive gastric carcinomas tend to express much higher amounts of p53 compared with EBV negative cases [31,46]. In the present study, we noted that p53 alterations are independent of EBV status in gastric carcinomas similar at Ohfuji et al [45]. Moreover, stratification of cases in the our series showed that 6 cases EBER1- positive showed p53 overexpression in a variable proportion of carcinoma cells. Several in vitro studies have shown that EBV- encoding proteins can bind to p53 and interfere with p53 function, possibly resulting in an increase in the half- life of p53.

Interrelationships between the controlling genes or proteins and levels of apoptosis in tumorigenesis of gastric carcinomas will undoubtedly be complex. The molecular basis of the association between EBV infections and cancer development is still not well defined. One explanation is that the viral infection and its associated proteins are protective against the occurrence of apoptosis that might cause the normal regression of cancers. In this report, we characterized the expression of several bcl-2 family proteins in gastric carcinomas. Four of the bcl-2 family proteins examined here (bcl-2, bax, bcl-x and bak) are frequently expressed in gastric cancers. However the percentage of immunopositive cells was highly variable for all these proteins and showed no association with EBV positivity, implying that genetic alterations or environmental stimuli (such as from growth factors or cell adhesion molecules) may control the production of these apoptosis-regulating proteins in complex ways. In vitro studies have shown that LMP1 can induce expression of the cellular oncoprotein, bcl-2 [16], but clinical studies have failed to confirm that this mechanism is operative in vivo. Members of the bcl-2 family of proteins are characterized by their ability to modulate cell death. Bcl-2 and some of its homologues (such as Mcl-1 and bcl-x) inhibit apoptosis, whereas other family members, such as bax and bak will accelerate apoptosis [22]. Bcl-2 is a protein best known for its suppression of apoptosis, a factor in cancer development. Our studies showed low level of bcl-2 expression in EBV-positive and -negative gastric carcinoma. This did not appear to correlate with the presence of EBV or with viral LMP1 expression. Interestingly, our data showed association between EBER1- positive carcinoma and expression of bak protein. The EBER1-positive carcinomas revealed low expression of bak protein while overexpression of bak was observed in EBER1- negative carcinomas. Like bax, the bak gene product primarily enhances apoptotic cell death following an appropriated stimulus. The widespread tissue distribution of bak messenger RNA, including those containing long- lived, terminally differentiated cell types, suggests that cell- death- inducing activity is broadly distributed, and that tissue- specific modulation of apoptosis is controlled primarily by regulation of molecules that inhibit apoptosis. Bak may induce

viral anti-apoptotic factors such as the EBV- encoded bcl-2 homologue BHRF-1 [16], but its cell- death- inducing activity may also be reserved by its direct heteromeric interaction with such factors. The ubiquitous expression of bak demands that, at least in long- lived cell types, its activity is controlled by cell- death inhibitory factors. A low expression of bak might protect cells of apoptosis. Therefore, the significance of the decrease bak level in EBV-associated gastric cancer deserves further evaluation.

The balance between the anti- apoptotic and pro-apoptotic members of the bcl-2 gene family that determine the outcome. Understanding the molecular mechanisms by which the virus may evade normal control mechanisms for stopping tumour growth is important for designing new treatments for EBV-associated cancers, and the present results are indicative of promise for continuing studies taking in a wider range of apoptosis-associated proteins.

An EBV-encoded factor that is a likely candidate in oncogenesis is LMP1. Previous reports have suggested that LMP1 is not expressed in gastric carcinomas [55] except in a minority of patients from Taiwan or in immunosuppressed transplant patients [15]. The 30 pb deletion in the C-terminus of the LMP1 gene has been implicated in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma and Hodgkin's disease. However, this deletion might not be relevant in the pathogenesis of EBV associated gastric carcinoma because high prevalence of the deletion in gastric carcinomas reflects the prevalence of the deletion variant in the normal population [42]. EBV latent proteins, consisting of six nuclear antigens and three latent membrane proteins, are displayed in EBV- related B- cell lymphomas occurring in immunodeficient hosts (latency III). Nasopharyngeal carcinomas show a high incidence of only LMP1 positively (latency II). In Burkitt's lymphoma, EBNA1 is selectively expressed in the absence of other EBNA and LMP proteins (latency I). Although the patterns of gene expression described above are useful for characterizing various histopathological entities, in practice there is heterogeneity of expression among different tumours of the same histological type, and even among cells within a given tumor [11]. Our data revealed LMP1 expression in six of nine EBER1-positive carcinomas. Some previous investigations have detected EBNA2 or LMP1 in EBER1- positive gastric tumors [45,55]. zur Hausen et al. 2001 and

Vo et al. 2002 have described a transcription pattern that includes BARF1, BARF0, LMP2A, and Q/K driven EBNA1 but not LMP1, EBNA2, or ZEBRA transcripts in EBV associated gastric cancer [60,67].

The expression of LMP1 in gastric carcinomas arising in immunocompetent hosts cannot be satisfactorily explained. It is possible that LMP1 is down-regulated in response to immune surveillance. An alternative hypothesis is that LMP1 production might be a function of cellular differentiation. This is supported by in vitro studies showing that LMP1 is not expressed in epithelial cell lines infected with EBV except following induction of virus replication by differentiating agents [32].

Recently NO has been shown to play a role in tumor actions, such as angiogenesis, regulation of microcirculation, and cellular injury. Our data is the first report showing the 3 isoforms of NOS expressing in EBER1 – positive gastric carcinomas. The nNOS was overexpressed in gastric tumors while eNOS and iNOS were expressed in low level. However, our results differ from a recent report which showed a marked reduction of all NOS isoforms expression in gastric cancer tissues than in normal gastric mucosa [48]. The difference in expression levels probably is due to different methods of determination employed by the authors, immunostaining vs. activity assay and RT-PCR. Effects of NO on cells are dose- dependent. Although high concentrations of NO can be cytostatic and cytotoxic, low concentrations of NO may even protect some cell types from damage and apoptosis. Hypoxia arising during cancer development, and most intriguing, as a synergistic inducer of NOS2 expression. NO may act directly by stimulation of endothelial cell growth or may induce expression of other angiogenic factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF). NO production in human tumors causes DNA damage and triggers p53- mediated growth arrest and apoptosis. As a result, NO production would contribute to human cancer progression by selection against wild-type p53 and for mutant p53 cells. Although for reasons yet unclear human cells express less iNOS mRNA in response to cytokines than rodent cells. In particular NO production by macrophages has been implicated in resistance to intracellular pathogens, such as parasites, fungi and viruses. In the case of Epstein-Barr virus (EBV), NO has been shown to inhibit viral reactivation in EBV- infected B cells [35]

and DNA replication in EBV- superinfected Raji cells [21] Although the mechanisms for the antiviral action of NO have not been clarified, the multiplicity of hosts enzymes it targets makes it possible that multiple alterations in host cell proteins are involved. This finding led us to propose that EBV latency can be directly and/or indirectly associated with iNOS gene expression and also lead us to postulate that NO might also be an important factor in the host- EBV relationship [9]. In our studies, there was no correlation between NOS activity and EBV positivity in gastric carcinomas. In conclusion, it is clear that EBV is associated with some cases of gastric carcinomas. EBER1-positive carcinomas were characterized by male dominance, preferential location in cardia region, prevalence in the diffuse type with intense lymphoid infiltrate. No association was showed with proteins of apoptosis (bcl-2, bcl-x and bax), except with bak that showed low expression in EBER1 positive tumors. Expression of NOS and p53 also showed no correlation with EBV positivity. Some cases reveled immunoposivity cells for LMP1 latent membrane antigen. This suggests that the EBV-positive gastric carcinomas may have on oncogenic pathway similar to that of other EBV-associated carcinomas and is distinct from the EBV- negative gastric carcinomas.

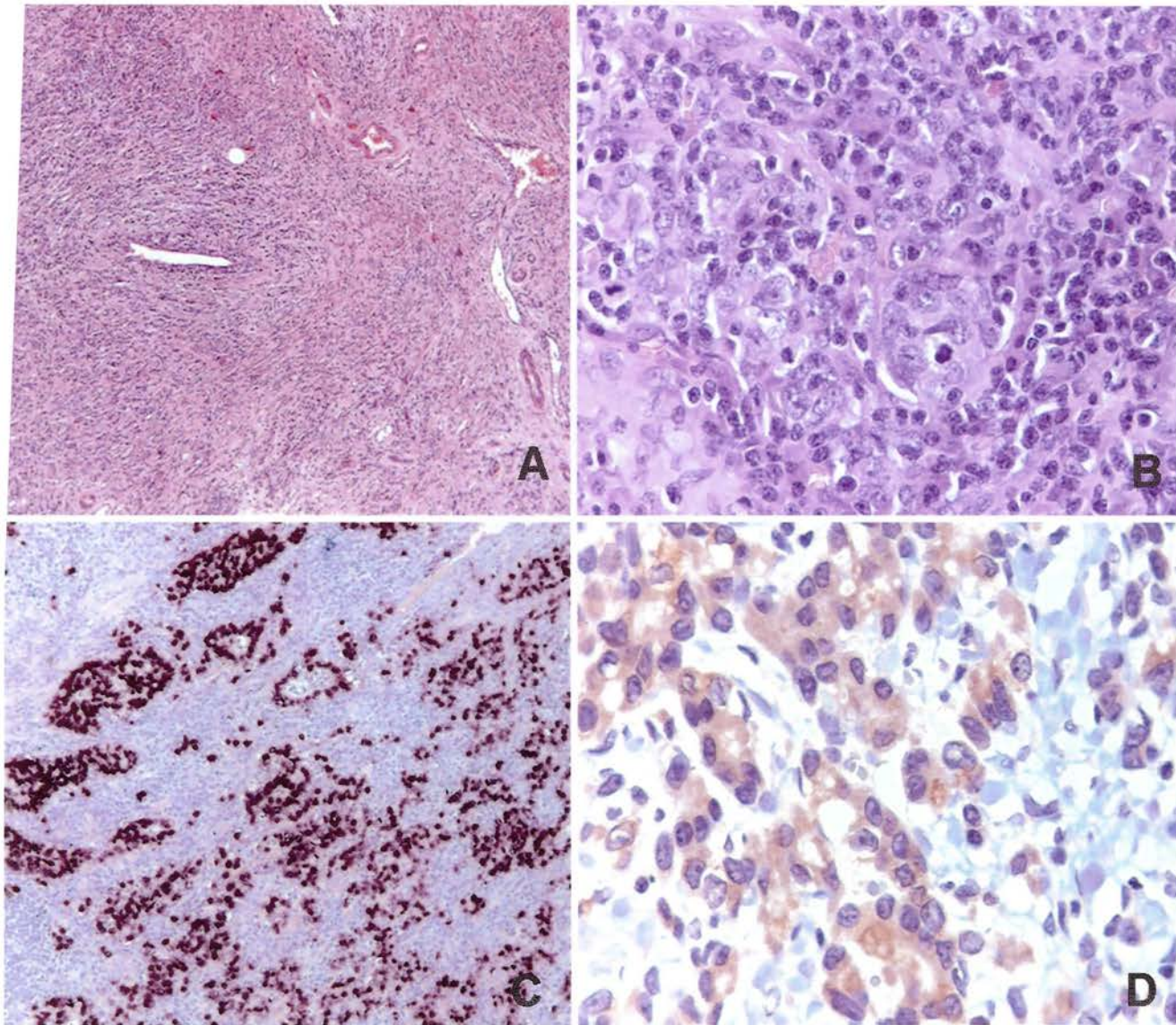


Fig 1 Diffuse gastric carcinoma with poorly cohesive cells diffusely infiltrating the gastric wall with little or no gland formation (A). Micro-tubular formation surrounded by dense lymphoid stroma (B). EBER-1 (ISH) signals are present in the nuclei of cancer cells, distributed diffusely (C). Immunohistochemical reaction of antibody LMP1 in tumor cells (D).

TABLE 1. Clinicopathological data of EBV-related and EBV-negative cases of gastric carcinoma

	EBV-related gastric carcinoma (n = 9)	EBV-negative gastric carcinoma (n= 109)	p Value
Gender			0.49
Male	7 (78%)	73 (67%)	
Female	2 (22%)	36 (33%)	
Age: range(mean)*	35-78 (60.5)	25-84 (61.2)	n.s.
Site of tumor			0.025
Cardia	5 (55%)	21 (20%)	
Body/Antrum	4 (45%)	87 (80%)	
Depth of Invasion			n.s.
Superficial	0	18 (16%)	
Deeply invasive	9 (100%)	91 (84%)	
LN metastasis			n.s.
Absent	3 (34%)	45 (41%)	
Present	6 (66%)	64 (59%)	
Histological type			0.008
Diffuse	8 (88%)	46 (42%)	
Intestinal	1 (12%)	63 (58%)	
Lymphoid stroma			0.006
Minimal/mild	2 (22%)	75 (69%)	
Moderate/intense	7 (78%)	34 (31%)	
<i>H. pylori</i>			n.s.
Absent	8 (88%)	72 (66%)	
Present	1 (12%)	37 (34%)	

Legend: * age in years; LN: lymph node; n.s.: not statistically significant

TABLE 2: Immunohistochemical findings in cases of EBER1- Positive and EBER1- Negative gastric carcinomas.

	EBV-related gastric carcinoma (n = 9)	EBV-negative gastric carcinoma (n= 109)	p Value
<i>P53</i>			0.46
Positive	6 (67%)	64 (58%)	
Negative	3 (33%)	45 (42%)	
<i>Bcl-2</i>			0.44
Positive	3 (33%)	46 (42%)	
Negative	6 (67%)	63 (58%)	
<i>Bcl-x</i>			0.28
Positive	9 (100%)	102 (94%)	
Negative		7 (6%)	
<i>Bak</i>			0.023
Positive	3 (33%)	78 (72%)	
Negative	6 (67%)	31 (28%)	
<i>Bax</i>			0.081
Positive	8 (88%)	94 (86%)	
Negative	1(12%)	15 (14%)	
<i>NOS1(nNOS)</i>			0.53
Positive	6 (67%)	77 (70%)	
Negative	3 (33%)	32 (30%)	
<i>NOS2 (iNOS)</i>			0.53
Positive	3 (33%)	32 (30%)	
Negative	6 (67%)	77 (70%)	
<i>NOS3 (eNOS)</i>			0.27
Positive	2 (22%)	42 (38%)	
Negative	7 (78%)	67 (62%)	

References:

1. Ambs S, Merriam WG, Ogunfusika MO, Bennett WP, Ishibe N, Hussain P, Tzeng EE, Geller DA, Billiar TR, Harris CC (1998) p53 and vascular endothelial growth factor regulate tumor growth of NOS2-expressing human carcinoma cells. *Nature Medicine* 4: 1371-1376
2. Ambs S, Hussain P, Harris CC (1997) Interactive effects of nitric oxide and the p53 tumor suppressor gene in carcinogenesis and tumor progression. *FASEB J* 11: 443-448
3. Blaser MJ et al. (1995) Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing cagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res* 55: 2111-2115.
4. Brüne B, von Knethen A, Sandau KB (1998) Nitric oxide and its role in apoptosis. *Europ J Pharmacol* 351: 261-272
5. Chan WY, Liu Y, Li CYS, et al.(2002) Recurrent genomic aberrations in gastric carcinomas associated with *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr virus. *Diagn Mol Pathol* 11(3): 127-134
6. Coobs CS, Brenman JE, Aldape KD, Bredt DS, Israel MA (1995) Expression of nitric oxide synthase in human central nervous system tumors. *Cancer Res* 55: 727-730
7. Correa P (1992) Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process. *Cancer Res* 52: 6735-6740
8. Gabbert HE, Muller W, Schneiders A, Meier S, Hommel G (1995) The relationship of p53 expression to the prognosis of 418 patients with gastric carcinoma. *Cancer* 76: 720- 726
9. Gao X, Tajima M, Sairenji T (1999) Nitric oxide down- regulates Epstein- Barr virus reactivation in epithelial cell lines. *Virology* 258: 375- 381
10. Goto T, Haruma K, Kitadai Y, Ito M, Yoshihara M, Sumii K, Hayakawa N, Kajiyama G (1999) Enhanced expression of inducible nitric oxide

synthase and nitrotyrosine in gastric mucosa of gastric cancer patients.
Clin Cancer Res 5: 1411-1415

11. Gulley ML (2001) Molecular diagnosis of Epstein- Barr virus- related diseases. *J Mol Diagn* 3: 1-10
12. Gulley ML, Pulitzer DR, Eagan PA, Schneider BG (1995) Epstein- Barr virus infection is an early event in gastric carcinogenesis and is independent of bcl-2 expression and p53 accumulation. *Hum Pathol* 27: 20-27
13. Hahm KB, Lee KJ, Kim JH, Cho SW, Chung MH (1998) *Helicobacter pylori*, oxidative DNA damage, gastric carcinogenesis, and reversibility by rebamipide. *Diag Dis Sciences* 43:72S-77S
14. Hansson LE, Engstrand L, Nyren O, Lindgren A (1995) Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in subtypes of gastric cancer. *Gastroenterol* 109:885-888
15. Harn HJ, Chang JY, Wang MW, et al.(1995) Epstein- Barr virus-associated gastric adenocarcinoma in Taiwan. *Hum Pathol* 26: 267-271
16. Henderson S, Rowe M, Gregory C, Croom-Carter D, Wang F, Longnecker R, Kieff E, Rickinson A (1991) Induction of bcl-2 expression by Epstein- Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell* 65: 1107-1115
17. Hurlimann J, Saraga EP (1994) Expression of p53 protein in gastric carcinomas. Association with histologic type and prognosis. *Am J Surg Pathol* 18: 1247-1253
18. Imai S, Koizumi S, Sugiuri M, et al. (1994) Gastric carcinoma: monoclonal epithelial malignant cells expressing Epstein- Barr virus latent infection protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 9131-9135
19. Ishii H, Gobe G, Kawakubo Y, Sato Y, Ebihara Y (2001) Interrelationship between Epstein- Barr virus infection in gastric carcinomas and the expression of apoptosis- associated proteins. *Histopathology* 38: 111-119

20. Jones NL et al. (1997) Increase in proliferation and apoptosis of gastric epithelial cells early in the natural history of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Pathol* 151, 1695-1703.
21. Kawanishi M (1995) Nitric oxide inhibits Epstein- Barr virus DNA replication and activation of latent EBV. *Intervirology* 38: 206-213
22. Kiefer MC, Brauer MJ, Powers VC, Wu JJ, Umansky SR, Tomei LD, Barr PJ (1995) Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak. *Nature* 374: 736-739
23. Kijima Y, Hokita S, Takao S, Baba M et al. (2001) Epstein- Barr virus involvement is mainly restricted to lymphoepithelial type of gastric carcinoma among various epithelial neoplasms. *J Med Virol* 64: 513-518
24. Koh E, Noh SH, Lee YD, Han LW, Lee HW, Hong S (1999) Differential expression of nitric oxide synthase in human stomach cancer. *Cancer Lett* 146: 173-180
25. Kojima M, Morisaki T, Tsukahara Y, Uchiyama A, Matsunari Y, Mibu R, Tanaka M (1999) Nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in human colon carcinoma tissue. *J Surg Oncol* 70: 222-229
26. Krajewska M, Fenoglio- Preiser CM, Krajewski S, Song K, Macdonald JS, Stemmerman G, Reed JC (1996) Immunohistochemical analysis of bcl-2 family proteins in adenocarcinomas of the stomach. *Am J Pathol* 149: 1449-1457
27. Kume T, Oshima K, Yamashita Y, Shirakusa T, Kikuchi M (1999) Relationship between Fas-ligand expression on carcinoma cell and cytotoxic T- lymphocyte response in lymphoepithelioma- like cancer of the stomach. *Int J Cancer* 84: 339-343
28. Kuzushima K, Nakamura S, Nakamura T, et al. (1999) Increased frequency of antigen- specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes infiltrating an Epstein- Barr virus- associated gastric carcinoma. *J Clin Invest* 104: 163-171

29. Lauren P (1965) The two histological main types of gastric carcinoma. Diffuse and so-called intestinal type carcinoma. An attempt at histoclinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 64, 31-49.
30. Leoncini L, Vindigni C, Megha T, et al. (1993) Epstein-Barr virus and gastric cancer: data and unanswered questions. *Int J Cancer* 53: 898-901
31. Leung SY, Chau KY, Yuen ST, Chu KM, Branicki FJ, Chung LP (1998) p53 overexpression is different in Epstein- Barr virus- associated and Epstein- Barr virus- negative carcinoma. *Histopathology* 33(4) 311-317
32. Li QX, Yong LS, Niedobitek G, Dawson CW, Birkenbach M, Wang F, Rickinson AB (1992) Epstein- Barr virus infection and replication in human epithelial cell system. *Nature* 356: 347-350
33. Maehara Y et al. (2000) Time trends of surgical treatment and the prognosis for Japanese patients with gastric cancer. *Br J Cancer* 83, 986-991.
34. Maehara Y, Tomoda M, Hasuda S, et al. (1999) Prognostic value of p53 protein expression for patients with gastric cancer-A multivariate analysis. *Br J Cancer* 79: 1255- 1261
35. Mannick JB, Asano K, Izumi K, Kieff E, Stampler JS (1994) Nitric oxide produced by human B lymphocytes inhibits apoptosis and Epstein-Barr virus reactivation. *Cell* 79: 1137-1146
36. Matsunou H, Konishi F, Hori H, Ikeda T, Sasaki K, et al. (1996) Characteristics of Epstein-Barr virus- associated gastric carcinoma with lymphoid stroma in Japan. *Cancer* 77: 1998-2004
37. Ming SC (1998) Cellular and molecular pathology of gastric carcinoma and precursor lesions: a critical review. *Gastric Cancer* 1, 31-50.
38. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, INCA (2002)
39. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Ther* 43:109-142

40. Mochhala S, Chhatwal VJS, Chan STF, Ngoi SS, Chia YW, Rauff A (1996) Nitric oxide synthase activity and expression in human colorectal cancer. *Carcinogenesis* 17: 1171-1174
41. Mori M, Watanabe M, Tanaka S, Mimori K, Kuwano H, Sugimachi K (1994) Epstein- Barr virus- associated carcinomas of the esophagus and stomach. *Arch Pathol Lab Med* 118: 998-1001
42. Mori S, Itoh T, Tokunaga M, et al.(1999) Deletions and single- base mutations within the carboxy- terminal region of the latent membrane protein 1 oncogene in Epstein- Barr virus- related gastric cancers of Southern Japan. *J Med Virol* 57: 152-158
43. Moritani S, Sugihara H, Kushima R, Hattori H (2002) Different roles of p53 between Epstein-Barr virus- positive and –negative gastric carcinomas of matched histology. *Virchows Arch* 440:367-375
44. Oda K, Tamaru J, Takenouchi T, et al. (1993) Association of Epstein-Barr virus with gastric carcinoma with lymphoid stroma. *Am J Pathol* 143: 1063-1071
45. Ohfuji S, Osaki M, Tsujitani S, et al. (1996) Low frequency of apoptosis in Epstein- Barr virus- associated gastric carcinoma with lymphoid stroma. *Int J Cancer* 68: 710-715
46. Ojima H, Fukuda T, Nakajima T, et al.(1997) Infrequent overexpression of p53 protein in Epstein- Barr virus- associated gastric carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 88: 262-266
47. Rajnakova A, Mochhala S, Goh PMY, Ngoi SS (2001) Expression of nitric oxide synthase, cyclooxygenase, and p53 in different stages of human gastric cancer. *Cancer Lett* 172: 177-185
48. Rajnakova A, Goh PMY, Chan STF, Ngoi SS, Alponat A, Mochhala S (1997) Expression of differential nitric oxide synthase isoforms in human normal gastric mucosa and gastric cancer tissue. *Carcinogenesis* 18: 1841-1845
49. Ranzani GN, Luinetti O, Padovan LS, et al.(1995) p53 gene mutations and protein nuclear accumulation are early events in intestinal type

- gastric cancer but late events in diffuse type. *Cancer Epidemiol biomarkers Prev* 4: 223-231
50. Shibata D, Tokunaga M, Uemura Y, Sato E, Tanaka S, Weiss LM (1991) Association of Epstein- Barr virus with undifferentiated gastric carcinomas with intense lymphoid infiltration. *Am J Pathol* 139: 469-474
51. Shibata D, Weiss LM (1992) Epstein- Barr virus- associated gastric adenocarcinoma. *Am J Pathol* 140: 769-774
52. Shiraishi N et al. (2000) Early and late recurrence after gastrectomy for gastric carcinoma. Univariate and multivariate analyses. *Cancer* 89, 255-261.
53. Son HJ, Kim YH, Park D, Kim JJ, Rhee PL, Paik SW, Choi KW, Song SY, Rhee JC (2001) Interaction between cyclooxygenase- 2 and inducible nitric oxide synthase in gastric cancer. *J Clin Gastroenterol* 33: 383- 388
54. Takada K (2000) Epstein- Barr virus and gastric carcinoma. *Mol Pathol* 53(5): 255-261
55. Takano Y, Kato Y (1995) Epstein- Barr virus association with early cancers found together with gastric medullary carcinomas demonstrating lymphoid infiltration.
56. Takano Y, Kato Y, Saegusa M, et al. (1999) The role of the Epstein- Barr virus in the oncogenesis of EBV(+) gastric carcinomas. *Virchows Arch* 434: 17-22
57. Thomsen LL, Lawton FG, Knowles RG, Beesley JE, Riveros- Moreno V, Moncada S (1994) Nitric oxide synthase activity in human gynecological cancer. *Cancer Res* 54: 1352-1354
58. Thomsen LL, Miles DW, Happerfield L, Bobrow LG, Knowles RG, Moncada S (1995) Nitric oxide synthase activity in human breast cancer. *Br J Cancer* 72: 41-44

59. Tokunaga M, Land CE, Uemura Y, Tokudome T, Tanaka S, Sato E (1993) Epstein-Barr virus in gastric carcinoma. *Am J Pathol* 143: 1250-1254
60. Vo QN, Geradts J, Gulley ML, Boudreau DA, Bravo JC, Schneider BG (2002) Epstein- Barr virus in gastric adenocarcinomas: association with ethnicity and CDKN2A promoter methylation. *J Clin Pathol* 55: 669-675
61. Wu CW et al (1999) Serum anti- p53 antibodies in gastric adenocarcinoma patients are associated with poor prognosis lymph node metastasis and poorly differentiated nuclear grade. *Br J Cancer* 80: 483-488
62. Yanai H, Murakami T, Yoshiyama H, et al.(1999) Epstein- Barr virus-associated gastric carcinoma and atrophic gastritis. *J Clin Gastroenterol* 29: 39-43
63. Yuen ST, Chung LP, Leung SY, et al. (1994) In situ detection of Epstein- Barr virus in gastric and colorectal adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol* 18: 1158-1163
64. zur Hausen A, Grieken NCTV, Meijer GA, Hermsen MAJA, Bloemena E, Meuwissen SGM, Brule AJCVD (2001) Distinct chromosomal aberrations in Epstein- Barr virus- carrying gastric carcinomas tested by comparative genomic hybridization. *Gastroenterol* 121: 612-618