



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

ELIZABETH MARIA AFONSO RABELO GONÇALVES

PESQUISA DO *Helicobacter pylori* EM AMOSTRAS DE FÍGADO NÃO TUMORAL
FIXADO E EMBLOCADO DE PACIENTES COM CARCINOMA HEPATOCELULAR

*DETECTION OF Helicobacter pylori IN FORMALIN-FIXED PARAFFIN-EMBEDDED
NON TUMORAL LIVER SAMPLES FROM PATIENTS WITH HEPATOCELLULAR
CARCINOMA*

CAMPINAS

2015

ELIZABETH MARIA AFONSO RABELO GONÇALVES

PESQUISA DO *Helicobacter pylori* EM AMOSTRAS DE FÍGADO NÃO TUMORAL
FIXADO E EMBLOCADO DE PACIENTES COM CARCINOMA HEPATOCELULAR

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a
obtenção do título de Doutora em Ciências na área de Concentração
em Clínica Médica.

ORIENTADOR: PROF. DR. JAZON ROMILSON DE SOUZA ALMEIDA

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA ELIZABETH MARIA AFONSO RABELO GONÇALVES, E ORIENTADA PELO
PROF. DR. JAZON ROMILSON DE SOUZA ALMEIDA.

CAMPINAS

2015

Agência de fomento: FAPESP
Nº processo: 2009/09889-5

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

G586p Gonçalves, Elizabeth Maria Afonso Rabelo, 1977-
Pesquisa do *Helicobacter pylori* em amostras de fígado não tumoral fixado e embocado de pacientes com carcinoma hepatocelular / Elizabeth Maria Afonso Rabelo Gonçalves. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Jazon Romilson de Souza Almeida.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Helicobacter pylori*. 2. Carcinoma hepatocelular. 3. Cirrose hepática. 4. Microdissecação e captura a laser. 5. Análise de sequência de DNA. I. Almeida, Jazon Romilson de Souza, 1957-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Detection of *Helicobacter pylori* in formalin-fixed paraffin-embedded non tumoral liver samples from patients with hepatocellular carcinoma

Palavras-chave em inglês:

Helicobacter pylori

Hepatocellular carcinoma

Liver cirrhosis

Laser capture microdissection

Sequence analysis, DNA

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutora em Clínica Médica

Banca examinadora:

Jazon Romilson de Souza Almeida [Orientador]

Ricardo Brandt de Oliveira

Rita de Cassia Martins Alves da Silva

Elza Cotrim Soares

Miriam Aparecida da Silva Trevisan

Data de defesa: 07-08-2015

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

ELIZABETH MARIA AFONSO RABELO GONÇALVES

ORIENTADOR: PROF. DR. JAZON ROMILSON DE SOUZA ALMEIDA

MEMBROS:

- 1. PROF. DR. JAZON ROMILSON DE SOUZA ALMEIDA**
 - 2. PROF. DR. RICARDO BRANDT DE OLIVEIRA**
 - 3. PROFA. DRA. RITA DE CASSIA MARTINS ALVES DA SILVA**
 - 4. PROFA. DRA. ELZA COTRIM SOARES**
 - 5. PROFA. DRA. MIRIAM APARECIDA DA SILVA TREVISAN**
-

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas

Data: 07/08/2015

DEDICATÓRIA

Ao Prof. Dr. José Murilo Robilotta Zeitune (*in memoriam*),
que iniciou o trabalho de orientação desta tese, mas faleceu recentemente,
deixando saudade e inspiração para que o estudo fosse concluído. Tenho a certeza
de que ele estaria orgulhoso por esta conquista científica.

Aos meus pais,

Américo Afonso Rabelo e Sônia Aparecida Afonso Rabelo,
pelo amor, dedicação, ensinamentos e estímulo em todas as etapas do
meu desenvolvimento;

Ao meu esposo,

Fernando José Gonçalves,
pelo carinho, compreensão e dedicação em todos os momentos de nossa vida e,

Aos meus filhos,

Henrique e Mariana,
que são a força impulsionadora de todos os meus projetos de vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jazon Romilson de Souza Almeida, pelo apoio, acolhida, incentivo, ensinamentos e entusiasmo com que sempre participou deste projeto.

À Profa. Dra. Cecília Amélia Fazzio Escanhoela, pela prontidão em auxiliar com as amostras, confiança, alegria e realização das lâminas de microscopia eletrônica de transmissão.

À Profa. Dra. Ilka de Fátima Ferreira de Santana Boin pela coleta das amostras e fornecimento dos dados sobre os pacientes transplantados.

À Profa. Dra. Iscia Lopes-Cendes e à bióloga Ilária C. Sgardioli do Laboratório de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP, pela oportunidade de utilização do aparelho de microdissecção e captura a laser e pelos valiosos ensinamentos.

À Prof. Dra. Sheila Aparecida Coelho Siqueira, Diretora da Divisão de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina/USP, pela gentileza e disponibilidade em realizar a coloração imunohistoquímica.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP pelos ensinamentos transmitidos.

Aos professores membros das bancas de qualificação e defesa do Doutorado que, gentilmente, aceitaram o convite e engrandeceram a qualidade do estudo.

À Dra. Sônia Leticia Silva Lorena pela oportunidade, confiança e apoio em diversos momentos de minha vida.

À minha irmã Marília Afonso Rabelo Buzalaf que, além de constituir um exemplo profissional, sempre estimulou meu desenvolvimento científico.

À amiga e farmacêutica Bruna Maria Rõesler pelo apoio relacionado à extração de DNA e também pela sólida parceria científica. Muitas vezes, descobrimos no trabalho os nossos grandes amigos.

À bióloga Joseane Morari do Laboratório de Gastroenterologia Experimental e Sinalização Celular do Gastrocentro/UNICAMP pelo grandioso auxílio na padronização das técnicas de Biologia Molecular.

Aos funcionários do Laboratório de Anatomia Patológica do Gastrocentro/UNICAMP, em especial a bióloga Ana Lúcia Pereira Rosseto, pelo inestimável auxílio com os cortes histológicos.

Aos funcionários do Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro/UNICAMP pela gentileza na utilização do aparelho Nanodrop.

À bióloga Natália Hifumi Hara do Laboratório de Hepatologia e Gastroenterologia do Gastrocentro/UNICAMP, com quem tive a oportunidade de trabalhar desde o mestrado, o meu sincero agradecimento pelo suporte oferecido.

À biomédica Célia Regina Pavan e à bióloga Michelle Viviane Sá dos Santos Rondon do Laboratório de Hepatologia e Gastroenterologia do Gastrocentro/UNICAMP, pelo apoio sempre presente. A parceria estabelecida entre nós rendeu bons frutos no ambiente profissional e permitiu, também, o nascimento de sincera amizade.

Aos demais funcionários do Gastrocentro, que não foram mencionados acima, e que contribuíram para a concretização do estudo, tanto direta quanto indiretamente.

Ao secretário Yuri da Comissão de Pós-Graduação em Clínica Médica, da Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP, pela atenção e auxílio nos processos para qualificação e defesa.

À Cleide do Setor de Estatística da Câmara de Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas/UNICAMP, pelo tratamento estatístico dos dados.

A todos os pacientes envolvidos no estudo, sem os quais este trabalho não teria sido possível.

Finalmente, um agradecimento sincero à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), sem a qual o estudo não poderia ter sido realizado.

Muito Obrigada!

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia do Gastrocentro/UNICAMP.

"Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima."

Louis Pasteur

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

Isaac Newton

RESUMO

Diversos estudos têm demonstrado que a infecção crônica pelo *Helicobacter (H.) pylori* está associada a várias manifestações extragástricas incluindo doença cardíaca isquêmica, doenças neurodegenerativas, metabólicas e autoimunes, doenças de pele e também doenças pancreáticas, colorretais e hepatobiliares. De fato, o *H. pylori* foi detectado em amostras de bile e tecidos da vesícula e fígado de pacientes com colecistite crônica, colangite esclerosante, hepatite crônica, cirrose e carcinoma hepatocelular (CHC). Sendo assim, pesquisas verificando o papel do *H. pylori* na etiopatogenia das doenças hepatobiliares são fundamentais para sua melhor compreensão. Os tecidos parafinados representam uma fonte extraordinária para os estudos retrospectivos onde é possível correlacionar os achados moleculares com a terapêutica e a evolução clínica das doenças. Deste modo, o presente estudo teve como principal objetivo verificar a presença do *H. pylori* em amostras de tecido hepático fixado e embocado de pacientes com CHC. Foram empregadas 86 amostras divididas em dois grupos. O grupo GA apresentou 57 fragmentos hepáticos de pacientes com cirrose e CHC. O grupo GB foi composto por 29 amostras de fígado de indivíduos sem doença hepática (grupo controle). O DNA foi extraído pelo método do fenol clorofórmio em todas as amostras e, posteriormente, foi realizada a amplificação do gene 16S rRNA do *H. pylori*. Amostras positivas para o gene 16S rRNA foram submetidas ao sequenciamento de DNA. A coloração imunohistoquímica e a técnica de microdissecção e captura a laser foram realizadas em algumas amostras para confirmação diagnóstica do *H. pylori*. O estudo da morfologia bacteriana foi realizado pela microscopia de transmissão eletrônica. Os resultados da amplificação do gene 16S rRNA revelaram que 28 amostras (49,1%) foram positivas no GA e 8 amostras (27,6%) amplificaram o gene no GB ($p=0.056$). No grupo GA não foi verificada relação da positividade do *H. pylori* com os diferentes fatores de risco para o CHC: infecção pelo vírus da hepatite tipo B ($p=1.00$) e tipo C ($p=0.93$), consumo de álcool ($p=0.14$), hemocromatose ($p=1.00$), deficiência de alfa-1-antitripsina e nos pacientes cuja etiologia da doença hepática foi criptogênica ($p=0.61$). No mesmo grupo, não foram observadas diferenças significantes com relação à presença da bactéria e os dados do escore Chil-Pugh e MELD ($p=0.29$ e $p=0.31$, respectivamente). Através do sequenciamento, verificou-se que a sequência do gene 16S rRNA apresentou 98% de

similaridade com o DNA do *H. pylori*. A coloração imunohistoquímica confirmou a presença do *H. pylori* no fígado. Tanto na microdissecção e captura a laser quanto na microscopia eletrônica de transmissão, foram observados microrganismos semelhantes ao *H. pylori*, nos espaços sinusóides e, sobretudo, na forma cocóide. Os resultados do presente estudo demonstram que o *H. pylori* foi detectado em amostras parafinadas de fígado nos pacientes com cirrose e CHC. A presença da bactéria não estava associada aos fatores de risco para o CHC estudados e não apresentou correlação com a gravidade da doença hepática.

Palavras-chave: *Helicobacter pylori*, Carcinoma hepatocelular, Cirrose hepática, Microdissecção e captura a laser, Análise de sequência de DNA.

ABSTRACT

Several studies have shown that chronic *Helicobacter (H.) pylori* infection is associated with extragastric manifestations including cardiovascular, metabolic, neurodegenerative and autoimmune conditions, skin disorders as well as pancreatic, colorectal and hepatobiliary diseases. In fact, *H. pylori* was detected in bile samples, gallbladder and liver tissue from patients with chronic cholecystitis, sclerosing cholangitis, chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). Thus, studies verifying the role of *H. pylori* in the pathogenesis of hepatobiliary diseases are essential for their better understanding. The formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) tissue represent an extraordinary source for retrospective studies where it is possible to correlate the molecular findings with the therapy and the clinical course of diseases. Then, the aim of this study was to verify the presence of *H. pylori* in FFPE liver tissue from patients with HCC. For this purpose, 86 samples were divided into two groups. The GA group presented 57 tissue specimens from patients with cirrhosis (CH) and HCC. The GB group consisted of 29 liver samples from individuals without liver disease (control group). The DNA was extracted from liver tissue by phenol chloroform method in all samples and the amplification of *H. pylori* 16S rRNA was performed. Some positive samples for *H. pylori* 16S rRNA gene were subjected to DNA sequencing. The immunohistochemical staining and laser capture microdissection (LCM) technique were performed on some samples to confirm the diagnosis of *H. pylori*. The study of bacterial morphology was carried out by transmission electron microscopy (TEM). The results of 16S rRNA gene amplification revealed that 28 samples (49,1%) were positive in GA and 8 samples (27,6%) amplified 16S rRNA gene in GB ($p = 0.056$). In the GA group, it was not verified relationship between the presence of *H. pylori* and the risk factors for HCC: infection with hepatitis virus B ($p=1.00$) and hepatitis virus C ($p=0.93$), alcohol intake ($p=0.14$), hemochromatosis ($p=1.00$), alfa-1-antitripsin deficiency and those patients whose etiology for liver disease was considered criptogenic ($p=0.61$). In the same group, there were no significant differences regarding the presence of the bacteria and data from Chil-Pugh score and MELD ($p = 0.29$ $p = 0.31$, respectively). The sequencing results demonstrated that 16S rRNA sequence showed 98% similarity to *H. pylori* DNA. Immunohistochemistry staining confirmed the presence of *H. pylori* in liver. Both in LCM and TEM, microorganisms resembling *H. pylori* were visualized

in the sinusoidal spaces, especially in the coccoid form. The results of this study demonstrate that *H. pylori* was detected in FFPE liver samples of patients with cirrhosis and HCC. The presence of bacteria was not associated with risk factors for HCC and showed no correlation with the severity of liver disease.

Key words: Helicobacter pylori, Hepatocellular carcinoma, Liver cirrhosis, Laser capture microdissection, Sequence analysis, DNA.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1	
Imagens do sistema de microdissecção e captura a laser. (a): sistema completo PALM MicroBeam (www.zeiss.de). (b): caminho do feixe de laser e captura celular.....	50
Figura 2	
Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos da PCR para o gene da betaglobina humana (110pb). MM: marcador molecular (100-1000pb). Linhas 1, 2 e 3: amostras positivas do grupo GA; Linhas 4 e 5: amostras positivas do grupo GB. CP: controle positivo (DNA extraído de sangue humano); CN: controle negativo (água bi-destilada)	56
Figura 3	
Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos da PCR para o gene 16S rRNA do <i>H. pylori</i> (139pb). MM: marcador molecular (100-1000pb). Linhas 1 e 2: amostras negativas (GA e GB respectivamente); Linhas 3, 4 e 5: amostras positivas do grupo GA; Linhas 6 e 7: amostras positivas do grupo GB; CP: controle positivo (amostra gástrica de <i>H. pylori</i>) e CN: controle negativo (água bi-destilada)	57
Figura 4	
Coloração imunohistoquímica para detecção <i>H. pylori</i> no fígado de paciente com CHC (grupo GA). Note que os bacilos estão no interior das células de Kupffer (setas) (Aumento: 1000X)	58
Figura 5.1	
Eletroferograma da sequência do gene 16S rRNA do <i>H. pylori</i> ..	59
Figura 5.2	
Resultados do alinhamento das bases do gene 16S rRNA do <i>H. pylori</i> no BLAST (número de acesso do GeneBank CP003419.1)	59

- Figura 6** Microscopia óptica do fígado de pacientes com CHC, corados com carbol-fucsina e com resultado positivo da amplificação do gene 16S rRNA do *H. pylori*. Em (A) e (C) estão representadas as bactérias (setas) antes da microdissecção (aumento: 610X). Em (B) e (D) as mesmas amostras após a microdissecção (aumento: 610X) 60
- Figura 7** Microscopia eletrônica de transmissão de amostras de tecido hepático de pacientes com resultado positivo para amplificação do gene 16S rRNA do *H. pylori*. As setas indicam estruturas semelhantes às células bacterianas, tanto na forma espiralada quanto na forma cocóide (Aumento: 12.500X) 61

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 Descrição dos pares de iniciadores utilizados na amplificação dos genes da betaglobina humana e 16S rRNA do <i>H. pylori</i>	48
Tabela 2 Características demográficas e resultado da PCR para o gene 16S rRNA do <i>H. pylori</i> nos dois grupos do estudo	53
Tabela 3 Fatores de risco para o CHC no grupo GA e sua relação com a presença do <i>H. pylori</i>	53
Tabela 4 Gravidade da doença hepática e idade no grupo GA e sua relação com a presença do <i>H. pylori</i>	54
Tabela 5 Resultados da média da quantificação e da razão A260/280 do DNA extraído nos grupos GA e GB	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFB1	Aflatoxina B1
AIIC	Agência Internacional de Investigação do Câncer
AlpA	Lipoproteína associada a aderência A
AlpB	Lipoproteína associada a aderência B
BabA	<i>Blood group antigen-binding adhesion</i>
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
CagA	<i>Cytotoxin associated gene A</i>
CagPAI	<i>Cytotoxin associated gene-pathogenicity Island</i>
CagY	<i>Cytotoxin associated gene Y</i>
CCl₄	Tetracloroeto de carbono
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CH	Cirrose hepática
CHC	Carcinoma hepatocelular
CO₂	Gás carbônico
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcóolica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dupA	<i>Duodenal ulcer promoter gene A</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EHNA	Esteatose hepática não alcoólica
et al.	Demais autores
FCH	Fator de crescimento dos hepatócitos
FCVE	Fator de crescimento vascular endotelial
HAI	Hepatite autoimune
HH	Hemocromatose hereditária
HopZ	Helicobacter outer membrane protein Z
HP-NAP	Proteína ativadora de neutrófilos do <i>H. pylori</i>
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
IceA	<i>Induced contact epithelium gene A</i>
IHQ	Imunohistoquímica
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8

IL-12	Interleucina-12
IL-23	Interleucina-23
INF-γ	Interferon-gama
Kd	Kilodalton
MALT	<i>Mucosa associated lymphoid tissue</i> (linfoma tipo MALT)
MCL	Microdissecção e captura a laser
MELD	<i>Model for end-stage liver disease</i>
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
Mm	Milímetro
mM	Milimolar
MMP	Metaloproteinase de matriz
N	Número de amostras
Ng	Nanograma
ng/μl	Nanograma/microlitro
O₂	Gás oxigênio
OipA	<i>Outer inflammatory protein</i>
P	Probabilidade
Pb	Pares de bases
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
PK	Proteinase K
pmol	Picomol
pH	Potencial hidrogênio-iônico
PTI	Púrpura trombocitopênica idiopática
r.p.m	Rotações por minuto
SabA	<i>Sialic acid binding adhesion</i>
SAM	Serviço de Arquivo Médico
TGF-β1	Fator de transformação do crescimento-beta 1
Tris	Tri (hidroximetil) aminometano
UV	Ultravioleta
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
VHB	Vírus da hepatite tipo B
VHC	Vírus da hepatite tipo C
VHG	Vírus da hepatite tipo G

μl

Microlitros

μm

Micrômetro

LISTA DE SINAIS E SÍMBOLOS

°C	Grau centígrado
=	Igual a
<	Menor que
≤	Menor ou igual a
%	Porcentagem

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	24
1.1. <i>Helicobacter pylori</i>	24
1.1.1. Histórico	24
1.1.2. Considerações iniciais	25
1.1.3. Características microbiológicas	26
1.1.4. Doenças extra digestivas associadas ao <i>H. pylori</i>	30
1.2. Carcinoma Hepatocelular	32
1.2.1. Informações epidemiológicas, clínicas e fatores de risco	32
1.2.2. O papel do <i>H. pylori</i> como fator de risco para o CHC	38
1.3. Justificativa	42
2. OBJETIVOS	43
2.1. Objetivo geral	43
2.2. Objetivos específicos	43
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	44
3.1. Casuística	44
3.1.1. Critérios de inclusão	44
3.1.2. Critérios de exclusão	45
3.1.3. Fonte de dados	45
3.1.4. Aspectos éticos	45
3.2. Métodos	46
3.2.1. Extração de DNA	46
3.2.2. Quantificação e anáse da pureza do DNA	46
3.2.3. Amplificação do gene da betaglobina humana	47
3.2.4. Amplificação do gene 16S rRNA para detecção do <i>H. pylori</i>	47
3.2.5. Análise dos produtos da PCR	48
3.2.6. Coloração imunohistoquímica (IHQ) para detecção do <i>H. pylori</i>	48
3.2.7. Sequenciamento	49
3.2.8. Microdissecção e captura a laser (MCL)	49
3.2.9. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	51
3.2.10. Estatística	51
4. RESULTADOS	52

4.1. Casuística	51
4.1.1. Grupo GA	52
4.1.2. Grupo GB	52
4.2. Resultados da quantificação e análise da pureza do DNA	54
4.3. Resultados da amplificação do gene da betaglobina humana	55
4.4. Resultados da amplificação do gene 16S rRNA para detecção do <i>H. pylori</i>	55
4.5. Resultado da coloração imunohistoquímica	57
4.6. Resultado do sequenciamento	58
4.7. Resultado da microdissecção e captura a laser	59
4.8. Resultado da microscopia eletrônica de transmissão	60
5. DISCUSSÃO	62
6. CONCLUSÕES	72
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
APÊNDICES	101
ANEXOS	103

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Helicobacter pylori*

1.1.1. Histórico

Durante muitos anos, o estômago humano foi considerado um ambiente hostil para a maioria das bactérias infectantes devido à presença de acidez intraluminal^{1,2}. Entretanto, o isolamento e o cultivo do *Helicobacter (H.) pylori* em 1983 pelos pesquisadores australianos Warren e Marshall³ mudou significativamente os conceitos da microbiologia gástrica e permitiu que estes pesquisadores recebessem o prêmio Nobel de Medicina em 2005.

Estudos europeus já haviam relatado a presença de bactérias semelhantes no tecido gástrico⁴. Entretanto, em 1979, Warren começou a observar o microrganismo como uma bactéria de formato curvo presente em amostras de tecido gástrico obtidas por biópsia e submetidas a exame histológico^{5,6,7}. Porém, a comunidade científica demonstrou certo ceticismo diante de suas descobertas, o que fez com que Marshall infectasse a si próprio com a referida bactéria, comprovando assim a associação do *H. pylori* com o desenvolvimento das doenças gástricas como a gastrite, úlcera duodenal e a úlcera gástrica⁸.

Inicialmente, a bactéria foi incluída no gênero *Campylobacter*, usualmente composto por bactérias gram-negativas em forma de bastão curvado, oxidase e catalase positivas, que se locomovem através de flagelos polares. Assim, foi denominada “gastric *Campylobacter* like organism”, recebendo, posteriormente, as denominações *Campylobacter pyloridis*, *Campylobacter pyloricus* e *Campylobacter pylori*⁹.

Entretanto, após análises da sequência do ácido nucléico e estudos ultra-estruturais, o microrganismo foi designado *Helicobacter* (forma helicoidal), diferenciando-se do gênero *Campylobacter* (bastão curvado). A espécie foi nomeada *pylori* pelo fato de ser mais frequentemente encontrada na mucosa antral, próxima ao piloro¹⁰. Este gênero, juntamente com *Campylobacter*,

Arcobacter e *Wolinella*, constitui a denominada superfamília VI de bactérias gram-negativas¹¹.

1.1.2. Considerações iniciais

O *H. pylori* é uma bactéria que coloniza tipicamente a mucosa gástrica e pode ser considerada o patógeno mais comum do trato gastrointestinal humano¹². A maioria dos indivíduos infectados não desenvolve doença e permanece assintomática, levando à hipótese de que algumas cepas da bactéria são inofensivas ou até mesmo benéficas¹³. Entretanto, desde o seu isolamento em 1983³, a infecção crônica pelo organismo é considerada fator de risco para o desenvolvimento de gastrite, úlcera péptica, displasia, neoplasia, linfoma tipo MALT e adenocarcinoma gástrico¹⁴.

A colonização gástrica pelo *H. pylori* afeta cerca de 50% da população mundial e a bactéria representa, provavelmente, o patógeno humano mais ubíquo e bem-sucedido^{15,16}. Tem sido demonstrado que o *H. pylori* apresenta longo período de co-evolução com o homem, provavelmente desde a migração humana a partir do continente Africano há cerca de 60.000 anos atrás^{17,18}. Além disso, o microrganismo exibe mecanismos de adaptação característicos que, através da seleção e co-evolução, foram estabelecidos para se adaptar à resposta imunológica humana¹⁹.

A infecção pelo *H. pylori* resulta no recrutamento de neutrófilos, linfócitos e macrófagos para a mucosa gástrica através da indução de várias citocinas como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-8 (IL-8)^{20,21,22}. Assim, acredita-se que a resposta imunológica durante a infecção representa importante papel na sua patogênese. O sucesso no estabelecimento da infecção crônica pelo organismo ocorre devido ao delicado balanço entre a resposta imune do hospedeiro e a persistência da bactéria durante o processo inflamatório através do rearranjo de seus fatores de virulência¹⁶.

Autores relatam que a infecção pelo *H. pylori* está diminuindo na maioria dos países ocidentais, provavelmente devido ao sucesso do tratamento e da melhoria das condições de higiene da população. Entretanto, nota-se situação

oposta em muitos países em desenvolvimento devido à falha no tratamento e à resistência aos antibióticos utilizados^{8,23}.

As rotas de transmissão do *H. pylori* ainda não estão totalmente esclarecidas. A transmissão pessoa-a-pessoa e a propagação familiar parecem ser os principais meios de transmissão^{24,25}. As crianças são geralmente infectadas por uma cepa geneticamente idêntica àquela dos seus pais, mantendo este genótipo mesmo quando ocorre mudança para outro ambiente²⁶. Adicionalmente, acredita-se que possa haver transmissão por água contaminada pelo microrganismo^{27,28}. Outros possíveis veículos de transmissão seriam moscas, hortaliças, procedimentos diagnósticos e animais domésticos (cães, gatos e macacos). Todavia, apesar da intensa busca para o entendimento de seu ciclo epidemiológico ele continua desconhecido^{29,30,31,32,33,34,35,36}.

1.1.3. Características microbiológicas

O *H. pylori* apresenta aproximadamente 2,5 a 5,0 µm de comprimento e de 0,5 a 1,0 µm de largura³⁷. De modo geral, é visualizado na forma espiralada, podendo aparecer como um bastão e, eventualmente, sob condições adversas à sua sobrevivência, pode apresentar-se numa forma esférica denominada cocóide.

O patógeno apresenta de dois a seis flagelos unipolares de aproximadamente 3,0 µm de comprimento, com um característico bulbo terminal. Tais estruturas conferem motilidade e permitem movimentos rápidos em soluções viscosas como o muco gástrico, favorecendo a colonização pela bactéria³⁸.

Outra característica de sua morfologia é a presença de um envoltório celular semelhante ao de outras bactérias gram-negativas, consistindo de uma membrana citoplasmática, um periplasma com peptidoglicanas e uma segunda membrana formada por lipídios³⁹.

O *H. pylori* é considerado um organismo microaerófilico, ou seja, apresenta crescimento ótimo a níveis de O₂ de 2 a 5%, 5 a 10% de CO₂ e alta umidade. Seu habitat natural é o estômago humano, com pHs menores do que

quatro, apesar de seu crescimento ocorrer de maneira ideal em pHs que variam de 5.5 a 8.0, preferencialmente no pH neutro^{40,41}. Isto ocorre devido à produção de urease pelo microorganismo, que constitui enzima indispensável à sua colonização, pois hidrolisa a uréia presente no meio gástrico em amônia e dióxido de carbono. A produção de amônia promove a neutralização do ambiente ácido no estômago, aumentando o pH do microambiente bacteriano e permitindo sua sobrevivência⁴².

Além da enzima urease, o *H. pylori* também produz catalase e oxidase, características comumente utilizadas no seu diagnóstico. Adicionalmente é capaz de catabolizar a glicose, porém não outros açúcares^{43,44}. Outras enzimas importantes sintetizadas pelo microorganismo são as amidases, as deamidases e a arginase^{45,46}. Para combater o stress oxidativo, a bactéria expressa vários mecanismos de resistência, como a produção das enzimas superóxido-dismutase, utilizando o ferro⁴⁷, catalase e alquil-hidroxiperoxi-redutase⁴⁸.

Como mencionado anteriormente, o *H. pylori* apresenta vários fatores de virulência que permitem sua adaptação ao hospedeiro, favorecendo o desenvolvimento da resposta inflamatória e o estabelecimento de diferentes manifestações clínicas durante a infecção. Dois destes fatores, os flagelos e a enzima urease, são indispensáveis à colonização do estômago pelo patógeno.

Após o estabelecimento da colonização, outros fatores denominados adesinas permitem a interação entre o *H. pylori* e as células da mucosa gástrica. Estas adesinas reconhecem receptores específicos nas células epiteliais gástricas e, dentre elas, a BabA (do inglês *Lewis b blood group antigen-binding adhesin*) constitui a melhor caracterizada. BabA liga-se aos antígenos do sistema ABO do sangue e antígenos Lewis b correspondentes (Leb) que são expressos nas células epiteliais gástricas⁴⁹. Alguns pesquisadores sugerem uma associação do genótipo *babA2* com o desenvolvimento de úlcera péptica^{49,50}.

Outra importante adesina é a SabA (do inglês *sialyl Lewis x antigen-binding adhesin*); a aderência do *H. pylori* à mucosa gástrica é dependente de SabA e glicanos sialilados/fucosilados na superfície da célula hospedeira. Após a colonização inicial mediada por BabA, a infecção induz à expressão de Lex, permitindo a adesão mediada pela SabA¹⁹. A capacidade para se ligar às células

epiteliais glicosiladas é essencial para a persistência da infecção e a ocorrência das doenças gastrointestinais^{51,52}. Verificou-se ainda que SabA está envolvida na ligação do *H. pylori* à laminina⁵³, aos eritrócitos presentes na mucosa gástrica dos seres humanos e macacos Rhesus⁵² e aos neutrófilos; nestas células, a ligação pode induzir à ativação não-opsônica, à fagocitose bacteriana e à resposta de explosão oxidativa⁵⁴.

Outras proteínas do *H. pylori* envolvidas na adesão ao tecido gástrico são a AlpA e a AlpB⁵¹. Elas constituem lipoproteínas estreitamente relacionadas e codificadas no mesmo operon do genoma da bactéria^{51,55}, podendo ligar-se à laminina de rato *in vitro*⁵⁶. Adicionalmente, tais lipoproteínas podem induzir a produção de IL-6 e IL-8 em linhagens de células gástricas⁵⁷.

Como parte das adesinas do *H. pylori* encontra-se ainda a HopZ cujo emprego de cepas hopZ “Knock-out” apresentou redução significativa na adesão bacteriana às células epiteliais gástricas⁵⁸. Finalmente, a proteína OipA (do inglês *outer membrane protein*) apresenta, além do seu papel na adesão⁵⁹, reconhecida atividade proinflamatória, sendo também associada aos níveis de IL-8 na mucosa gástrica⁶⁰.

Existem ainda os fatores de virulência relacionados à inflamação gástrica, sendo o mais conhecido dentre eles a ilha de patogenicidade CagPAI. Esta ilha constitui uma região de 40 kb no DNA cromossômico do *H. pylori* que codifica aproximadamente 31 genes responsáveis pela formação de um sistema de secreção do tipo IV através do qual a proteína CagA é transportada para o interior das células do epitélio gástrico⁶¹. Após a adesão bacteriana às células epiteliais, o sistema de secreção forma um *pilus* que injeta CagA no citoplasma das células gástricas através de uma rígida estrutura semelhante a uma agulha coberta pela proteína CagY. A proteína CagA é o fator de virulência melhor caracterizado da bactéria e o marcador fenotípico da CagPAI.

CagA também foi relacionada à desregulação da sinalização da β -catenina^{62,63} e complexos de junção apical⁶⁴, que constituem eventos relativos ao aumento da motilidade celular e transformação oncogênica em vários modelos de estudo^{65,66}. Além disso, alguns pesquisadores confirmam que CagPAI está envolvida na indução da produção de IL-8 no estômago⁶⁷.

Consequentemente, cepas de *H. pylori* CagA-positivas estão associadas aos níveis mais severos de inflamação e ao risco aumentado para o desenvolvimento de úlcera e câncer tanto no homem quanto nos modelos experimentais para a infecção⁶⁸.

A citotoxina vacuolizante VacA é outro importante fator de virulência envolvido na inflamação, pois induz a formação de vacúolos no interior das células do hospedeiro. É secretada pelo *H. pylori* como um polipeptídeo de 140 Kd⁶⁹ através de uma estrutura de autotransporte tipo V que dispensa o contato com as células gástricas^{19,70}. VacA penetra o citoplasma celular via endocitose e forma canais seletivos de ânions nas membranas dos vacúolos, os quais permitem o acúmulo de ânions cloreto e outras bases fracas, resultando no “inchaço” osmótico⁷¹. Adicionalmente, a citotoxina está relacionada à disfunção das mitocôndrias e apoptose⁷². Foi descrito que VacA também ocasiona a quebra da função de barreira das células epiteliais, permitindo o extravasamento de nutrientes essenciais como ferro, níquel e aminoácidos que podem contribuir para o crescimento bacteriano⁷³.

O gene promotor de úlcera duodenal do *H. pylori* (*dupA*), localizado na zona de plasticidade do genoma bacteriano, foi inicialmente descrito como fator de risco para o desenvolvimento de úlcera duodenal e fator de proteção para a atrofia gástrica, metaplasia intestinal e cancer gástrico⁷⁴. Entretanto, sua função não está totalmente esclarecida. Dois importantes estudos confirmam o papel do *dupA* na úlcera duodenal^{75,76}. Em um deles⁷⁶, notou-se que a ocorrência de câncer gástrico foi significativamente menor em pacientes com cepas de *H. pylori dupA* positivas, sugerindo que o gene poderia ser associado como marcador negativo para o câncer gástrico. Pesquisadores brasileiros, entretanto, sugeriram a associação do *dupA* com o desenvolvimento do câncer gástrico, tanto no estágio precoce quanto avançado. O estudo revelou expressivo número de pacientes com adenocarcinoma gástrico e positivos para o gene *dupA* (31.46%)⁷⁷.

A proteína ativadora de neutrófilos do *H. pylori* (HP-NAP) é codificada pelo gene *napA* e atravessa o epitélio e o endotélio gástricos, recrutando neutrófilos e ativando a enzima NAPDH oxidase. Tal ativação culmina com a produção de espécies reativas de oxigênio através de uma cascata de ativação de eventos

intracelulares^{78,79,80}. Adicionalmente, HP-NAP estimula tanto os neutrófilos quanto os monócitos a produzirem interleucina-12 (IL-12) e interleucina-23 (IL-23)^{81,82}. Estas citocinas induzem as células T a secretarem interferon-gama (INF- γ) e mediar a resposta imune celular do tipo Th1⁸¹. É interessante notar que HP-NAP é o principal antígeno na resposta imunológica à infecção pelo *H. pylori*, constituindo a proteína de escolha para a produção de vacinas anti-*H. pylori*^{83,84}. Alguns ensaios clínicos nesta área já foram conduzidos^{82,85}.

Finalmente, o gene induzido pelo contato com as células epiteliais (*iceA*) também tem sido descrito como fator de virulência do *H. pylori*. Estudos mostraram que ele apresenta duas principais variantes alélicas: *iceA1* and *iceA2*. A expressão do alelo *iceA1* é regulada pelo contato do *H. pylori* com as células do epitélio gástrico⁸⁶. Segundo Arents et al. (2001)⁸⁷, existe associação significativa entre *iceA1* e a úlcera péptica. Pesquisadores também mencionaram a correlação do genótipo *iceA1* com o aumento da produção de IL-8 no processo inflamatório agudo antral.

1.1.4. Doenças extra gástricas associadas ao *H. pylori*

Baseando-se nas observações de que o *H. pylori* induz, na fase aguda da infecção, a produção de diversas substâncias pró-inflamatórias, e de que existe importante relação entre os antígenos bacterianos e o hospedeiro, estudiosos têm sugerido a participação da bactéria na patogênese de diferentes manifestações extra gástricas^{88,89}. Nesse contexto, admite-se que o processo inflamatório ocasionado pela infecção possa liberar substâncias que atuam à distância, podendo ocorrer ainda a mimetização molecular cruzada entre o *H. pylori* e os antígenos do hospedeiro⁸⁹.

Deste modo, a infecção pelo *H. pylori* pode estar relacionada ao desenvolvimento de doenças reumatológicas, articulares, dermatológicas, cardíacas, autoimunes, hematológicas, respiratórias, metabólicas e neurodegenerativas, assim como doenças pancreáticas, colorretais e hepatobiliares^{89,90,91,92,93,94,95,96,97,98}.

Dentre as doenças hematológicas, a púrpura trombocitopênica imunológica (PTI) e a anemia ferropriva de causa desconhecida têm merecido maior destaque^{99,100,101,102,103} e compreendem enfermidades nas quais o papel do *H. pylori* em sua patogenia é amplamente reconhecido⁷⁰. Estudos sobre a infecção pelo *H. pylori* nos indivíduos com PTI demonstram que a erradicação do patógeno parece favorecer o prognóstico em uma porcentagem considerável dos pacientes^{104,105,106}.

Desde que as espécies de *Helicobacter* foram isoladas de amostras de fígado de vários mamíferos, pesquisadores têm reforçado que estas bactérias podem estar envolvidas na etiopatogenia das hepatopatias crônicas, sobretudo do câncer hepático^{107,108}. Considerando os estudos que utilizaram tecido hepático humano, microrganismos semelhantes ao *H. pylori* foram inicialmente detectados em 1996 na mucosa da vesícula de pacientes com litíase biliar¹⁰⁹.

A partir de então, o papel da infecção pelo *H. pylori* nas doenças hepatobiliares foi extensamente estudado por diferentes pesquisadores. *Helicobacter* spp. foram identificadas na bile humana^{110,111} e vários manuscritos sugerem que elas podem sobreviver no suco biliar de pacientes com colelitíase, colangite esclerosante primária e cirrose biliar primária^{108,112,113,114}. Em um artigo de revisão, Pandey e Shukla (2009)¹¹⁵ verificaram que dos 205 casos de doenças hepatobiliares incluídos em 10 estudos, 115 (56%) foram positivos para o *H. pylori* enquanto que, dos 263 indivíduos do grupo controle, 53 (20%) apresentaram positividade para a bactéria. Os autores concluíram que existe importante evidência sugerindo a participação das espécies de *Helicobacter* no câncer do trato hepatobiliar.

Adicionalmente, outros pesquisadores concentraram seus esforços para verificar a possível associação entre a infecção pelo *H. pylori* e o desenvolvimento do CHC, em diferentes áreas geográficas. Alguns autores relataram alta prevalência de anticorpos anti-*H. pylori* em pacientes com cirrose, comparados com indivíduos não-cirróticos^{116,117,118}. Outros estudos detectaram com sucesso o DNA do *H. pylori* em amostras de fígado de pacientes com CHC^{94,119,120,121}.

Contudo, apesar de todos estes esforços, ainda permanecia uma questão importante no meio científico: estes achados correspondiam à verdadeira colonização pela bactéria ou a presença do DNA do *H. pylori* poderia resultar do seu transporte do estômago para o fígado? A resposta para esta pergunta foi solucionada quando do isolamento da bactéria em meio de cultura empregando amostras de fígado, reforçando a possibilidade da verdadeira colonização hepática pelo microrganismo^{90,95}.

1.2. Carcinoma hepatocelular

1.2.1. Informações epidemiológicas, clínicas e fatores de risco

O CHC é o principal tumor maligno primário do fígado, ou seja, o câncer derivado das principais células do fígado - os hepatócitos. Compreende uma doença de natureza agressiva, com altíssimo índice de óbito após o início dos sintomas, mais comumente icterícia e/ou ascite¹²². Trata-se do quinto tipo de câncer mais comum nos homens e o sétimo nas mulheres e, anualmente, estima-se que mais de meio milhão de casos são diagnosticados em todo o mundo. Dados mais recentes revelaram 748.300 novos casos de CHC e 695.900 mortos associados à doença^{123,124}. Adicionalmente, a prevalência varia de acordo com a localização geográfica, sexo, idade e etnia¹²⁵.

Em geral, a distribuição dos casos de CHC apresenta grande variação geográfica e sua maior incidência ocorre na Ásia oriental e África sub-Saariana, sendo maior que 20 por 100,000 indivíduos e onde a infecção pelo VHB é endêmica (prevalência do HbsAg é igual ou maior que 8%). Os países mediterrâneos como Itália, Espanha e Grécia apresentam taxas intermediárias de incidência, ou seja, 10-20 casos por 100,000 indivíduos, enquanto a América do Norte e América do Sul apresentam incidência baixa, ou seja, menor que 5 por 100,000 indivíduos¹²⁶. Entretanto, é importante ressaltar que o CHC relacionado ao vírus da hepatite tipo C (VHC) tornou-se causa em maior ascensão nos Estados Unidos, contribuindo para a crescente incidência do CHC no país¹²⁷. Adicionalmente, nos Estados Unidos, estudiosos chamam a atenção para o aumento crescente da obesidade e sua possível influência no desenvolvimento do CHC¹²⁸.

No Brasil, os dados clínicos e epidemiológicos sobre o CHC são escassos; uma pesquisa realizada em 1995 no município de São Paulo, segundo dados divulgados pelo Sistema Único de Saúde (SUS), demonstrou que a incidência do CHC foi 2,07 por 100,000 habitantes. A idade média dos doentes foi de 54,7 anos, existindo uma relação masculino/feminino de 3,4:1. A positividade para HbsAg foi de 41,6%; para o anti-HVC, de 26,9%; para a presença de alcoolismo crônico de 37%; e da cirrose de 71,2%¹²⁹.

Posteriormente, Leão-Filho et al. (2007)¹³⁰ verificaram associação do CHC com VHB (59%), VHC (38%) e até mesmo com o vírus da hepatite G (VHG) (28%) em pacientes do Nordeste Brasileiro. Os autores verificaram que a prevalência do VHG nos doadores de sangue da região foi 10%; entretanto, não consideraram a infecção exclusiva pelo VHG como fator relevante na etiologia do CHC.

Paranaguá-Vezozzo et al. (2014)¹³¹ demonstraram, em seu estudo coorte de 10 anos, que a incidência anual do CHC nos pacientes cirróticos foi cerca de 2,9% com uma taxa de detecção de 8,1%. Os autores relataram ainda que as três variáveis relacionadas ao risco para o desenvolvimento do CHC foram baixa albumina sérica, altas taxas de alfafetoproteína e etnia, sendo esta última uma comparação entre os brasileiros descendentes de asiáticos e outras misturas raciais.

Gonçalves et al. (2014)¹³² demonstraram que o maior fator de risco associado ao CHC no estado do Espírito Santo é a infecção pelo VHB, seguida pelo alcoolismo crônico individualmente ou em associação com o VHB e VHC. Mais recentemente, pesquisadores demonstraram que a incidência do CHC no município de São Paulo foi de 3,4 por 100,000 indivíduos (McGlynn et al., 2015)¹³³.

O desenvolvimento do CHC é atribuído a vários fatores, sendo que as infecções virais crônicas são consideradas seu principal fator de risco em 75 a 80% dos casos^{134,135}. Admite-se que o VHB e VHC são responsáveis por 50-55% e 25-30% dos casos, respectivamente^{136,137}.

Em 1994, a Agência Internacional de Investigação do Câncer (AIIC) classificou o VHB como agente carcinogênico para os humanos¹³⁴. Atualmente,

estima-se que 5% da população mundial (240-350 milhões de indivíduos) estejam cronicamente infectados pelo vírus¹³⁸. Nestes indivíduos, a carga viral é o principal fator de risco para o desenvolvimento do CHC^{139,140}. Com relação ao genótipo do VHB, foram identificados 8 principais tipos (A a H) e vários subgenótipos, sendo o genótipo C mais frequentemente associado ao desenvolvimento do CHC quando comparado com os genótipos A2, Ba, Bj e D¹⁴¹. Estimativas sugerem que, anualmente, 780,000 indivíduos infectados cronicamente pelo vírus morrem devido ao CHC e doença hepática crônica, sendo que 35 a 87 milhões dos sujeitos atualmente infectados provavelmente morrerão devido ao CHC¹⁴².

O VHC também foi considerado carcinógeno pela AIIIC em 1994. O risco estimado para o desenvolvimento do CHC nos indivíduos infectados pelo vírus comparados com aqueles não infectados varia de 20 a 30 na maioria dos estudos epidemiológicos¹³⁴. Autores relatam forte evidência da interação entre consumo de álcool excessivo e infecção pelo VHC como fatores de risco para o desenvolvimento do CHC^{143,144,145}, assim como a co-infecção entre VHB e VHC^{146,147}. Considerando que a maioria dos casos de CHC associado ao VHC ocorrem na presença de cirrose hepática (CH)¹⁴⁸, a infecção pelo VHC pode induzir o desenvolvimento do CHC, tanto indiretamente através do dano tecidual mediado pelo sistema imunológico, quanto pelo processo de renovação celular dos hepatócitos¹³⁴.

Outro importante fator de risco para o desenvolvimento do CHC é o consumo excessivo de álcool, pois esta substância está relacionada ao surgimento da CH. É reconhecido que o álcool atua em sinergismo com as infecções pelo VHB e VHC, podendo acelerar o processo de fibrose e favorecer a progressão para a CH¹²⁶. Uma recente meta-análise envolvendo 19 estudos prospectivos estimou um aumento de 16% no risco para o desenvolvimento do CHC entre os indivíduos que consumiam três ou mais doses diárias de álcool, sendo que, para aqueles que consumiram seis ou mais doses diárias, este risco foi elevado para 22%¹⁴⁹. Outro estudo revelou que o risco para o CHC aumentou proporcionalmente com o consumo excessivo de álcool (>60g/dia) e este risco era duplicado nos indivíduos infectados pelo VHC¹⁵⁰. De maneira semelhante,

pacientes infectados pelo VHB apresentaram risco três vezes maior para o CHC devido ao consumo excessivo de álcool¹⁵¹.

Os casos de CHC ocorrem, em sua maioria, devido à CH presente nas infecções crônicas pelo VHB e/ou VHC, consumo excessivo de álcool e doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA)¹⁵². A incidência global de CHC nos indivíduos cirróticos varia de 3,4% a 5,6% e a presença de CH irá afetar o prognóstico e o tratamento destes pacientes^{153,154}. Dados recentes revelaram que o número de mortes em decorrência da CH aumentou de 676,000 em 1980 para mais que 1 milhão em 2010¹⁵⁵. Independentemente de sua etiologia, a CH constitui um microambiente favorável à iniciação e ocorrência da carcinogênese, promovendo alterações genéticas e transformação celular nos hepatócitos^{156,157,158,159}. Durante a CH, há acúmulo de fibras de colágeno e outros componentes na matriz extracelular, culminando com alterações na estrutura hepática caracterizadas pela fibrose¹⁶⁰. A gravidade da fibrose está correlacionada com o aumento do risco para o desenvolvimento do CHC, especialmente nos pacientes infectados pelo VHC^{161,162}.

A aflatoxina é uma micotoxina produzida por espécies de *Aspergillus* (*Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*) que contamina grãos, milho, amendoim e soja e tem sido associada como fator de risco para o CHC¹²⁶. A AFB1 é a aflatoxina mais potente e a associação sinérgica entre AFB1 e a infecção pelo VHB tem sido considerada como importante fator de risco para o CHC^{163,164}. A erradicação da AFB1 dos alimentos é uma importante estratégia para reduzir a incidência do CHC¹⁶⁵. Na China, por exemplo, onde o programa de erradicação foi implantado, observou-se notável redução nas taxas do CHC¹⁶⁶.

A DHGNA é considerada a causa mais importante das hepatopatias crônicas nos Estados Unidos¹²⁶ e, juntamente com a esteatohepatite não alcoólica (EHNA), pode estar associada ao desenvolvimento do CHC. Estudos do tipo coorte demonstraram que o risco para o CHC em pacientes cirróticos com DHGNA foi menor quando comparado ao risco nos indivíduos cuja cirrose estava associada à hepatite viral. Ainda nestes estudos, foi demonstrado aumento de risco para o CHC nos pacientes com EHNA^{167,168,169,170,171,172}. Entretanto, dois

estudos populacionais em indivíduos com estas enfermidades mostraram, respectivamente, nenhum aumento na incidência do CHC e 0,3% de risco para o desenvolvimento do câncer quando os pacientes foram acompanhados por seis anos^{173,174}.

Mais recentemente, a obesidade, o diabetes tipo II e a síndrome metabólica, relacionadas à DHGNA, têm sido associadas como fator de risco para o desenvolvimento do CHC e sua frequência está aumentando em todo o mundo¹³³. Estudos envolvendo cada uma destas doenças isoladamente também indicam sua possível participação na etiopatogenia do CHC. Uma meta análise envolvendo 11 estudos do tipo coorte demonstrou que o risco relativo para o CHC foi 1.17 (95%-IC 1.02-1.34) e 1.89 (95% IC 1.51-2.36) quando foram comparados, respectivamente, indivíduos com peso ideal e obesos¹⁷⁵. Autores sugerem que os efeitos da obesidade no CHC devem ser mediados, pelo menos em parte, pela forte associação entre o sobrepeso e o diabetes mellitus¹⁷⁶.

Alguns estudos do tipo meta-análise sobre o papel do diabetes no desenvolvimento do CHC demonstraram, consistentemente, que o risco relativo foi 2,0 a 2,5 entre várias populações distintas e mostrou-se independente de outros fatores de risco para o CHC^{177,178,179,180}. Particularmente, o diabetes aumenta o risco para a DHGNA, que se caracteriza pelo aumento de gordura no fígado e pode ocasionar a progressão da esteatose hepática para a EHNA. A EHNA, por sua vez, consiste em uma condição mais agressiva e pode progredir para a fibrose, CH e, finalmente, para o CHC¹⁸¹. É interessante notar que, apesar da infecção pelo VHB e VHC constituir o principal fator de risco para o CHC nos países desenvolvidos, os riscos relativos do diabetes, obesidade e síndrome metabólica estão se tornando mais prevalentes nos países em desenvolvimento.

Outros fatores de risco para o desenvolvimento do CHC e descritos menos comumente incluem a hemocromatose hereditária, deficiência de Alfa1-antitripsina, doença de Wilson, microcistina, hepatite autoimune, algumas porfirias e fatores genéticos do hospedeiro^{120,126,182,183,184,185}.

A hemocromatose hereditária (HH) é uma doença autossômica recessiva caracterizada pela absorção excessiva do ferro e sua deposição subsequente nas células do parênquima do fígado, pâncreas, nas juntas e na hipófise. A

sobrecarga de ferro pode, ocasionalmente, induzir o desenvolvimento de cirrose e CHC¹⁸⁶. Dados atuais demonstram que existe risco 20 vezes maior de indivíduos com HH desenvolverem o CHC, sendo este risco em 10 anos de 6% para os homens e 1,5% para as mulheres¹⁸⁷.

A alfa-1-antitripsina é a principal proteinase inibidora do soro humano e é codificada pelo gene AAT no cromossomo 14. A deficiência de alfa-1-antitripsina homozigótica (fenótipo PiZZ) é a doença genética mais comumente relacionada à doença hepática em crianças e, nos adultos, está relacionada ao aumento de risco para a cirrose e o câncer primário de fígado^{188,189}.

A doença de Wilson é uma enfermidade autossômica recessiva do gene *ATP7B* que resulta no metabolismo deficiente do cobre e afeta, principalmente, o fígado e o cérebro¹⁹⁰. As manifestações hepáticas da doença são caracterizadas, histologicamente, pela esteatohepatite que poderá desencadear a CH. Entretanto, como a maioria dos casos da doença de Wilson é diagnosticada e tratada precocemente, o risco de desenvolvimento do CHC é considerado baixo¹⁹¹. Recentemente, um estudo multicêntrico europeu incluindo 1186 pacientes com a doença, demonstrou que apenas 14 desenvolveram tumores malignos no trato hepatobiliar e destes, 8 apresentaram o CHC. A prevalência das doenças hepatobiliares foi 1,2% e a incidência foi 0,28 para 1000 casos por ano¹⁹².

A microcistina é uma toxina produzida na água por algas azuis do gênero *Microcystis*. Ela tem sido associada como fator promotor para o desenvolvimento do CHC pois induz severa hemorragia intra-hepática e necrose do fígado¹⁹³. Estudos *in vitro* e *in vivo* envolvendo humanos e ratos mostraram que microcistina pode exercer efeitos hepatotóxicos e promover alterações no citoesqueleto¹⁹⁴. Pesquisas epidemiológicas na China confirmaram o papel da toxina na incidência do CHC e, por esse motivo, o maior controle dos reservatórios de água tem sido realizado¹⁹⁵.

O CHC tem sido considerado uma complicação rara da cirrose secundária à hepatite autoimune (HAI). Estudando 243 pacientes com HAI, pesquisadores detectaram o CHC em apenas 15 deles, revelando uma taxa de incidência de

1,1%; neste estudo, foi verificado ainda que o CHC ocorreu na mesma proporção em ambos os sexos e estava frequentemente associado à cirrose¹⁹⁶. Resultados semelhantes foram descritos por outros estudiosos que confirmaram o desenvolvimento do CHC nos pacientes com HAI e cirróticos^{197,198}.

A porfiria é o resultado de deficiências enzimáticas na biossíntese da cadeia heme. Existem dois tipos desta enfermidade que têm sido associados ao risco aumentado para o CHC: a porfiria cutânea tardia e a porfiria intermitente aguda^{199,200}. A porfiria cutânea tardia é o tipo mais comum e também foi associada à infecção pelo VHC²⁰¹.

Adicionalmente, fatores genéticos do hospedeiro podem exercer influência na progressão do CHC. Resultados de duas meta-análises demonstraram variantes do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) associados ao alto risco para o desenvolvimento da doença. Foi verificado que as variantes TNF- α 308 AA e AG (comparadas à variante GG) estavam associadas com aumento significativo do risco para o CHC^{202,203}. Outro importante estudo concluiu que os genótipos nulos (GSTM1 ou GSTT1) dos genes da enzima glutationa-S-transferase (GST) também estavam relacionados ao aumento do risco para a enfermidade²⁰⁴.

Contudo, existem pacientes cujos fatores de risco para o CHC não são identificados. Estudiosos têm relatado a possível participação de bactérias no desenvolvimento de tumores. Nesse contexto, o *H. pylori* é considerado carcinogênico do tipo I e está associado ao carcinoma gástrico distal e ao linfoma gástrico do tipo MALT. Com base nesses achados, espécies de *Helicobacter* têm sido, potencialmente, consideradas como fator de risco na etiopatogenia do CHC.

1.2.2. O papel do *H. pylori* como fator de risco para o CHC

Existem vários estudos correlacionando a presença do *H. pylori* no fígado ao desenvolvimento do CHC. Avenaud et al. (2000)¹¹⁹ detectaram a bactéria em 100% (8/8) dos fragmentos hepáticos estudados através da PCR. Em 2001, pesquisadores suecos identificaram *Helicobacter spp.* em pacientes com

colangiocarcinoma e CHC²⁰⁵. Estudando pacientes com hepatite crônica, CH e CHC, Dore et al. (2002)¹²⁰ utilizaram a sorologia e a PCR para a pesquisa da infecção pelo *H. pylori*. Os resultados demonstraram que 54% dos pacientes apresentaram sorologia positiva para a bactéria, sendo que a prevalência da infecção foi maior nos pacientes com CHC (73%) quando comparada aos pacientes com CH (58%) e hepatite crônica (39%). O DNA de *Helicobacter* foi detectado no fígado de 17% dos pacientes cirróticos e 55% dos indivíduos com CHC.

Verhoef et al. (2003)²⁰⁶ revelaram a presença do DNA de *Helicobacter* em 45% das amostras de fígado de pacientes com CHC em contraste com 10% das amostras positivas no grupo controle. A análise da sequência dos fragmentos indicou similaridade com o DNA do *H. pylori*; neste estudo os autores também verificaram semelhança na sequência do DNA bacteriano obtido de três amostras gástricas dos pacientes com CHC e que apresentaram cultura positiva para o microrganismo, sugerindo que o fígado é colonizado pela mesma cepa de *H. pylori* existente no estômago.

Em 2004, Pellicano et al. (2004)²⁰⁷ confirmaram a presença do DNA de *Helicobacter spp.* em 17 de 20 (85%) das amostras hepáticas de pacientes com CHC e em 33% das amostras controles. No ano seguinte, Rocha et al. (2005)⁹⁴ demonstraram que o DNA do *H. pylori* foi encontrado em 3,5% das amostras de tecido hepático de indivíduos com hepatite crônica pelo VHC não cirróticos, 68% das amostras de pacientes com VHC e cirrose e 61,3% das amostras de pacientes com VHC, CH e CHC. Observando as amostras de tecido hepático tumoral os autores verificaram que 90,5% foram positivas para o 16S rDNA do *Helicobacter*.

Adicionalmente, vários manuscritos associaram o *H. pylori* com a presença do VHB no desenvolvimento do CHC. A prevalência dos anticorpos anti-*H. pylori* em pacientes infectados pelo VHB é significativamente maior quando comparada aos pacientes sem infecção viral^{117,118,208,209,210,211,212,213}. Deste modo, acredita-se na possibilidade de que a co-infecção do *H. pylori* com o VHB ou VHC resulte na progressão da CH para o CHC, reforçando a existência de uma cooperação sinérgica entre a bactéria e os vírus na etiopatogenia do CHC¹³⁵.

O mecanismo pelo qual o *H. pylori* coloniza o fígado humano não está totalmente esclarecido. A detecção do DNA no tecido hepático pode resultar da translocação bacteriana do estômago para o sangue através do sistema portal, especialmente nos estágios mais avançados das hepatopatias crônicas, quando ocorre a hipertensão portal^{135,214,215}. Além disso, a bactéria pode alcançar o fígado através de fagócitos e macrófagos circulantes ou por transferência retrógrada a partir do duodeno⁹⁰. Todavia, os estudos envolvendo o cultivo do *H. pylori* a partir do fígado de pacientes com CHC reforçam a colonização pela bactéria descartando a possibilidade de contaminação retrógrada^{90,95}.

Além disso, um aspecto importante a ser considerado no sistema hepatobiliar é a presença de bile, que apresenta potente atividade antimicrobiana. Acredita-se que a adaptação de *Helicobacter* spp. à bile pode ser um fator crucial para a invasão e o estabelecimento da infecção crônica no sistema hepatobiliar. Admite-se que a bactéria possa ser eliminada ou transportada para o intestino, onde ocorreria seu contato inicial com pequena quantidade de bile. É sabido que os ácidos biliares conjugados com glicina e taurina inibem o crescimento do *H. pylori in vitro*²¹⁶. Entretanto, estes sais biliares podem ser precipitados pelo ácido gástrico e, nos indivíduos que apresentam níveis aumentados de ácido no duodeno, tal precipitação ofereceria a oportunidade que o *H. pylori* necessita para se adaptar e invadir o novo ambiente¹³⁵. Cabe ressaltar ainda que, apenas *Helicobacter* spp. e nenhuma outra bactéria do trato digestivo foi associada à hepatocarcinogênese humana^{217,218}.

Os modelos experimentais de camundongos infectados por *H. hepaticus* reforçam que a bactéria é capaz de induzir hepatite crônica ativa e CHC em diferentes cepas de animais^{107,219}. Além disso, as espécies entéricas de *Helicobacter* são capazes de produzir toxinas que podem provocar dano hepatocelular *in vivo*²²⁰. Além das toxinas, *Helicobacter* spp. podem induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, contribuindo para o desenvolvimento do câncer através do dano no DNA, estimulação do crescimento, aumento da sobrevivência, invasão e angiogênese no tecido do hospedeiro²²¹. De modo semelhante, acredita-se que o *H. pylori* poderia atuar no fígado humano e participar do desenvolvimento do CHC.

Em um estudo empregando cultura de hepatócitos humanos infectados pelo *H. pylori*, Ito et. al (2008)²²² demonstraram que a bactéria é capaz de se aderir e penetrar no interior dos hepatócitos. Os autores sugerem que o processo de interiorização nos hepatócitos pode ser uma estratégia do *H. pylori* para evitar a reação imunológica do hospedeiro e permanecer no fígado, resultando em mudanças na morfologia e fisiologia das células hepáticas.

Além dos mecanismos de evasão do sistema imune do hospedeiro, a bactéria apresenta fatores de virulência que, comprovadamente, estão associados à carcinogênese gástrica. Dentre estes fatores, a detecção dos genes *cagA* e *vacA* em amostras de fígado de pacientes com CHC pode sugerir o seu papel na carcinogênese hepática^{120,212,223}.

Embora os estudos sobre o papel do *H. pylori* na etiopatogenia do CHC tenham sido mais frequentes na última década²²⁴, a maioria deles apresenta natureza prospectiva. Isso se deve ao fato dos estudos retrospectivos geralmente empregarem amostras de tecido hepático parafinado, o que muitas vezes é considerado um fator limitante, pois o DNA destas amostras pode não apresentar condições propícias para a amplificação.

Entretanto, a escolha dos tecidos parafinados como fonte para obtenção de DNA tem sido uma ferramenta bastante útil na compreensão das doenças. Para os geneticistas este material é empregado na investigação de doenças hereditárias; os oncologistas utilizam os tecidos parafinados no estudo das mutações e na identificação das metástases, assim como os patologistas podem estabelecer melhor relação entre as alterações histopatológicas e a possível presença de agentes infecciosos^{225,226,227,228,229}.

Todavia, durante o processo de fixação tecidual, dependendo do tempo e do tipo do fixador utilizado, pode ocorrer a degradação do material genético. Pesquisas demonstram que os resíduos de formol podem inibir a ação da enzima proteinase K (PK), interferindo no processo de digestão tecidual durante a extração de DNA²³⁰. Adicionalmente, o processo de fixação também pode ocasionar a fragmentação do material genético pois, além das ligações cruzadas que se formam entre proteínas e o DNA no interior dos tecidos, ocorre a

transformação gradual do formol em ácido fórmico, resultando na hidrólise do material genético^{231,232}.

Assim, é aconselhável que sejam escolhidos fragmentos de DNA com menor número de pares de base (pb) para a amplificação, geralmente aqueles que não ultrapassem 300pb^{232,233,234,235}. Apesar destas implicações, alguns pesquisadores realizaram com sucesso a detecção do *H. pylori* e dos seus fatores de virulência (genes *vacA* e 26 kDa) empregando amostras parafinadas de tecido hepático^{120,121,204,217,236,237}

Deste modo, os estudos sobre o papel do *H. pylori* no desenvolvimento do CHC sugerem a participação da bactéria no processo da carcinogênese hepática. Acredita-se que o patógeno possa atuar no CHC de modo semelhante ao que ocorre no câncer gástrico onde seu papel é amplamente reconhecido. Assim, a realização de novos estudos é fundamental para determinar se o *H. pylori* exerce seu efeito de forma isolada ou em associação com outros fatores de risco previamente estabelecidos para a gênese do CHC.

1.3. Justificativa:

Considerando que 1) O carcinoma hepatocelular representa importante papel epidemiológico mundial; 2) O papel do *Helicobacter pylori* como possível fator de risco para o desenvolvimento do CHC tem sido descrito; 3) Os estudos correlacionando o papel do *H. pylori* no CHC e que utilizam tecido hepático parafinado são escassos no Brasil, a realização deste estudo foi de suma importância para melhor elucidar a possível participação desta bactéria na etiopatogenia do CHC.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral:

- Amplificar e sequenciar o gene 16S rRNA do *H. pylori* em amostras fixadas e emblocadas de tecido hepático não tumoral de pacientes com CHC.

2.2. Objetivos específicos:

- Utilizar a técnica de microdissecção e captura a laser (MCL) para confirmação diagnóstica e padronização do sequenciamento do gene 16S rRNA do *H. pylori*;
- Comparar os resultados obtidos com a pesquisa do *H. pylori* nos pacientes com CHC em fragmentos parafinados de indivíduos sem doença hepática;
- Verificar se a presença da bactéria está relacionada à maior gravidade da doença hepática nos pacientes com CHC.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Casuística:

Foram utilizadas 86 amostras fixadas e emblocadas de tecido hepático de pacientes atendidos no Ambulatório de Lesões Focais Hepáticas, no Ambulatório de Transplante Hepático e no Ambulatório de Hepatopatias Crônicas da Disciplina de Gastroenterologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas/FCM da Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP. Trata-se, portanto, de um estudo retrospectivo.

Todas as amostras pertencem ao arquivo do Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da UNICAMP. Foram selecionados blocos de parafina incluídos entre 2008 a 2012.

O diagnóstico do CHC foi realizado por dados clínico-laboratoriais, incluindo marcadores tumorais como a alfafetoproteína, exames de imagem (ultrassonografia abdominal, tomografia axial computadorizada e ressonância magnética) e estudo histopatológico.

As amostras foram divididas em dois grupos:

- **Grupo A (GA):** composto por 57 amostras de tecido hepático não tumoral de pacientes com CHC e CH.

- **Grupo B (GB):** composto por 29 amostras de fígado parafinado de indivíduos sem doença hepática, constituindo o grupo controle.

3.1.1. Critérios de inclusão:

- Amostras de pacientes com CH e CHC (grupo GA) independentemente dos fatores de risco para o desenvolvimento da doença hepática. As amostras foram obtidas durante o transplante hepático (fígado explantado), por nodulectomia ou biópsias hepáticas cirúrgicas (em cunha).

- Amostras de indivíduos com alterações histológicas mínimas ou dentro dos limites de normalidade (grupo GB), obtidas durante o transplante hepático (fígado de doadores no tempo zero) e realizadas por agulha. Também foram incluídas neste grupo, amostras de fígado histologicamente classificado como

reacional, obtidas por agulha nos pacientes não doadores, atendidos nos ambulatórios do Hospital de Clínicas da Unicamp.

- Os pacientes eram de ambos os gêneros e com idade igual ou superior a 18 anos.

3.1.2. Critérios de exclusão:

- Amostras de pacientes que não apresentavam cirrose, mesmo na presença do CHC.

- Amostras que haviam sido incluídas em blocos de parafina há seis anos ou mais, para evitar o risco de maior degradação do material genético.

- Pacientes que receberam tratamento prévio para a infecção pelo *H. pylori*.

- Pacientes cuja CH e CHC estavam associados à hepatite autoimune.

3.1.3. Fonte de dados:

Os resultados de exames e as pastas de acompanhamento dos pacientes foram avaliados no Serviço de Arquivo Médico (SAM) do Hospital das Clínicas da UNICAMP. Para verificar a relação entre a presença da bactéria e a severidade da doença hepática, os dados do escore Child-Pugh²³⁸ e Model for End Stage-Liver Disease (MELD) foram obtidos no grupo GA (CHC).

3.1.4. Aspectos éticos:

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP e aprovado segundo o parecer nº 414.616 (Anexo 1). Considerando sua natureza retrospectiva, dispensou-se o preenchimento do “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” no desenvolvimento do estudo, de acordo com a Resolução nº 347/05 do Conselho Nacional de Saúde.

3.2. Métodos:

3.2.1. Extração de DNA:

Inicialmente foi realizado um estudo piloto utilizando cinco diferentes métodos de extração. Destes métodos, quatro constituíram *kits* comerciais (1- QIAamp DNA FFPE Tissue e 2- QIAamp DNA Mini Kit, ambos da Qiagen Inc., Chatsworth, California, USA; 3- Wizard SV Genomic DNA Purification System e 4- ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System, ambos da Promega Corp., Madison, WI, USA) e foram comparados à metodologia do fenol/clorofórmio (Anexo 3). Os resultados demonstraram que a técnica do fenol/clorofórmio apresentou maior rendimento final de DNA²³⁹, sendo posteriormente empregada na extração das 86 amostras incluídas no presente estudo.

Para a extração, foram obtidos de 2 a 5 cortes de tecido hepático de cada amostra, com 5µm de espessura, e adicionados em microtubo de 1,5 ml. Em seguida, os tecidos foram desparafinizados através de três banhos consecutivos em 1,0 ml de xilol. Posteriormente, foram rehidratados em 500µl de solução de etanol em concentrações decrescentes (100%, 95% e 70%). Em cada uma destas etapas, os cortes histológicos foram centrifugados a 12.000 rpm por cinco minutos.

Após a desparafinização e rehidratação, foi realizada a extração e purificação do DNA pelo método do fenol/clorofórmio²³⁹. Durante a digestão tecidual em PK as amostras permaneceram em banho-maria úmido a 56°C por, no mínimo, dezoito horas.

3.2.2. Quantificação e análise da pureza do DNA:

Para quantificar e verificar a pureza do DNA extraído, alíquotas de 1µl de cada amostra foram analisadas por espectrofotometria a 230nm utilizando o Nanodrop (NANODROP ND - 1000 Full Spectrum UV/Vis Spectrophotometer - Wilmington, DE 19810 - USA). O valor de referência da razão A260/280 durante a leitura deve estar entre 1,7 e 2,0 para que o DNA seja considerado viável para a amplificação²⁴⁰.

3.2.3. Amplificação do gene da betaglobina humana:

Após a análise espectrofotométrica, foi realizada a amplificação do gene da betaglobina humana através da reação em cadeia da polimerase (PCR), visando o controle de qualidade do material extraído²⁴¹. As sequências dos iniciadores utilizados e o tamanho do produto amplificado estão descritos na Tabela 1.

Cada reação apresentou volume final de 20µl contendo 10% de tampão, 1,5mM de cloreto de magnésio, 20 pmol de cada iniciador, 2,5 mM de cada dideoxynucleotídeo trifostato, 0,2µl de Platinum DNA Taq Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) e 1,0µl de amostra. Todas as reações foram realizadas no termociclador (PTC-100, MJ Research Inc., Watertown, MA) e tiveram como controle positivo DNA extraído de soro humano; para o controle negativo utilizou-se água bidestilada.

3.2.4. Amplificação do gene 16S rRNA para detecção do *H. pylori*:

Posteriormente à amplificação do gene da betaglobina, a detecção do *H. pylori* foi realizada através da PCR para o gene 16S rRNA segundo metodologia descrita por Pirouz et al. (2009)²³⁷, com algumas modificações. As sequências dos iniciadores utilizados e o tamanho do produto amplificado estão descritos na Tabela 1.

Cada reação apresentou volume final de 25µl contendo 10% de tampão, 1,5mM de cloreto de magnésio, 20 pmol de cada iniciador, 2,5 mM de cada dideoxynucleotídeo trifostato, 0,25µl de Platinum DNA Taq Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) e 2,0µl de amostra. Todas as reações foram realizadas em duplicata no termociclador (PTC-100, MJ Research Inc., Watertown, MA) e permaneceram por dois minutos a 94°C para denaturação inicial, passando por 35 ciclos de 94°C por trinta segundos, 55°C por trinta segundos para o anelamento dos iniciadores, 72°C por quarenta e cinco segundos para a extensão, seguindo dez minutos para a extensão final.

O controle positivo da reação constituiu uma amostra de DNA obtida de tecido gástrico parafinado de paciente com gastrite associada à infecção pelo *H. pylori*. Para o controle negativo foi utilizada água bidestilada.

3.2.5. Análise dos produtos da PCR:

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (w/vol) e corados com brometo de etídio para posterior visualização no transiluminador UV e digitalização das imagens. Para a amplificação do gene da betaglobina, as amostras foram consideradas positivas quando da obtenção de um produto final de 110pb. Com relação à amplificação do gene 16S rRNA, as amostras foram consideradas positivas quando as duas reações realizadas por amostra apresentaram produto final de 139pb.

Tabela 1. Descrição dos pares de iniciadores utilizados na amplificação dos genes da betaglobina humana e 16S rRNA do *H. pylori*

Gene/Iniciadores	Sequência (5'-3')	Tamanho/Bibliografia
<i>Betaglobina</i>		
PCO3	ACACAACGTGTGTTCACTAGC	110pb
PCO4	CAACTTCATCCACGTTTCAC	Saiki et al., 1988
<i>16S rRNA</i>		
JW21	GCGACCTGCTGGAACATTAC	139pb
JW22	CGTTAGCTGCATTACTGGAGA	Pirouz et al., 2009
PCO3/PCO4 e JW21/JW22: par de iniciadores pb= pares de bases		

3.2.6. Coloração imunohistoquímica (IHQ) para detecção do *H. pylori*:

Considerando 1) as dificuldades relativas à padronização da PCR para detecção da bactéria no tecido hepático parafinado; 2) a necessidade de exclusão das reações falso-positivas e 3) a necessidade de obtenção de um caso controle positivo das amostras, foi realizada a coloração imunohistoquímica em

duas lâminas diferentes de uma mesma paciente cuja PCR para o gene 16S rRNA apresentou resultado positivo em vários fragmentos do fígado. As lâminas foram enviadas para a Divisão de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina/USP em São Paulo, sob supervisão da Profa. Dra. Sheila Aparecida Coelho Siqueira. A coloração foi realizada naquele serviço conforme metodologia previamente padronizada.

3.2.7. Sequenciamento:

Os produtos da PCR foram recortados do gel com o auxílio de bisturi descartável e purificados utilizando o kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corp., Madison, WI, USA).

A reação de seqüenciamento foi realizada contendo 1,0µl do produto da PCR, 2,0µl de tampão Big Dye versão 3.1, 3,2 pmol de cada iniciador e 1,0µl de Big Dye versão 3.1 no volume final de 20µl. Os tubos de reação foram submetidos a 96°C por 1 minuto, seguido por 30 ciclos de denaturação a 96°C por 15 segundos, anelamento a 50°C por 15 segundos e extensão a 65°C por 4 minutos. Em seguida, para a precipitação das amostras, foram adicionados 5µl de solução de EDTA a 0,125mM e 60µl de etanol absoluto e os tubos permaneceram em temperatura ambiente por 15 minutos. Então, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 20 minutos e o excesso de etanol foi removido. Foram adicionados 60µl de etanol a 70% e os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm por 15 minutos. Para finalizar, todo o etanol foi removido e os tubos secaram em temperatura ambiente por 10 minutos. Para a denaturação, foram adicionados 13µl de formamida e os tubos permaneceram a 95°C por 2 minutos e foram incubados em banho de gelo por mais 2 minutos. O sequenciador utilizado foi o ABI 3500xL (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os cromatogramas foram analisados empregando-se o programa Chromas versão gratuita 2.33 (Technelysium Pty Ltda., <http://www.technelysium.com.au>) e o alinhamento das bases (BLAST) foi feito no endereço eletrônico <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.

3.2.8. Microdissecção e Captura a Laser (MCL):

A metodologia da MCL foi realizada segundo metodologia descrita por Rabelo-Gonçalves et al. (2013)¹²¹.

A) Preparo tecidual: Seis amostras do grupo GA (CHC) e uma amostra do grupo GB (controle) positivas para o gene 16S rRNA do *H. pylori* foram selecionadas e dois a três cortes de 10µm de cada uma delas foram preparados nas lâminas especiais para a microdissecção (MembraneSlide 0.17mm PEN, Carl Zeiss, Göttingen, Germany) e corados pelo método de carbol-fucsina (Rocha et al., 1989, com modificações)²⁴².

B) Microdissecção bacteriana: as lâminas coradas foram visualizadas a 600X no sistema PALM Microbeam Observer Z.1 (Zeiss, Göttingen, Germany) para identificação das bactérias. As áreas contendo microrganismos foram selecionadas e microdissecadas juntamente com a membrana das lâminas através de emissão única de laser. As amostras foram ejetadas para o microtubo (AdhesiveCap 500 opaque, Carl Zeiss, Göttingen, Germany) e armazenadas a -80°C até o momento da extração do DNA.

C) Extração de DNA, PCR e sequenciamento: após a microdissecção, foram adicionados 100µl de tampão em cada microtubo contendo 0,03% de proteinase K (Promega), 10mM Tris-HCl (pH 8,0), 1mM EDTA e 1% de Tween 20. Após a adição do tampão, os tubos foram incubados em temperatura ambiente, com a posição invertida, por 30 minutos e em seguida foram levados ao banho-maria úmido a 55°C por três horas para digestão celular. Posteriormente, foram incubados a 95°C por cinco minutos para inativação da PK e o extrato bruto foi armazenado a -20°C e utilizado diretamente na PCR e seqüenciamento do gene 16S rRNA conforme descrito, respectivamente, nos itens 3.2.4. e 3.2.7.

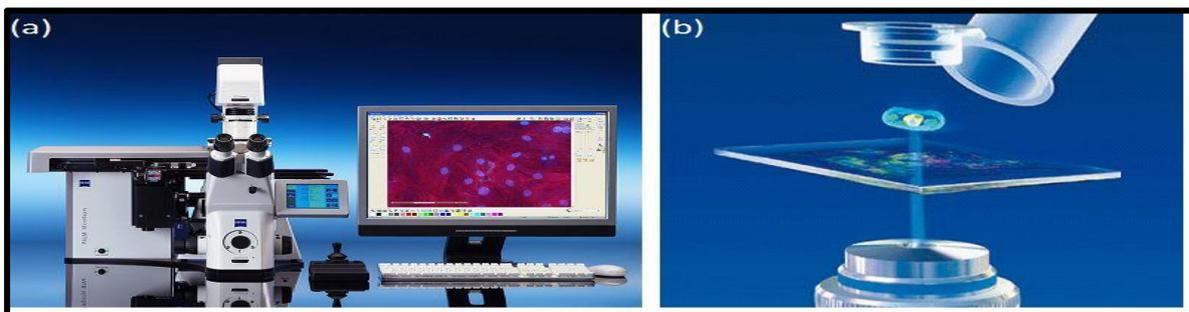


Figura 1. Imagens do sistema de microdissecção e captura a laser. (a): sistema completo PALM MicroBeam (www.zeiss.de). (b): caminho do feixe de laser e captura celular.

3.2.9 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET):

Duas amostras parafinadas do grupo GA e positivas para o gene 16S rRNA foram submetidas à técnica de microscopia eletrônica de transmissão para visualização da morfologia bacteriana no tecido hepático. O preparo tecidual bem como a visualização das amostras foi realizado segundo metodologia utilizada no setor de Microscopia Eletrônica do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, sob supervisão da Profa. Dra. Cecília Amélia F. Escanhoela.

3.2.10. Estatística:

Para a comparação das proporções foi utilizado o teste do Qui-quadrado ou teste exato de Fischer quando necessário. Para comparação das medidas numéricas entre os dois grupos foi utilizado o teste de Mann-Whitney exato. O programa computacional utilizado foi o SAS System for Windows (Statistical Analysis System), versão 9.4. SAS Institute Inc, 202-2012, Cary, NC, USA. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $p\text{-valor} \leq 0.05$. O estudo estatístico dos dados foi realizado pelo setor de Estatística da Câmara de Pesquisa da FCM/UNICAMP.

4. RESULTADOS:

4.1. Casuística:

4.1.1. Grupo GA: Dos 57 pacientes incluídos no grupo GA, 49 (86.0%) pertenciam ao sexo masculino e 8 (14.0%) eram do sexo feminino. A média da idade dos pacientes foi 53,5 anos (34-73±9,1) (Tabela 2).

Com relação aos fatores de risco para o desenvolvimento do CHC, 46 pacientes (80,7%) apresentaram infecções virais, sendo que 39 (68,4%) eram infectados pelo VHC, seis (10,5%) eram positivos para o VHB e um (1,75%) apresentou coinfeção pelo VHC e VHB. A etiologia da doença hepática também foi relacionada à hemocromatose em cinco pacientes (8,8%), deficiência de α -1-antitripsina em um (3,6%), ingestão de álcool em 34 (59,6%) e foi considerada criptogênica em três indivíduos (5,3%) (Tabela 3 e Apêndice 1). Adicionalmente, vários pacientes apresentaram mais que um fator de risco para a etiologia do CHC (Apêndice 1). Com relação à ingestão de álcool, 8 (23,5%) pacientes apresentaram exclusivamente este fator de risco. Além disso, 23 pacientes (40,3%) tinham o consumo de álcool associado ao VHC, sendo que 10 deles amplificaram o gene 16S rRNA (43,5%). Houve associação do álcool com VHB em dois pacientes (3,5%) e com hemocromatose em um deles (1,75%).

4.1.2. Grupo GB: Dos 29 pacientes incluídos no grupo GB, 12 (41,4%) eram masculinos e 17 (58,6%) pertenciam ao sexo feminino. A média da idade destes pacientes foi 40 anos (18-67±14,4) (Tabela 2).

Comparando os dados referentes à idade e sexo entre os dois grupos notou-se que, no grupo GA, os pacientes apresentaram média maior de idade ($p < 0.001$) e maior proporção de indivíduos do sexo masculino ($p < 0.001$) (Tabela 2).

Tabela 2. Características demográficas e resultado da PCR para o gene 16S rRNA do *H. pylori* nos dois grupos do estudo

	GA (CHC)	GB (Controle)	p-valor
(n)	57	29	
Sexo (M/F)	49/8	12/17	<0.0001 ¹
Idade (anos)	53.5±9.1 (34.0-73.0)	40.0±14.4 (18.0-67.0)	<0.0001 ²
PCR positivo	28 (49.1%)	8 (27.6%)	0.056 ²
PCR negativo	29 (50.9%)	21 (72.4%)	

¹ Teste de Mann-Whitney ²Teste do Qui-quadrado GA= grupo carcinoma hepatocelular (CHC); GB= grupo controle

Tabela 3. Fatores de risco para o CHC no grupo GA e sua relação com a presença do *H. pylori*

	PCR positivo <i>H. pylori</i>	PCR negativo <i>H. pylori</i>	p-valor
Fatores de risco *			
VHB (n=6)	3 (10,7%)	3 (10,7%)	1.00 ³
VHC (n=39)	19 (67,9%)	20 (69,0%)	0.93 ²
Consumo de álcool (n=34)	14 (50,0%)	20 (69,0%)	0.14 ²
Hemocromatose (n=5)	2 (7,1%)	3 (10,3%)	1.00 ³
Def. α-1 antitripsina (n=1)	1 (3,6%)	0	-
Criptogênica (n=3)	2 (7,1%)	1 (3,4%)	0.61 ³

¹ Teste de Mann-Whitney ²Teste do Qui-quadrado ³Teste Exato de Fisher

* alguns indivíduos apresentaram mais que um fator de risco para o CHC (Apêndice 1)

Tabela 4. Gravidade da doença hepática e idade no grupo GA e sua relação com a presença do *H. pylori*

	PCR positivo <i>H. pylori</i>	PCR negativo <i>H. pylori</i>	p-valor
Escore Child-Pugh			
Child A (n=27)	11 (39,3%)	16 (55,2%)	
Child B (n=17)	11 (39,3%)	6 (20,7%)	0.29 ²
Child C (n=13)	6 (21,4%)	7 (24,1%)	
MELD (n=37)	24,4±3,1 (n=20)	22,3±4,9 (n=17)	0.31 ¹
Idade	52,2±7,6 (n=28)	54,7±10,3 (n=29)	0.20 ¹

¹ Teste de Mann-Whitney ² Teste do Qui-quadrado Grupo GA: CHC

MELD: model for end-stage liver disease n= número de pacientes

4.2. Quantificação e análise da pureza do DNA:

Os resultados da quantificação e análise da pureza do DNA obtidos nos dois grupos estudados estão descritos na Tabela 4. A quantidade de DNA obtida foi maior no grupo GA (p-valor<0.001). Com relação à pureza do material extraído, não houve diferença entre as amostras nos dois grupos (p-valor=0.74).

Tabela 5. Resultados da média da quantificação e da razão A260/280 do DNA extraído nos grupos GA e GB

Grupo	Quantificação média do DNA (ng/μl)	Média da razão A260/280
GA (CHC) (n=57)	507.9 (10.6-1688.6±396.6)*	1.9 (1.7-2.00±0,1)**
GB (controle) (n=29)	128.3 (10.7-407.2±118.3)*	1,9 (1.5-2.3±0.1)**

* **p-valor<0.001** (Teste do Qui-quadrado) ** p-valor=0.74 (Teste de Mann-Whitney)

4.3. Resultado da amplificação do gene da betaglobina humana:

A PCR para o gene da betaglobina humana foi positiva em todas as amostras do grupo GA (57/57 - 100%) e do grupo GB (29/29 - 100%), demonstrando que o material genético extraído estava viável para a amplificação (Figura 2).

4.4. Resultado da amplificação do gene 16S rRNA para a detecção do *H. pylori*:

Considerando os 86 pacientes incluídos no estudo, o gene 16S rRNA do *H. pylori* foi detectado em 36 amostras (41.9%). No grupo GA, 49.1% das amostras (28/57) amplificaram o gene 16S rRNA do *H. pylori*. No grupo controle (GB), 27.6% dos pacientes (8/29) foram positivos para a bactéria (p-valor≤0.056). (Tabela 2). Os resultados da amplificação estão demonstrados na Figura 3.

Quando se verificou a possível relação da presença do *H. pylori* com a idade, sexo, fatores de risco para o CHC, escore Child-Pugh e MELD no grupo GA, não foram observados resultados estatisticamente significantes (Tabelas 3

e 4). Considerando a combinação de dois ou mais fatores de risco para o CHC e a presença da bactéria, observou-se que, dos 23 pacientes que apresentaram o consumo de álcool e o VHC, 10 amplificaram o gene 16S rRNA (43,5%). Houve apenas um paciente que apresentou ingestão de álcool associada à hemocromatose e PCR positiva para a bactéria. Adicionalmente, o único paciente que apresentou co-infecção pelo VHB e VHC também estava positivo para o *H. pylori* (Apêndice 1).

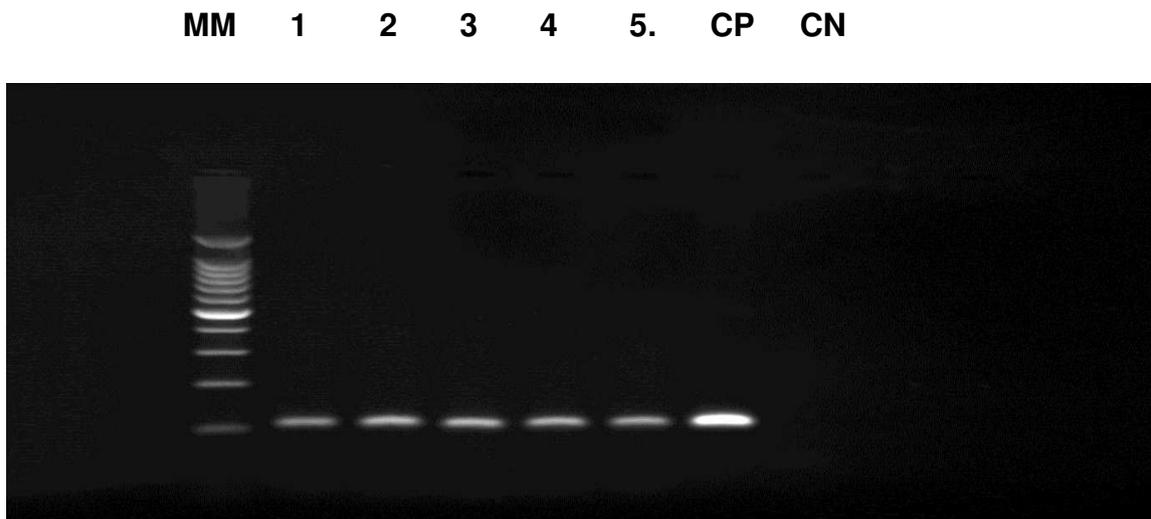


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos da PCR para o gene da betaglobina humana (110pb). MM: marcador molecular (100-1000pb). Linhas 1, 2 e 3: amostras positivas do grupo GA; Linhas 4 e 5: amostras positivas do grupo GB. CP: controle positivo (DNA extraído de sangue humano); CN: controle negativo (água bi-destilada).

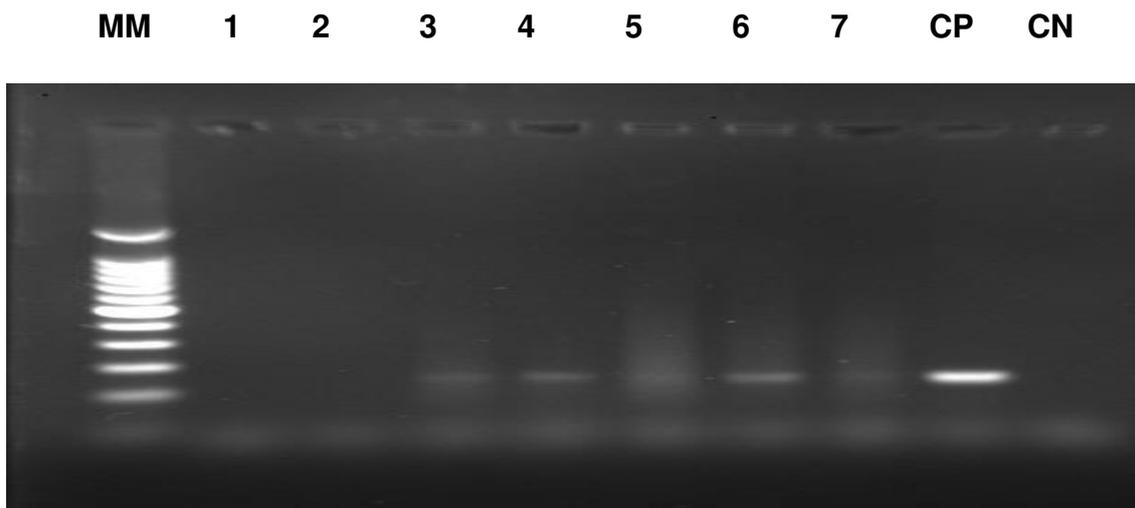


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos da PCR para o gene 16S rRNA do *H. pylori* (139pb). MM: marcador molecular (100-1000pb). Linhas 1 e 2: amostras negativas (GA e GB respectivamente); Linhas 3, 4 e 5: amostras positivas do grupo GA; Linhas 6 e 7: amostras positivas do grupo GB; CP: controle positivo (amostra gástrica de *H. pylori*) e CN: controle negativo (água bi-destilada).

4.5. Resultado da coloração imunohistoquímica:

O resultado da coloração imunohistoquímica para detecção do *H. pylori* nas lâminas de pacientes com CHC (grupo GA) foi positivo e está representado na Figura 4. Este resultado confirmou os dados obtidos na PCR e seqüenciamento do gene 16S rRNA.

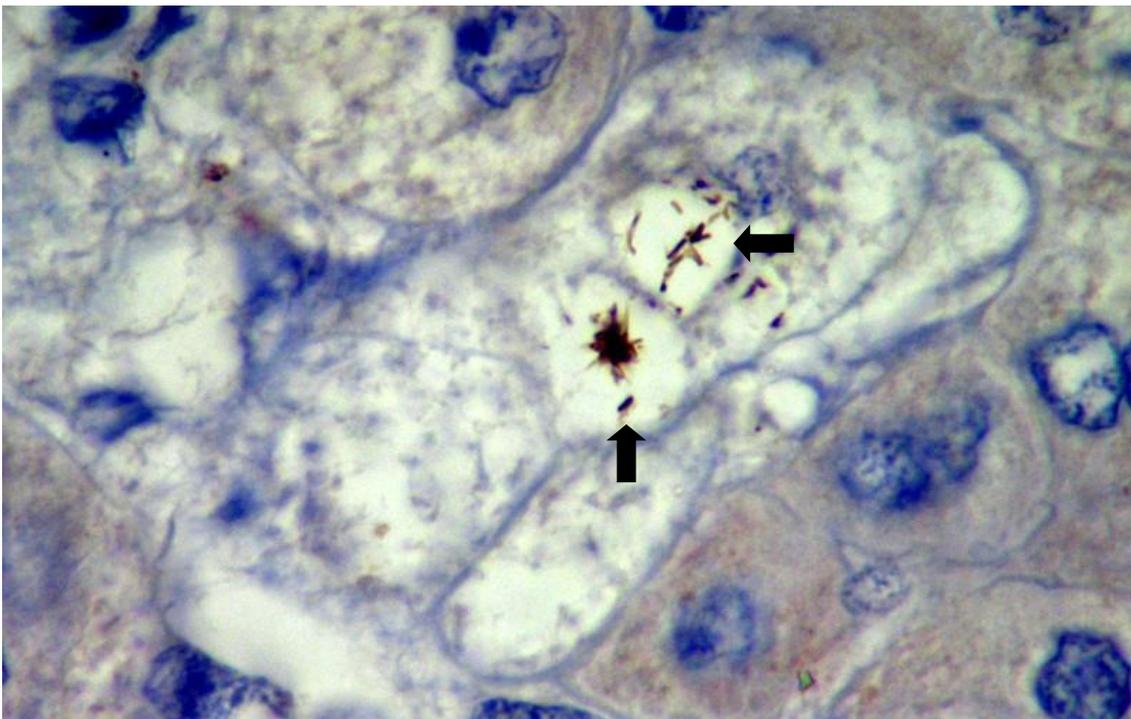


Figura 4. Coloração imunohistoquímica para detecção *H. pylori* no fígado de paciente com CHC (grupo GA). Note que os bacilos estão no interior das células de Kupffer (setas) (Aumento: 1000X).

4.6. Resultado do Sequenciamento:

O eletroferograma bem como os dados obtidos no alinhamento das bases (BLAST) estão representados nas Figuras 5.1 e 5.2 e demonstram que a seqüência do gene 16S rRNA nas amostras estudadas apresentou 98% de similaridade com o DNA do *H. pylori* (número de acesso do GeneBank CP003419.1).

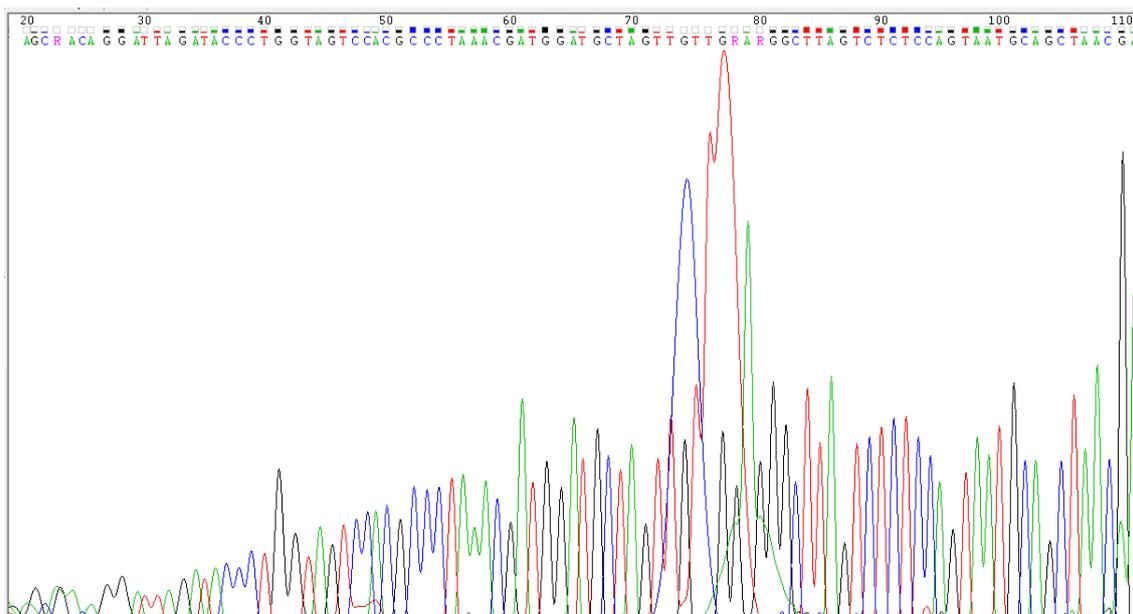


Figura 5.1. Eletroferograma da sequência do gene 16S rRNA do *H. pylori*.

Descriptions

Legend for links to other resources: [U](#) UniGene [E](#) GEO [G](#) Gene [S](#) Structure [M](#) Map Viewer [P](#) PubChem BioAssay

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
gi 387572303 CP003419.1	Helicobacter pylori XZ274, complete genome	152	305	78%	3e-34	98%	
gi 384561342 CP003475.1	Helicobacter pylori PeCan18, complete genome	152	305	78%	3e-34	98%	
gi 384559777 CP003474.1	Helicobacter pylori Shi112, complete genome	152	305	78%	3e-34	98%	
gi 384558251 CP003473.1	Helicobacter pylori Shi169, complete genome	152	305	78%	3e-34	98%	
gi 384556702 CP003472.1	Helicobacter pylori Shi417, complete genome	152	305	78%	3e-34	98%	
gi 384551775 CP003486.1	Helicobacter pylori HUP-B14, complete genome	152	305	78%	3e-34	98%	
gi 383215442 JQ315413.1	Helicobacter pylori isolate Hp16S587Mar 16S ribosomal RNA gene, pa	152	152	78%	3e-34	98%	
gi 383215441 JQ315412.1	Helicobacter pylori isolate Hp16S563Mar 16S ribosomal RNA gene, pa	152	152	78%	3e-34	98%	
gi 383215440 JQ315411.1	Helicobacter pylori isolate Hp16S644Mar 16S ribosomal RNA gene, pa	152	152	78%	3e-34	98%	
gi 383215439 JQ315410.1	Helicobacter pylori isolate Hp16S248Mar 16S ribosomal RNA gene, pa	152	152	78%	3e-34	98%	
gi 380873809 CP002953.1	Helicobacter pylori ELS37, complete genome	152	305	78%	3e-34	98%	
gi 346653637 JN595861.1	Helicobacter pylori strain 1199-10 LPB 16S ribosomal RNA gene, parti	152	152	78%	3e-34	98%	
gi 344335753 CP002982.1	Helicobacter pylori Puno135, complete genome	152	305	78%	3e-34	98%	
gi 344334211 CP002980.1	Helicobacter pylori Puno120, complete genome	152	305	78%	3e-34	98%	
gi 339899724 JN162414.1	Helicobacter pylori clone RIGLD HPD22 16S ribosomal RNA gene, parti	152	152	78%	3e-34	98%	
gi 332672788 CP002605.1	Helicobacter pylori 83, complete genome	152	305	78%	3e-34	98%	
gi 325995670 CP002571.1	Helicobacter pylori 2017, complete genome	152	152	78%	3e-34	98%	
gi 325995266 CP002572.1	Helicobacter pylori 2018, complete genome	152	152	78%	3e-34	98%	
gi 317181290 AP011945.1	Helicobacter pylori F57 DNA, complete genome	152	305	78%	3e-34	98%	
gi 317179796 AP011943.1	Helicobacter pylori F32 DNA, complete genome	152	305	78%	3e-34	98%	
gi 317178309 AP011941.1	Helicobacter pylori F30 DNA, complete genome	152	305	78%	3e-34	98%	
gi 317013424 CP002332.1	Helicobacter pylori Gambia94/24, complete genome	152	305	78%	3e-34	98%	
gi 317011857 CP002334.1	Helicobacter pylori Lithuania75, complete genome	152	305	78%	3e-34	98%	

Figura 5.2. Resultados do alinhamento das bases do gene 16S rRNA do *H. pylori* no BLAST (número de acesso do GeneBank CP003419.1).

4.7. Resultado da Microdissecção e Captura a laser (MCL):

Os resultados da MCL estão representados na Figura 6 e também confirmam os achados da PCR, sequenciamento e coloração

imunohistoquímica. O DNA extraído a partir desta técnica foi utilizado na PCR para o gene 16S rRNA, apresentando resultado positivo em 100% das amostras estudadas (7/7). Após a amplificação do gene, os amplicons foram submetidos à reação de seqüenciamento e as seqüências obtidas apresentaram 98% de identidade com o *H. pylori* (Figura 5.2).

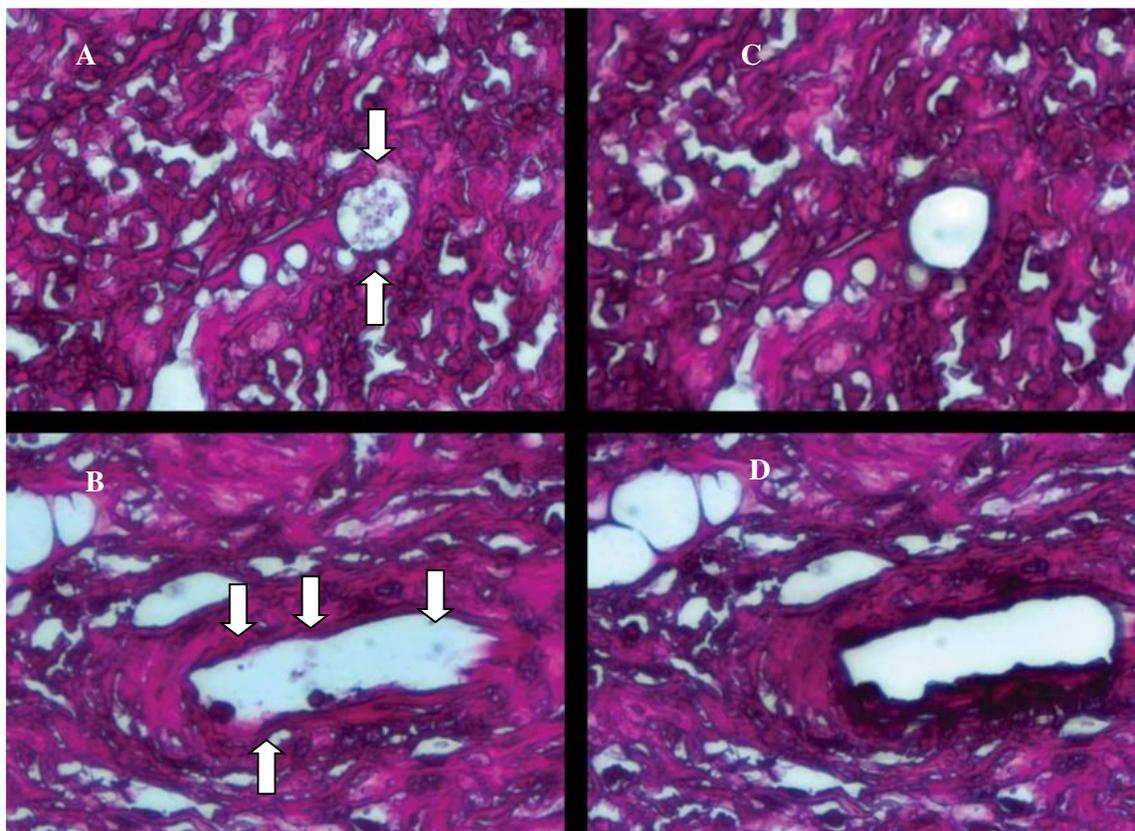


Figura 6. Microscopia óptica do fígado de pacientes com CHC, corados com carbol-fucsina e com resultado positivo da amplificação do gene 16S rRNA do *H. pylori*. Em (A) e (B) estão representadas as bactérias (setas) antes da microdissecção (aumento: 610X). Em (C) e (D) as mesmas amostras após a microdissecção (aumento: 610X).

4.8. Resultado da Microscopia de Transmissão Eletrônica (MET):

A análise das imagens originadas na MET das amostras de fígado de pacientes do grupo GA com PCR positiva para o gene 16S rRNA do *H. pylori* revelou a presença de estruturas semelhantes às bactérias, sendo que a maioria delas se apresentou na forma cocóide (Figura 7).

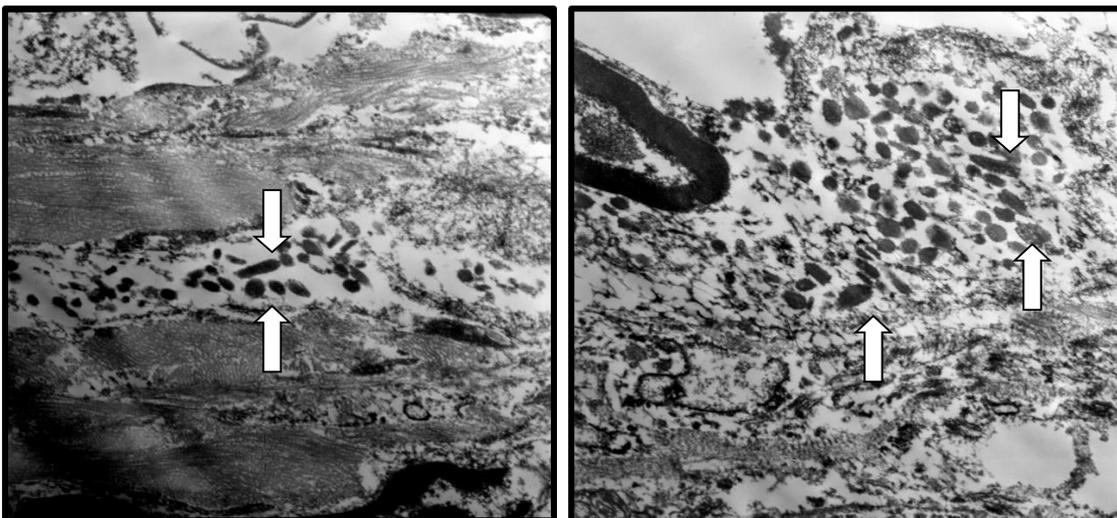


Figura 7. Microscopia eletrônica de transmissão de amostras de tecido hepático de pacientes com resultado positivo para amplificação do gene 16S rRNA do *H. pylori*. As setas indicam estruturas semelhantes às células bacterianas, tanto na forma espiralada quanto na forma cocóide (Aumento: 12.500X).

5. DISCUSSÃO:

A detecção do *H. pylori* no sistema hepatobiliar humano tem sido descrita por vários pesquisadores e foi associada a diferentes doenças particularmente o CHC. No presente estudo, a análise das características demográficas demonstrou que os indivíduos com CH e CHC (Grupo GA) apresentaram idade mais avançada e eram, em sua maioria, do sexo masculino (Tabela 2). Estes dados são semelhantes aos achados epidemiológicos previamente descritos^{126,133,243} e reforçam que idade avançada, duração da cirrose e sexo masculino são fatores importantes no processo da hepatocarcinogênese nos indivíduos cirróticos^{244,245,246}.

Considerando a amplificação do gene 16S rRNA do *H. pylori*, embora tenha sido notada maior porcentagem de casos positivos nos indivíduos com CHC (49,1%) em relação ao grupo controle (27,6%), os resultados não foram estatisticamente significantes ($p=0.056$) (tabela 2). Entretanto, podem sugerir a maior prevalência da bactéria no fígado cirrótico dos pacientes com CHC. Acredita-se que a realização de novos estudos que incluam maior número de amostras será fundamental para a confirmação destes achados.

A detecção do *H. pylori* no fígado de pacientes com CHC tem sido relatada por vários grupos de pesquisadores, em diferentes regiões do mundo, incluindo o Brasil^{94,120,121,205,206,207,237,247,248}. A análise dos resultados desses grupos, em conjunto com os dados aqui descritos, sugere importante variação na prevalência da bactéria; esta variação pode ser explicada, em parte, pelas diferenças geográficas e clínicas dos indivíduos incluídos ou, ainda, pelo desenho dos estudos, tipo de amostra e sensibilidade dos métodos para o seu diagnóstico.

Com relação ao tipo de amostra utilizado, nota-se que a maioria dos trabalhos existentes na literatura utilizou fragmentos de fígado fresco ou congelado. Os estudos retrospectivos que empregam material hepático parafinado, embora realizados em menor quantidade, reforçam a possibilidade da pesquisa do *H. pylori* nestas amostras. Entretanto, é importante mencionar

que o tipo da amostra também poderá influenciar na escolha da técnica e, conseqüentemente, no diagnóstico do microrganismo no fígado.

Considerando os estudos que utilizaram tecido parafinado para a pesquisa do *H. pylori*, Dore et. al (2002)¹²⁰ encontraram 55% de amostras positivas para *Helicobacter* spp. Entretanto, para a pesquisa específica do *H. pylori*, os autores realizaram a PCR de uma região conservada do gene *vacA*, que confirmou sua presença em apenas 27,2% dos indivíduos com CHC. No presente estudo, foi obtida uma maior prevalência do *H. pylori* (49,1%) no grupo GA e isto pode ter ocorrido, provavelmente, devido à amplificação de uma região conservada do gene 16S rRNA específico para o *H. pylori*.

Estudo realizado na Suécia com amostras hepáticas parafinadas demonstrou que a prevalência de *Helicobacter* spp. foi 58% nos pacientes com CHC. A detecção do *H. pylori* foi confirmada pelo sequenciamento na maioria das amostras; entretanto, outros microrganismos como *H. ganmani* e *H. hepaticus* também foram identificados²⁰⁵. Em nosso estudo, foi realizada exclusivamente a pesquisa do *H. pylori* e os dados obtidos no sequenciamento do gene 16S rRNA confirmam a identificação de bactéria que apresentou 98% de similaridade com o *H. pylori* (número de acesso do GeneBank CP003419.1).

Outro aspecto importante relacionado à detecção do *H. pylori* no fígado constitui sua presença nos indivíduos sem doença hepática. O nosso estudo verificou que 27,6% das amostras do grupo controle foram positivas para a bactéria. Sabendo que parte destas amostras foram obtidas do fígado de doadores, a possibilidade destes órgãos constituírem reservatório em potencial do *H. pylori* deve ser avaliada. Neste contexto, cabe ressaltar o papel da forma cócoides da bactéria, especialmente no estágio onde ela poderia manter sua atividade metabólica e patogenicidade²⁴⁹ bem como reverter-se para a forma ativa e restabelecer seu crescimento^{250,251}. Adicionalmente, é sabido que o longo período de latência da forma cócoides no estômago pode estar associado ao desenvolvimento do câncer gástrico²⁵².

A avaliação dos fatores etiológicos no desenvolvimento do CHC revelou que, na maioria dos pacientes do estudo, o CHC estava associado à infecção pelo VHC (39/57) e também ao alcoolismo (34/57) (Tabela 3). Entretanto, quando

se verificou a possível associação do *H. pylori* com estes fatores, os resultados não foram estatisticamente significantes ($p=0,93$ e $p=0,14$, respectivamente). O mesmo ocorreu quando da observação dos outros fatores de risco para o CHC incluídos no estudo (infecção pelo VHB, hemocromatose, deficiência de alfa-1-antitripsina e criptogênica) ($p=1,00$, $p=1,00$, $p=0,61$, respectivamente) (Tabela 3). Cabe ressaltar ainda que o principal fator de risco para o CHC no Brasil e, portanto, dos pacientes atendidos no Hospital de Clínicas da Unicamp, é a CH associada ao VHC¹³³.

Admite-se que cerca de 80% dos pacientes infectados pelo VHC desenvolve hepatite crônica, que pode ser representada por amplo espectro de lesões hepáticas, variando desde resposta inflamatória crônica discreta até o surgimento de CH e CHC. O curso da doença geralmente varia de um paciente para o outro e vários fatores como idade, duração da infecção, consumo de álcool, sexo masculino e, mais recentemente, esteatose, têm sido associados à sua progressão. Entretanto, mesmo na ausência destes fatores, esta progressão pode ser observada, sugerindo o papel de outros elementos que necessitam ser identificados. Acredita-se que fatores genéticos do hospedeiro ou fatores ambientais como a co-infecção com o *H. pylori* podem estar envolvidos²⁵³.

Inicialmente, foram propostos vários estudos sugerindo a interação sinérgica entre *Helicobacter* spp. e o VHC na patogênese do CHC. A prevalência de anticorpos anti-*H. pylori* em pacientes infectados pelo VHC é significativamente maior do que nos pacientes sem infecção viral^{118,209,210,211,212,213}. Um estudo francês pesquisou pacientes co-infectados por *Helicobacter* spp. e VHC na presença ou ausência de CHC. O DNA de *Helicobacter* foi encontrado em 4,2% dos indivíduos no grupo controle e em 3,5% dos pacientes com hepatite crônica não-cirrótica. Entretanto, a detecção de *Helicobacter* spp no fígado cirrótico, na presença e ausência de CHC, foi 68% e 61,3%, respectivamente. Os autores concluíram que, nos diferentes estágios da hepatopatia, pode-se notar associação entre a presença de *Helicobacter* e a severidade da doença hepática⁹⁴.

O nosso estudo não apresentou resultados significantes quando se avaliou a possível associação do *H. pylori* com o escore Child-Pugh e MELD (Tabela 3) ($p=0.29$ e $p=0.31$, respectivamente). Entretanto, é importante salientar

que todas as amostras do grupo GA apresentaram CH. Acredita-se, portanto, que a realização de novas pesquisas incluindo pacientes cirróticos com e sem o CHC, bem como indivíduos cujo CHC desenvolve-se na ausência de CH, poderia elucidar com maior clareza o papel do *H. pylori* na progressão da doença hepática em nossos pacientes. Cabe ressaltar ainda que não foi realizada a comparação da classificação METAVIR no presente estudo

Esmat et al (2012)²⁴⁸ verificaram que a positividade do gene *cagA* do *H. pylori* foi diretamente proporcional à severidade da doença hepática quando estudaram pacientes com VHC na presença e ausência de CH e CHC. Esta positividade ocorreu em 75% dos pacientes com CH e CHC, 52,9% dos pacientes cirróticos sem CHC e 32% dos indivíduos com hepatite crônica. Os autores verificaram ainda diferença significativa quando compararam a classificação METAVIR entre os grupos, estando o *H. pylori* fortemente associado aos estágios mais tardios da fibrose. Contudo, quando analisaram a positividade do *H. pylori* e o escore Child-Pugh, também não foram encontradas diferenças entre os grupos.

Outros estudiosos verificaram a associação do *H. pylori* com a fibrose e CH nos pacientes com hepatite crônica pelo VHC. Nos indivíduos co-infectados pela bactéria, a análise histopatológica exibiu nódulos cirróticos e comprometimento do parênquima hepático. Houve também a diminuição de glicogênio e proteínas totais nos hepatócitos destes pacientes. Embora não tenham sido incluídas amostras de CHC no estudo, os autores mencionaram a necessidade de avaliar a infecção pelo *H. pylori* nos casos de hepatite crônica pelo VHC sugerindo, inclusive, o tratamento da infecção pela bactéria nestes casos²⁵⁴.

O papel do *H. pylori* no desenvolvimento da fibrose hepática também foi avaliado em estudos experimentais e *in vitro*. Goo et al. (2009)²⁵⁵ inocularam *H. pylori* em camundongos e ratos por via oral e induziram a fibrose hepática pela administração de tetracloreto de carbono (CCl₄). Os resultados revelaram aumento significativo no escore da fibrose em animais tratados com o CCl₄ e positivos para a bactéria. Adicionalmente, foi verificado um aumento nos níveis de alfa-actina de músculo liso e fator de transformação do crescimento-beta 1 (TGF-β1) nestes animais. Posteriormente, pesquisadores sugeriram ainda que o

H. pylori pode estar envolvido no aumento do risco da tumorigênese, mediado pelo TGF- β 1²⁵⁶.

Outro estudo *in vitro* descreveu o aumento das células de Kupffer e dos níveis de peróxido de hidrogênio durante a infecção pelo *H. pylori*, que possivelmente contribuem para a ativação das células hepáticas. Esta ativação parece estar associada ao TGF- β 1 e ocasiona o aumento da resposta inflamatória hepática através da liberação de citocinas^{257,258}. Estes dados, em conjunto, confirmam a possibilidade de que o *H. pylori* é capaz de estimular os hepatócitos e induzir a fibrose hepática.

É importante considerar que o CHC também pode estar relacionado à combinação de diferentes fatores de risco, tornando-se complexa a definição do impacto específico de cada um destes fatores²⁵⁹. O consumo de álcool, por exemplo, é considerado um co-fator para as hepatopatias crônicas e CHC, especialmente quando associado ao VHB, VHC, hemocromatose e EHNA^{260,261}.

Neste estudo, notou-se que 23 dos indivíduos com CH e CHC tinham como fator de risco o VHC associado ao consumo de álcool. Em 9 destes pacientes, também foi detectada a infecção pelo *H. pylori*. Embora a comparação destes dados não seja significativa, o possível efeito sinérgico da bactéria com o VHC e o álcool merece maior atenção nos estudos futuros sobre a patogênese do CHC.

A detecção do *H. pylori* no fígado humano tem sido frequentemente realizada utilizando amostras de tecido fresco ou congelado. Entretanto, o emprego de tecido parafinado para esta finalidade pode ser útil tanto na caracterização das cepas e seus fatores de virulência, como também na correlação entre os achados moleculares e os dados histopatológicos²³⁹. Além disso, amostras parafinadas também apresentam como vantagem a facilidade de obtenção e possibilidade de estocagem por longos períodos²⁶².

Todavia, um fator limitante dos tecidos parafinados é a obtenção de DNA em condições favoráveis à amplificação. Para isso, é necessário selecionar métodos de extração que permitam a utilização do DNA nos diferentes métodos moleculares. No presente estudo, foram testados quatro *kits* comerciais (QIAamp FFPE Tissue Kit/Qiagen, QIAamp DNA Mini Kit/Qiagen, Wizard SV Genomic DNA Purification System/Promega e RealiaPrep FFPE gDNA Miniprep

System/Promega) em comparação com a metodologia do fenol/clorofórmio para a extração do DNA²³⁹.

De modo geral, a utilização dos *kits* envolveu métodos de execução mais rápidos, simples e práticos, requerendo menor número de centrifugações e lavagens. Estas características são importantes pois os processos extensos de purificação do DNA podem aumentar o risco de sua contaminação em cada etapa²³¹. Entretanto, como a maioria dos fragmentos hepáticos do grupo GA (CHC) apresentavam quantidade abundante de tecido, o método do fenol/clorofórmio permitiu a obtenção de maior concentração de DNA. Acredita-se que isto ocorreu, pois, os *kits* apresentam colunas para a purificação das amostras e, na presença de maior quantidade de tecido, provavelmente ocorre o entupimento destas colunas, dificultando a eluição final do DNA.

Além disso, a técnica do fenol/clorofórmio mostrou-se mais adequada para a detecção da bactéria, pois permitiu a amplificação do DNA alvo em quantidade reduzida nas amostras, o que, possivelmente, ocorre com o DNA do *H. pylori* no fígado^{120,223}. Cabe ressaltar ainda que a extração pelo método do fenol/clorofórmio já havia sido descrita com sucesso na detecção e genotipagem do *H. pylori* a partir de amostras gástricas parafinadas⁷⁷.

Quando se utiliza tecidos parafinados, outro fator importante é o tamanho dos fragmentos de DNA amplificados que não devem ultrapassar 300pb^{232,233,234,235}. No presente estudo, os resultados da amplificação do gene da betaglobina confirmam a obtenção de DNA viável pois todas as amostras foram positivas para o gene. Todavia, com relação à detecção do *H. pylori*, inicialmente foram realizados testes para a amplificação de fragmentos com 400pb e 298pb (dados não demonstrados). Como não foi possível a amplificação destes fragmentos, foi selecionada uma região conservada do gene 16S rRNA cujo produto final apresentou 139pb. Shibata (1994)²²⁵ ressaltou que os melhores resultados foram obtidos na amplificação de produtos entre 80 e 170pb.

A coloração imunohistoquímica (IHQ) realizada neste estudo revelou a presença do *H. pylori* nas amostras de pacientes com CHC e foi fundamental para confirmação dos resultados iniciais da PCR. Sakr et al. (2013)²⁵⁴ também

utilizaram a IHQ para detectar o *H. pylori* no fígado de indivíduos com hepatite crônica e visualizaram bactérias no interior das células de Kupffer.

A microdissecção e captura a laser (MCL) foi o método diferencial do nosso estudo pois permitiu, além da confirmação diagnóstica do *H. pylori* no fígado, a padronização do sequenciamento do gene 16S rRNA. Esta técnica foi recentemente desenvolvida e promove a identificação de uma população celular específica através da visualização em microscópio óptico. Deste modo, constitui uma ferramenta útil para detecção de determinados alvos celulares incluindo microrganismos.

Neste estudo a MCL favoreceu a identificação do *H. pylori*, isolando-o completamente do tecido hepático. Conseqüentemente, o processo de extração de DNA resumiu-se à simples digestão das células bacterianas, por 3 horas, em solução tampão preparada com PK em pequena concentração (0,03%). Isto permitiu a obtenção de DNA específico, puro e concentrado, pronto para ser empregado na PCR e sequenciamento¹²⁰. Tian et al. (2008) foram os primeiros autores a descreverem o uso da MCL para a detecção do *H. pylori* no tecido hepático com CHC. Entretanto, uma revisão bibliográfica recente demonstrou que o trabalho realizado pelo nosso grupo foi, muito provavelmente, o segundo na literatura internacional e o primeiro na literatura nacional, envolvendo o uso desta técnica na identificação do *H. pylori* no fígado com CH e CHC.

A realização da microscopia eletrônica de transmissão (MET) permitiu a visualização da morfologia bacteriana e confirmou os dados da IHQ e MCL. Nas amostras submetidas a todas estas técnicas, notou-se a presença de microrganismos semelhantes ao *H. pylori*, geralmente visualizados em número reduzido nos espaços sinusóides e, sobretudo, na forma cocóide. Achados semelhantes foram descritos por pesquisadores chineses quando da realização da microscopia eletrônica no fígado de pacientes com CHC⁹⁵.

Apesar do *H. pylori* ter sido detectado no fígado humano, sobretudo nos pacientes cirróticos com CHC, é preciso determinar, com maior clareza, os possíveis mecanismos envolvidos na patogênese da doença hepática. Estudiosos relatam que o *H. pylori* pode exercer efeito citopático nos hepatócitos

e ocasionar a hepatite; este efeito foi confirmado por ensaios *in vitro* com cultura de células hepáticas e linhagens de células do CHC^{220,263}.

Uma das hipóteses mencionadas é que *Helicobacter* pode ocasionar injúria epitelial com posterior processo inflamatório crônico, de forma similar ao que ocorre com as pedras vesiculares, culminando com a proliferação das células do epitélio biliar²⁶⁴. Esta proliferação poderia levar à displasia ou metaplasia e posterior progressão para o câncer de modo semelhante ao que ocorre com o CHC na cirrose ou o carcinoma de esôfago no esôfago de Barret. Fox et al. (1998)¹⁰⁸ também propuseram mecanismo semelhante de injúria epitelial mediado pela produção de citotoxina.

Matsumoto et al. (1999)²⁶⁵ ressaltaram que a presença do *H. pylori* na cultura de células hepáticas HepG2 provavelmente estimula a produção de citotoxinas inflamatórias, ativando a expressão de beta-integrina-1. Sabe-se que esta proteína apresenta papel central na invasão e metástase das células no CHC. Empregando a mesma linhagem celular, outros pesquisadores demonstraram ainda que uma cepa *cagA* positiva foi capaz de induzir a expressão das enzimas metaloproteinases de matriz (MMP) que estão relacionadas à metástase e invasão celular²⁶⁶.

Os fatores etiopatogênicos envolvidos nos diferentes tipos de câncer têm sido amplamente estudados; desta forma, notou-se que mudanças moleculares observadas no CHC são similares àsquelas induzidas no câncer gástrico pelo *H. pylori*. Estudos *in vitro* demonstraram que a bactéria é capaz de induzir a expressão da proteína ciclina D1 em linhagens de células gástricas AGS²⁶⁷ e hepáticas HepG2²⁶⁸. Considerando que o aumento desta proteína está relacionado à recidiva no CHC, pode-se sugerir o papel da infecção pelo *H. pylori* no aumento da expressão de ciclina D1 no fígado.

Sabendo que o CHC é um tumor altamente vascularizado e a angiogênese apresenta importante fator no seu desenvolvimento, o aumento da expressão do fator de crescimento vascular endotelial (FCVE) também poderia estar relacionado à progressão do CHC. Estudiosos relataram que o *H. pylori* foi capaz de induzir a expressão elevada de FCVE, sendo este efeito significativamente associado à expressão de VacA²⁶⁹. Adicionalmente, foi

descrito que VacA pode danificar os hepatócitos de pacientes infectados pela bactéria em conjunto com o aumento das aminotransferases²⁷⁰.

As mutações no gene p53, que podem ser induzidas por aflatoxinas, pelos vírus das hepatites ou pelo estresse oxidativo, estão entre as mais frequentemente relatadas no CHC e câncer gástrico²⁷¹. Os pacientes infectados pelo *H. pylori* apresentam elevados níveis de mutações no gene p53 que diminuem após a erradicação da bactéria; acredita-se que a presença do *H. pylori* no fígado possa desencadear estas mutações²⁷². Além disso, as alterações nos genes promotores tumorais como *ras*, *c-myc* e *c-fos* são indicadores de transformações malignas no CHC e câncer gástrico. Neste último, a infecção pelo *H. pylori* está associada ao aumento da expressão de *ras p21*²⁷³ e *c-myc*²⁷⁴.

O fator de crescimento do hepatócito (FCH) é o mediador mais importante na regeneração hepática. Está potencialmente relacionado aos mecanismos moleculares da hepatocarcinogênese, contribuindo para a proliferação e comportamento invasivo das células tumorais. Pesquisadores demonstraram o aumento da expressão de FCH na mucosa gástrica dos pacientes infectados pelo *H. pylori*, sendo que esta diminuiu quando da erradicação bacteriana^{275,276,277}. Acredita-se que achados semelhantes podem ser observados no fígado infectado pelo *H. pylori*.

Finalmente, estudiosos sugeriram a possibilidade de que espécies de *Helicobacter* estejam presentes nas amostras de CHC como consequência do processo tumoral hepático. Considerando que o CHC pode causar colestase intra-hepática crônica e favorecer a persistência de microrganismos no fígado, estes microrganismos compreenderiam espécies entéricas de *Helicobacter* que colonizariam inicialmente o trato biliar antes de alcançar o fígado. Deste modo, é possível que o ambiente intra-hepático modificado pelo CHC possa criar condições favoráveis para a migração e colonização hepática. Assim, *Helicobacter* spp. não atuariam como agentes causadores da doença, mas estariam presentes como consequência do processo inflamatório previamente induzido pelo CHC¹¹⁹.

Diante destas informações e considerando os achados obtidos no presente estudo, a realização de novas pesquisas que considerem tanto os fatores de virulência do *H. pylori* como os fatores imunogenéticos do hospedeiro será de grande valia para a melhor compreensão da etiopatogenia do CHC. O esclarecimento do papel do *H. pylori* no CHC poderá indicar a necessidade do tratamento da infecção nos pacientes com hepatopatias crônicas, auxiliando na melhora das lesões hepáticas e até mesmo na prevenção do desenvolvimento do CHC.

6. CONCLUSÕES:

A análise dos resultados obtidos neste estudo permite concluir que:

6.1. Foi possível amplificar DNA do *H. pylori* em 36 (41,9%) amostras parafinadas de tecido hepático não tumoral empregando o método do fenol-clorofórmio para a extração;

6.2. . Apesar do *H. pylori* estar presente em 28 (49,1%) amostras de pacientes com CH e CHC e 8 amostras (27,6%) do grupo controle, os resultados não foram estatisticamente significantes; entretanto, podem sugerir a tendência da maior prevalência da bactéria no fígado de pacientes com CH e CHC;

6.3. O uso da técnica de microdissecção a laser foi fundamental para a confirmação dos dados obtidos na PCR e para a padronização do sequenciamento do gene 16S rRNA do *H. pylori*;

6.4. O *H. pylori* foi visualizado nos espaços sinusoidais do tecido hepático, principalmente na forma cocóide;

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gianella RA, Broitman SA, Zamcheck N. Influence of gastric acidity on bacterial and parasitic enteric infections. *Ann Intern Med* 1973; 78: 271-276.
2. Sachs G, Weeks DL, Melchers K, *et al.* The gastric biology of *Helicobacter pylori*. *Annu Rev Physiol* 2003; 65: 349-369.
3. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1984; 1311-1315.
4. Krientiz W. Über das Auftreten von Spirochäten verschiedener Form in Magrinhalt bei Carcinoma Ventriculi. *Dtsch Med Wochenschr* 1906; 28: 872.
5. Goodwin CS, McCulloch RK, Armstrong JÁ, Wee SH. Unusual cellular fatty acids and distinctive ultrastructure in a new spiral bacterium (*Campylobacter pyloridis*) from the human gastric mucosa. *J Med Microbiol* 1987; 19: 257-267.
6. Blaser MJ. *Helicobacter pylori*: microbiology of a slow bacterial infection. *Trends Microbiol* 1993; 1:255-260.
7. Dunn BE, Cohen H, Blaser MJ. *Helicobacter pylori*. *Clin Microbiol Reviews* 1997; 10: 720-741.
8. Ahmed N, Sechi LA. *Helicobacter pylori* and gastroduodenal pathology: New threats of the old friend. *Ann Clin Microbiol Atimicrob* 2005; 4: 1-10.
9. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Microbiologia Médica*. 3ª ed. RJ: Guanabara Koogan, 1998; p. 209-214.
10. Goodwin CS. *Campylobacter pylori* become *Helicobacter pylori*. *Int J Bacteriol* 1989; 39: 353-405.
11. Vandamme P, Falsen E, Rossau R, Hoste B, Segers P, Tytgat R *et al.* Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter* and *Wolinella* Taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. *Nov Int J Syst Bacteriol* 1991; 41: 88-103.
12. Roubaud-Baudron C, Franceschi F, Salles N, Gasbarrini A. Extragastric diseases and *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2013; 18 (Suppl 1): 44-51.

13. Mishra S. Is *Helicobacter pylori* good or bad? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013; 32: 301-304.
14. Makola D, Peura DA, Crowe E. *Helicobacter pylori* infection and related gastrointestinal diseases. *J Clin Gastroenterol* 2007; 41: 548-558.
15. García A, Salas-Jara, MJ, Herrera C, González C. Biofilm and *Helicobacter pylori*: from environment to human host. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 5632-5638.
16. Lina TT, Alzahrani S, Gonzalez J, Pinchuk IV, Beswick EJ, Reyes VE. Immune evasion strategies used by *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 12753-12766.
17. Falush D, Wirth T, Linz B, Pritchard JK, Stephens M, Kidd M et al. Traces of human migration in *Helicobacter pylori* populations. *Science* 2003; 299: 1582-1585.
18. Moodley Y, Linz B, Yamaoka Y. The peopling of the Pacific from a bacterial perspective. *Science* 2003; 323: 527-530.
19. Kalali B, Mejías-Luque R, Javaheri A, Gerhard M. *H. pylori* virulence factors: influence on immune system and pathology. *Med Inflamm* 2014; 2014: 426309.
20. Bodger K, Bromelow K, Wyatt JI, Heatley RV. Interleukin 10 in *Helicobacter pylori* associated gastritis: immunohistochemical localization and *in vitro* effects on cytokine secretion. *J Clin Pathol* 2001; 54: 285-292.
21. Hisatsune J, Nakayama M, Isomoto H, Kurazono H, Mukaida N, Mukhopadhyay AK et al. Molecular characterization of *Helicobacter pylori* VacA induction of IL-8 in U937 cells reveals a prominent role for p38MAPK in activating transcription factor-2, cAMP response element binding protein, and NF-kappaB activation. *J Immunol* 2008; 180: 5017-5027.
22. Lee KE, Khoi PN, Xia Y, Park JS, Joo YE, Kim KK et al. *Helicobacter pylori* and interleukin-8 in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 8192-8202.
23. Blaser MJ. An endangered species in yhe stomach. *Scientific American* 2005; 24-31.

24. Bastos J, Carreira H, La Vecchia C, Lunet N. Childcare attendance and *Helicobacter pylori* infection: Systematic review and meta-analysis. *Eur J Canc Prev* 2013; 311-319.
25. Urita Y, Watanabe T, Kawagoe N, Takemoto I, Tanaka H, Kijima S et al. Role of infected grandmothers in transmission of *Helicobacter pylori* to children in a Japanese rural town. *J Pediatric Children Health* 2013; 49: 394-398.
26. Covacci A, Telford JL, Del Giudice G, Parsonnet J, Rapuolli R. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science* 1998; 284: 1328-1333.
27. Lu Y, Redlinger TE, Avitia R, Galindo A, Goodman K. Isolation and genotyping of *Helicobacter pylori* from untreated municipal wastewater. *App Env Microbiol* 2002; 68: 1436-1439.
28. Bahrami AR, Rahimi E, Ghasemian Safaei H. Detection of *Helicobacter pylori* in city water, dental unit's water and bottled mineral water in Isfahan, Iran. *Scientific World J* 2013; 2013: 280510
29. Krajden S, Fuksa AS, Anderson J, Kempson J, Boccia A, Petrea C, Babida C, Karmali M, Penner JL. Examination of human stomach biopsies, saliva and dental plaque for *Campylobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 1989; 27:1397-1398.
30. Desai HG, Gill HH, Shankaran K, Mehta PR, Prabhu SR. Dental plaque: a permanent reservoir of *Helicobacter pylori*? *Scand J Gastroenterol* 1991; 26:1205-1208.
31. Vincent P, Gottrand F, Pernes P, Husson MA, Beju A, Leclerc H et al. *Helicobacter pylori* infection in cohabiting children *Lancet* 1991; 337: 848.
32. Klein PD, Gastrointestinal Physiology Working Group, Graham DY, Gaillour A, Opekun AR, Smith EO. Water souser as a risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children. *Lancet* 1991; 337: 1503-1506.
33. Katoh M, Saito D, Noda T. *Helicobacter pylori* may be transmitted through gastrofiberscope even after manual hyamine washing. *Jpn J Cancer Res* 1993; 84: 117-119.

34. Handt LK, Malaly HM, Dewhirst FL, Fraser BJ, Paster BI, Yan LL, Rozmiarek H, Rufo R, Stalis IH. *Helicobacter pylori* isolated from the domestic cat public health implications. *Infect Immunol* 1994; 62: 2367-2374.
35. Shimada T, Ogura K, Ota S, Terano A, Takahashi M, Hamada E et al. Identification of *Helicobacter pylori* in gastric specimens, gastric juice, saliva, and faeces of Japanese patients. *Lancet* 1994; 343: 1636-1637.
36. Sasaki K, Yoshito T, Sata M, Fuji Y, Matsubara F, Zhao M, Shimizu S, Toyonaga A, Tanikawa K. *Helicobacter pylori* in the natural environment. *Scand J Infect Dis* 1999; 31: 275-279.
37. Goodwin CSR, Armstrong JA. Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). *Eur J Clin Microbiol* 1990; 9(1): 1-13.
38. O'Tolle PW, Lane MC, Porwollick S. *Helicobacter pylori* motility. *Microbes Infect* 2000; 2: 1207-1214.
39. Kusters JG, van Vliet AHM, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 449-490.
40. Scott DR, Marcus EA, Weeks DL, Sachs G. Mechanisms of acid resistance due to the urease system of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol* 2002; 123: 187-185.
41. Stingl K, Attendorf K, Bakker EP. Acid survival of *Helicobacter pylori*: how does urease activity trigger cytoplasmic pH homeostasis? *Trends Microbiol* 2002; 10: 70-74.
42. Dunne C, Dolan B, Clyne M. Factors that mediate colonization of the human stomach by *Helicobacter pylori*. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 5610-5624.
43. Doig P, de Jonge BL, Alm RA, Brown ED, Uria-Nickelsen M, Noonan B et al. *Helicobacter pylori* physiology predicted from genomic comparison of two strains. *Microbiol Mol Biol Rev* 1999; 63:675-707.
44. Marais A, Mendz GL, Hazell SL, Mégraud F. Metabolism and genetics of *Helicobacter pylori*: the genome era. *Microbiol Mol Biol Rev* 1999; 63:642-74.

45. Mendz GL, Hazell SL. The urea cycle of *Helicobacter pylori*. *Microbiology* 1996; 142: 2959-2967.
46. Gobert AP, McGee DJ, Akhtar M, Mendz GL, Newton JC, Cheng Y et al. *Helicobacter pylori* arginase inhibits nitric oxide production by eukaryotic cells: a strategy for bacterial survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:13844-13849.
47. Seyler RW Jr, Olson JW, Maier RJ. Superoxide dismutase-deficient mutants of *Helicobacter pylori* are hypersensitive to oxidative stress and defective in host colonization. *Infect Immun* 2001; 69: 4034-4040.
48. Olczak A, Seyler RW Jr, Olson JW, Maier RJ. Association of *Helicobacter pylori* antioxidant activities with host colonization proficiency. *Infect Immun* 2003; 71: 580-583.
49. Ilver D, Arnqvist A, Ogren J, Frick IM, Kersulyte D, Incecik ET et al. *Helicobacter pylori* adhesion binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science* 1998; 279: 373-377.
50. Pride DT, Meinersmann RJ, Blaser MJ. Allelic variation within *Helicobacter pylori* babA and babB. *Infect Immun* 2001; 69: 1160-1171.
51. Odenbreit S, Swoboda K, Barwing I, Barwing I, Ruhl S, Borén T et al. Outer membrane protein expression profile in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Infect Immun* 2009; 77: 3782-3790.
52. Ishijima N, Suzuki M, Ashida H, Ashida H, Ichikawa Y, Kanegae Y et al. BabA-mediated adherence is a potentiator of the *Helicobacter pylori* triggers DNA double-strands breaks and a DNA damage response into host cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 14944-14949.
53. Walz A, Odenbreit S, Mahdavi J, Borén T, Ruhl S. Identification and characterization of binding properties of *Helicobacter pylori* by glycoconjugate arrays. *Glycobiology* 2005; 15: 700-708.
54. Unemo M, Aspholm-Hurting M, Ilver D, Bergström J, Borén T, Danielsson D et al. The sialic acid binding SabA adhesion of *Helicobacter pylori* is essential for nonopsonic activation of human neutrophils. *J Biol Chem* 2005; 280: 15390-15397.

55. Alm RA, Bina J, Andrews M, Doing P, Hancock PE, Trust TJ. Comparative genomics of *Helicobacter pylori*: analysis of the outer membrane protein families. *Infec Immun* 2000; 68: 4155-4168.
56. Senkovich OA, Yin J, Ekshyyan V, Conant C, Traylor J, Adegboyega P et al. *Helicobacter pylori* AlpA and AIPB bind host laminin and influence gastric inflammation in gerbils. *Infec Immun* 2011; 79: 3106-3116.
57. Lu H, Jeng W, Beswick EJ, Ohno T, Odenbreit S, Haas R et al. Functional and intracellular signaling differences associated with the *Helicobacter pylori* AlpAB adhesion from Western and East Asian strains. *J Biol Chem* 2007; 282: 6242-6254.
58. Peck B, Ortkamp M, Diehl KD, Hundt E, Knapp B. Conservation, localization and expression of HopZ, a protein involved in adhesion of *Helicobacter pylori*. *Nucl Acids Res* 1999; 27: 3325-3333.
59. Dossumbekova A, Prinz C, Mages J, Lang R, Kusters JG, Van Vliet AH et al. *Helicobacter pylori* HopH (OipA) and bacterial pathogenicity: genetic and functional genomic analysis of hopH gene polymorphisms. *J Infect Dis* 2006; 194: 1346-1355.
60. Yamaoka Y, Kodama T, Graham DY, Kashima K. Search for putative virulence factors of *Helicobacter pylori*: the low-molecular-weight (33-35K) antigen. *Dig Dis Sci* 1998; 43:1482-1487.
61. Yamaoka Y, Soucek J, Odenbreit S, Haas R, Arnqvist A, Borén T et al. Discrimination between cases of duodenal ulcer and gastritis on the basis of putative virulence factors of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 2002; 40:2244-2246.
62. Franco AT, Israel DA, Washington MK, Krishna U, Fox JG, Rogers AB et al. Activation of beta-catenin by carcinogenic *Helicobacter pylori*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102: 10646-19651.
63. Murata-Kamiya N, Kurashima Y, Teishikata Y, Yamahashi Y, Saito Y, Higashi H et al. *Helicobacter pylori* CagA interacts with E-cadherin and deregulates the b-catenin signal that promotes intestinal transdifferentiation in gastric epithelial cells. *Oncogene* 2007; 26: 4617-4626.

64. Amieva MR, Vogelmann R, Covacci A, Tompkins LS, Nelson WJ, Falkow S. Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA. *Science*. 2003; 300: 1430-1434.
65. Suzuki M, Mimuro H, Suzuki T, Park M, Yamamoto T, Sasakawa C. Interaction of CagA with Crk plays an important role in *Helicobacter pylori*-induced loss of gastric epithelial cell adhesion. *J Exp Med*. 2005; 202: 1235-1247.
66. Franco AT, Johnston E, Krishna U, Yamaoka Y, Israel DA, Nagy TA et al. Regulation of gastric carcinogenesis by *Helicobacter pylori* virulence factors. *Cancer Res*. 2008; 68: 379-387.
67. Brandt S, Kwok T, Hartig R, König W, Backert S. NF-kappaB activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 9300-9305.
68. Kim SS, Ruiz VE, Carrol JD. *Helicobacter pylori* in the pathogenesis of gastric cancer and gastric lymphoma. *Cancer Lett* 2011; 305: 228-238.
69. Leunk RD, Johnson PT, David BC, Kraft WG, Morgan DR. Cytotoxic activity in broth-culture filtrates of *Campylobacter pylori*. *J Med Microbiol* 1988; 26: 93–99.
70. Testerman TL, Morris J. Beyond the stomach: an updated view of *Helicobacter pylori* pathogenesis, diagnosis, and treatment. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 12781-12808.
71. Cover TL, Blanke SR. *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nat Rev Microbiol* 2005; 3: 320-332.
72. Palframan SL, Kwok T, Gabriel K. Vacuolating cytotoxin a (VacA), a key toxin for *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol* 2012; 2: 92.
73. Papini E, Satin B, Norais N, de Bernard M, Telford JL, Rappuoli R et al. Selective increase of the permeability of polarized epithelial cell monolayers by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin. *J Clin Invest* 1998; 102: 813-820.
74. Lu H, Hsu P, Graham DY, Yamaoka Y. Duodenal ulcer promoting gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol* 2005; 128: 833-848.

75. Gressmann H, Linz B, Ghai R, Pleissner KP, Schlapbach R, Yamaoka Y et al. Gain and loss of multiple genes during the evolution of *Helicobacter pylori*. PLoS Genet 2005; 1: e43.
76. Zhang Z, Zheng Q, Chen X, Xiao S, Liu W, Lu H. The *Helicobacter pylori* duodenal ulcer promoting gene, dupA, in China. BMC Gastroenterol 2008; 8: 49-54.
77. Roesler BM, Oliveira TB, Costa SCB, Zeitune JMR. Is there any relationship between *Helicobacter pylori* dupA gene and the development of early and advanced gastric cancer in Brazilian patients? J Med Res Science 2012; 2: 15-24.
78. Evans DJ Jr, Evans DG, Takemura T, Nakano H, Lampert HC, Graham DY et al. Characterization of a *Helicobacter pylori* neutrophil-activating protein. Infect Immun 1995; 63: 2213-2220.
79. Dundon WG, Nishioka H, Polenghi A, Papinutto E, Zanotti G, Montemurro P et al. The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori*. Int J Med Microbiol 2002; 291: 545-550.
80. Montecucco C, de Bernard M. Molecular and cellular mechanisms of action of the vacuolating cytotoxin (VacA) and neutrophil-activating protein (HP-NAP) virulence factors of *Helicobacter pylori*. Microbes Infec 2003; 5: 715-721.
81. Amedei A, Cappon A, Codolo G, Cabrelle A, Polenghi A, Benagiano M et al. The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* promotes Th1 immune responses. J Clin Invest 2006; 116: 1092-1101.
82. De Bernard M, D'Elios MM. The immune modulating activity of the *Helicobacter pylori* HP-NAP: friend or foe? Toxicon 2010; 56: 1186-1192.
83. Del Giudice G, Covacci A, Telford JL, Montecucco C, Rappuoli R. The design of vaccines against *Helicobacter pylori* and their development. Annu Rev Immunol 2001; 19: 523-563.
84. Kabir S. The current status of *Helicobacter pylori* vaccines: a review. Helicobacter 2007; 12: 89-102.

85. Malfertheiner P, Schultze V, Rosenkranz B, Kaufmann SH, Ulrichs T, Novicki D et al. Safety and immunogenicity of an intramuscular *Helicobacter pylori* vaccine in noninfected volunteers: A phase I study. *Gastroenterol* 2008; 135: 787-795.
86. Peek RM Jr, Thompson SA, Donahue JP, Tham KT, Atherton JC, Blaser MJ et al. Adherence to gastric epithelial cells induces expression of a *Helicobacter pylori* gene, *iceA*, that is associated with clinical outcome. *Proc Assoc Am Physicians* 1998; 110: 531-44.
87. Arents NL, van Zwet AA, Thijs JC, Kooistra-Smid AM, van Slochteren KR, Degener JE et al. The importance of *vacA*, *cagA*, and *iceA* genotypes of *Helicobacter pylori* infection in peptic ulcer disease and gastroesophageal reflux disease. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2603-2608.
88. Gasbarrini A, Franceschi F, Armuzzi A, Ojetti V, Candelli M, Sanz Torre E et al. Extradigestive manifestations of *Helicobacter pylori* gastric infection. *Gut* 1999; 45 (Suppl 1): 9-12.
89. Lorena SLS, Zeitune JMR. Possíveis relações do *Helicobacter pylori* com doenças extra-digestivas. Investigações mais rigorosas são necessárias. *Ver Cond Ter Gastro* 2007; 9: 35-44.
90. Queiroz DMM, Santos A. Isolation of a *Helicobacter* strain from the human liver. *Gastroenterology* 2001; 121: 1023-1024.
91. Gasbarrini A, Carlone E, Gasbarrini G, Chrishom AS. *Helicobacter pylori* and extragastric diseases. *Other Helicobacters. Helicobacter* 2004; 9(suppl.1): 57-66.
92. Oliveira AG, Sanna MGP, Rocha AMC, Santos A, Dani R, Marinho FP et al. *Helicobacter* species in the intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis. *J Clin Microbiolol* 2004; 42: 384-386.
93. Nilsson HO, Petroiustia A, Gabrielli M, Zocco MA, Gasbarrini G, Gasbarrini A. *Other Helicobacters. Helicobacter* 2005; 10(suppl.1): 54-65.
94. Rocha M, Avenaud P, Ménard A, Le Bail B, Balabaud C, Bioulacsage P et al. Association of *Helicobacter* species with hepatitis C, cirrhosis with or without hepatocellular carcinoma. *Gut* 2005; 54:396-401.

95. Xuan SY, Lin N, Quiang X, Shi YX, Jiang WJ. *Helicobacter* infection in hepatocellular carcinoma tissue. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2335-2340.
96. Franceschi F, Gasbarrini A. *Helicobacter pylori* and extragastric diseases. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2007; 21: 325-334.
97. Roubaud-Baudron C, Krolak-Salmon P, Quadrio I, Mégraud F, Salles N. Impact of chronic *Helicobacter pylori* infection on Alzheimer's disease: preliminary results. *Neurobiol Aging* 2012; 33: 1009.
98. Venerito M, Selgrad M, Malfertheiner P. *Helicobacter pylori*: gastric cancer and extragastric malignancies - clinical aspects. *Helicobacter* 2013; Suppl 1: 39-43.
99. Annibale B, Capurso G, Lahner E, Passi S, Ricci R, Maggio F, Delle Fave G. Concomitant alterations in intragastric pH and ascorbic acid concentration in patients with *Helicobacter pylori* gastritis and associated iron deficiency anaemia. *Gut* 2003;52:496-501.
100. Gasbarrini A, Franceschi F. Does *H. pylori* play a role in idiopathic thrombocytopenic purpura and in other autoimmune diseases? *Am J Gastroenterol* 2005;100:1271-1273.
101. Asahi A, Nishimoto T, Okazaki Y, Suzuki H, Masaoka T, Kawakami Y, Ikeda Y, Kuwana M. *Helicobacter pylori* eradication shifts monocyte Fc-gamma receptor balance toward inhibitory Fc-gamma-RIIB in immune thrombocytopenic purpura patients. *J. Clin. Invest.* 2008;118: 2939-2949.
102. Oliveira TB, Roesler BM, Bonnon SHA, Paula EV, Montes CG, Bianchini F, Zeitune JMR, Costa SCB. *Helicobacter pylori* em pacientes com púrpura trombocitopenica idiopática. In: Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FESBE, 23, Águas de Lindoia, 2008.
103. Oliveira TB, Roesler BM, Bonon SHA, Zeitune JMR, Montes CG, Bianchini F, Paula EV, Costa SCB. Possível relação do gene *cagA* do *Helicobacter pylori* com a púrpura trombocitopenica idiopática. In: Reunião Anual de Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FESBE, 24, Águas de Lindoia, 2009.

104. Di Campli C, Gasbarrini A, Nucera E. Beneficial effects of *Helicobacter pylori* eradication on idiopathic chronic urticaria. *Dig Dis Sci* 1998; 143: 1226-1229.
105. Emilia G, Longo G, Luppi M, Gandini G, Morselli M, Ferrara L et al. *Helicobacter pylori* eradication can induce platelet recovery in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2001; 97: 812-814.
106. Ando T, Tsuzuki T, Mizuno T, Minami M, Ina K, Kusugai K et al. Characteristics of *Helicobacter pylori*-induced gastritis: the effect of *H. pylori* eradication in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Helicobacter* 2004; 9: 443-452.
107. Fox JG, Yan L, Shames B, Campbell J, Murphy JG, Li X. Persistent hepatitis and enterocolitis in germfree mice infected with *Helicobacter hepaticus*. *Infect Immun* 1996; 64: 3673-3681.
108. Fox JG, Floyd ED, Shen Z, Feng Y, Taylor NS, Paster BJ et al. Hepatic *Helicobacter* sp. Identified in bile and gallbladder tissues from Chileans with chronic cholecystitis. *Gastroenterol* 1998; 114: 755-763.
109. Kawaguchi M, Saito T, Ohno H, Midorikawa S, Sanji T, Handa Y et al. Bacteria closely resembling *Helicobacter pylori* detected immunohistologically and genetically in resected gallbladder mucosa. *J Gastroenterol* 1996; 31:294-8
110. Fukuda K, Kuroki T, Tajima Y, Tsuneoka N, Kitajima T, Matsuzaki S et al. Comparative analysis of *Helicobacter* DNAs and biliary pathology in patients with and without hepatobiliary cancers. *Carcinogenesis* 2002; 23: 1927-1931.
111. Leong RWL, Sung JJY. *Helicobacter* species and hepatobiliary diseases. *Aliment Pharm Ther* 2002; 16: 1037-1045.
112. Lin TT, Yeh CT, Wu CS, Liaw YF. Detection and partial sequence analysis of *Helicobacter pylori* DNA in bile samples. *Dig Dis Sci* 1995; 40: 2214-2219.
113. Higashi H, Tsutsumi R, Muto S, Sugiyama T, Azuma T, Asaka M et al. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science* 2002; 295: 683-686.
114. Matsukura N, Yokomuro S, Yamada S, Tajiri T, Sundo T, Hadama T et al. Association between *Helicobacter bilis* in bile and hepatobiliary treat

malignancies: *H. bilis* in bile from Japanese and Thai patients with benign and malignant diseases in the biliary tract. *Jpn J Cancer Res* 2002; 93: 842-847.

115. Pandley M, Shukla M. *Helicobacter* species are associated with possible increase in risk of hepatobiliary tract cancers. *Sur Onc* 2009; 18: 51-56.

116. Siringo S, Vaira D, Menegatti M, Piscaglia F, Sofia S, Gaetani M et al. High prevalence of *Helicobacter pylori* in liver cirrhosis: relationship with clinical and endoscopic features and the risk of peptic ulcer. *Dig Dis Sci* 1997; 42:2024-2030.

117. Fan XG, Zou YY, Wu AH, Li TG, Hu GL, Zhang Z. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in patients with hepatitis B. *Br. J. Biomed. Sci.* 1998; 55: 176-178.

118. Pellicano R, Leone N, Berruti M, Cutufia MA, Fiorentino M, Rizzetto M et al. *Helicobacter pylori* seroprevalence in hepatitis C virus positive patients with cirrhosis. *J. Hepatol.* 2000; 33: 648-650.

119. Avenaud P, Marais A, Monteiro L, Le Bail B, Bioulac Sage P, Balabaud C et al. Detection of *Helicobacter* species in the liver of patients with and without primary liver carcinoma. *Cancer* 2000; 89: 1431-1439.

120. Dore MP, Realdi G, Mura D, Graham DY, Sepulveda AR. *Helicobacter* infection in patients with HCV-related chronic hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 1638-1643.

121. Rabelo-Gonçalves EMA, Sgardioli IC, Lopes-Cendes I, Escanhoela CAF, Almeida JRS, Zeitone JMR. Improved detection of *Helicobacter pylori* DNA in formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue from patients with hepatocellular carcinoma using laser capture microdissection (LCM). *Helicobacter* 2013; 18: 244-245.

122. Gomes MA, Priolli DG, Tralhão JG, Botelho MF. Carcinoma hepatocelular: epidemiologia, biologia, diagnóstico e terapias. *Ver Assoc Med Bras* 2013; 59: 514-524.

123. Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer* 2010; 46-765-781.

124. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 69-90.
125. Hall AJ, Wild CP. Liver cancer in low and middle income countries. *BMJ* 326: 994-995, 2003.
126. Mittal S, El-Serag HB. Epidemiology of HCC: consider the population. *J Clin Gastroenterol* 2013; 47: S2-S6.
127. Gonçalves PL, Zago-Gomes M da P, Marques CC, Mendonça AT, Gonçalves CS, Pereira FE. Etiology of liver cirrhosis in Brazil: chronic alcoholism and hepatitis viruses in liver cirrhosis diagnosed in the state of Espírito Santo. *Clinics (Sao Paulo)* 2013; 68: 291-5.
128. Méndez-Sánchez N, Ridruejo E, Alves de Mattos A, Chávez-Tapia NC, Zapata R, Paraná R et al. Latin American Association for the Study of the Liver (LAASL) clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *Ann Hepatol* 2014; 13(Suppl 1): S4-S40.
129. Gonçalves CS, Pereira FEL, Gayotto LCC. Hepatocellular carcinoma in Brazil: report of a national survey (Florianopolis, SC, 1995). *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1997; 39: 165-170.
130. Leão-Filho GC, Lopes EP, Ferraz AA, Moura I, Pernambuco JR, Reis C et al. Hepatitis G virus infection in patients with Hepatocellular Carcinome in Recife, Brazil. *Jpn J Clin Oncol* 2007; 37: 632-636.
131. Paranaguá-Vezozzo DC, Ono SK, Alvarado-Mora MV, Farias AQ, Cunha-Silva M, França JI et al. Epidemiology of HCC in Brazil: incidence risk factors in a ten-year cohort. *Ann Hepatol* 2014; 13: 386-393.
132. Gonçalves PL, Zago-Gomes M da P, Gonçalves CS, Pereira FE. Hepatitis vírus and hepatocellular carcinoma in Brazil: a report from the state of Espírito Santo. *Rer Soc Bras Med Trop* 2014; 47: 559-563.
133. McGlynn KA, Petrick JL, London WT. Global epidemiology of hepatocellular: an emphasis on demographic and regional variability. *Clin Liv Dis* 2015; 19: 223-238.

134. International Agency for Research on Cancer. Hepatitis viroses. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 1994.
135. Tu QV, Okoli AS, Kovach Z, Mendz GL. Hepatocellular carcinoma prevalence and molecular pathogenesis of *Helicobacter* spp. *Fut Microbiol* 2009; 4(10): 1283-1300.
136. Liu CJ, Kao JH. Hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: epidemiology and pathogenic role of viral factors. *J Chin Med Assoc* 2007; 70: 821-829.
137. Farinati F, Cardin R, Bortolami M, Burra P, Russo FP, Ruggi M et al. Hepatitis C virus: from oxygen free radicals to hepatocellular carcinoma. *J Viral Hep* 2007; 14: 821-829.
138. Ott JJ, Stevens GA, Groeger J, Wiersma ST. Global epidemiology of hepatitis B virus infection: new estimates of age-specific HbsAG seroprevalence and endemicity. *Vaccine* 2012; 30: 2212-2219.
139. Chen G, Lin W, Shen F, Iloeje UH, London WT, Evans AA et al. Past HBV viral load as predictor of mortality and morbidity from HCC and chronic liver disease in a prospective study. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 1797-1803.
140. Chen CJ, Yang HI, Iloeje UH. Hepatitis B virus DNA levels and outcomes in chronic hepatitis B. *Hepatology* 2009; 49(Suppl 5): S72-84.
141. McMahon BJ. The natural history of chronic hepatitis B. *Clin Liver Dis* 2010; 14: 381-396.
142. World Health Organization. Hepatitis B. 2010. Available at http://www.who.int/immunization/topics/hepatitis_b/en/index.html. Acessado em maio, 2015.
143. Tagger A, Donato F, Ribeiro ML, Chiesa R, Portera G, Gelatti U et al. Case-control study on hepatitis C virus (HCV) as a risk factor for hepatocellular carcinoma: the role of HCV genotypes and the synergism with hepatitis B virus and alcohol. Brescia HCC Study. *Int J Cancer* 1999; 81: 695-699.
144. Mori M, Hara M, Wada I, Hara T, Yamamoto K, Honda M et al. Prospective study of hepatitis B and C viral infections, cigarette smoking, alcohol

consumption, and other factors associated with hepatocellular carcinoma risk in Japan. *Am J Epidemiol* 2000; 151: 131-139.

145. Donato F, Tagger A, Chiesa R, Ribero ML, Tomasoni V, Fasola M et al. Hepatitis B and C virus infection, alcohol drinking, and hepatocellular carcinoma: a case-control study in Italy. Brescia HCC Study. *Hepatology* 1997; 26:579-84.

146. Donato F, Boffeta P, Puoti M. A meta-analysis of epidemiological studies on the combined effect of hepatitis B and C virus infections in causing hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 1998; 75: 347-354.

147. Franceschi S, Montella M, Polesei J, La Vecchia C, Crispo A, Dal Maso L et al. Hepatitis viroses, alcohol, and tobacco in the etiology of hepatocellular carcinoma in Italy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15: 683-689.

148. La Vecchia C, Negri E, Cavalieri d'Oro L, Franceschi S. Liver cirrhosis and the risk of primary liver cancer. *Eur J Cancer Prev* 1998; 7: 315-320.

149. Turati F, Trichopoulos D, Polesel J, Bravi F, Rossi M, Talamini R et al. Mediterranean diet and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2014; 60: 606-611.

150. Hutchinson SJ, Bird SM, Goldberg DJ. Influence of alcohol on the progression of hepatitis C virus infection: a meta analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3: 1150-1159.

151. Ikeda K, Saitoh S, Susuki Y, Kobayashi M, Tsubota A, Koida I et al. Disease progression and hepatocellular carcinogenesis in patients with chronic viral hepatitis; a prospective observation of 2215 patients. *J Hepatol* 1998; 28: 930-938.

152. Abou-Alfa GK, Marrero J, Renz J, Lencioni R. Hepatocellular carcinoma tumor board: making sense of the technologies. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2015; 35: e213-220.

153. Nair S, Mason A, Eason J, Loss G, Perrillo RP. Is obesity an independent risk factor for hepatocellular carcinoma in cirrhosis? *Hepatology* 2002; 36:150-155.

154. Flemming JA, Yang JD, Vittinghoff E, Kim WR, Terrault NA. Risk prediction of hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis: the ADDRESS-HCC risk model. *Cancer*. 2014; 120:3485-3493.
155. Mokdad AA, Lopez AD, Shahrz S, Lozano R, Mokdad AH, Stanaway J et al. Liver cirrhosis mortality in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *BMC Med* 2014; 12:145.
156. Yasui H, Hino O, Ohtake K, Machinami R, Kitagawa T. Clonal growth of hepatitis B virus-integrated hepatocytes in cirrhotic liver nodules. *Cancer Res* 1992; 52: 6810-6814.
157. Aihara T, Noguchi S, Sasaki Y, Nakano H, Imaoka S. Clonal analysis of regenerative nodules in hepatitis C virus-induced liver cirrhosis. *Gastroenterology* 1994; 107: 1805-1811.
158. Ochiai T, Urata Y, Yamano T, Yamagishi H, Ashihara T. Clonal expansion in evolution of chronic hepatitis to hepatocellular carcinoma as seen at an X-chromosome locus. *Hepatology* 2000; 31: 615-621.
159. Sherman M. Recurrence of hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008; 359: 2045-2047.
160. Anthony PP, Ishak KG, Nayak NC, Poulsen HE, Scheuer PJ, Sobin LH. The morphology of cirrhosis. Recommendations on definition, nomenclature, and classification by a working group sponsored by the World Health Organization. *J Clin Pathol* 1978; 31: 395-414.
161. Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, Donato F. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors. *Gastroenterology* 2004; 127: S35-S50.
162. Yoshida H, Shiratori Y, Moriyama M, Arakawa Y, Ide T, Sata M et al. Interferon therapy reduces the risk for hepatocellular carcinoma: national surveillance program of cirrhotic and noncirrhotic patients with chronic hepatitis C in Japan. IHIT Study Group. Inhibition of Hepatocarcinogenesis by Interferon Therapy. *Ann Intern Med* 1999; 131:174-181.

163. Ross RK, Yuan JM, Yu MC, Wogan GN, Qian GS, Tu JT et al. Urinary aflatoxin biomarkers and risk of hepatocellular carcinoma. *Lancet* 1992; 339: 943-946.
164. Qian GS, Ross RK, Yu MC, Yuan JM, Gao YT et al. A follow-up study of urinary markers of aflatoxin exposure and liver cancer risk in Shanghai, People's Republic of China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994; 3: 3-10.
165. Wild CP, Gong YY. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. *Carcinogenesis* 2010; 31: 71-82.
166. Chen JG, Egner PA, Ng D, Jacolson LP, Muñoz A, Zhu YR et al. Reduced aflatoxin exposure presages decline in liver cancer mortality in an endemic region of China. *Cancer Prev Res (Phila)* 2013; 6: 1038-1045.
167. Ratziu V, Bonyhay L, Di Martino V, Charlotte F, Cavallaro L, Sayegh-Tainturier MH et al. Survival, liver failure, and hepatocellular carcinoma on obesity-related cryptogenic cirrhosis. *Hepatology* 2002; 35: 1485-1493.
168. Sanyal AJ, Banas C, Sargeant C, Luketic VA, Sterling RK, Stravitz RT et al. Similarities and differences in outcomes of cirrhosis due to nonalcoholic steatohepatitis and hepatitis C. *Hepatology* 2006; 43: 682-689.
169. Kojima H, Sakurai S, Matsumura M, Umemoto N, Uemura M, Morimoto H et al. Cryptogenic cirrhosis in the region where obesity is not prevalent. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2080-2085.
170. Yatsuji S, Hashimoto E, Tobari M, Taniai M, Tokushige K, Shirator K. Clinical features and outcomes of cirrhosis due to non-alcoholic steatohepatitis compared with cirrhosis caused by chronic hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* 2009; 24: 248-254.
171. Ascha MS, Hannouneh IA, Lopez R, Tamimi TA, Feldstein AF, Zein NN. The incidence and risk factors of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2010; 51: 1972-1978.
172. Bhala N, Angulo P, van der Poorten et al. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease with advanced fibrosis or cirrhosis: an international collaborative study. *Hepatology* 2011; 54: 1208-1216.

173. Ong JP, Pitts A, Younossi ZM. Increased overall mortality and liver-related mortality in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2008; 49: 608-612.
174. Sanyal A, Poklepovic A, Moyneur E, Barghout V. Population-based risk factors and resource utilization of HCC: US perspective. *Curr Med Res Opin* 2010; 26: 2183-2191.
175. Larsson SC, Wolk A. Overweight, obesity and risk of liver cancer: a meta-analysis of cohort studies. *Br J Cancer* 2007; 97: 1005-1008.
176. Coughlin SS, Calle EE, Teras LR, Petrelli J, Thun MJ. Diabetes mellitus as a predictor of cancer mortality in a large cohort of US adults. *Am J Epidemiol* 2004;159: 1160-1167.
177. El-Serag HB, Richardson PA, Everhart JE. The role of diabetes in hepatocellular carcinoma: a case-control study among United States veterans. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2462-2467.
178. Wang P, Kang D, Cao W, Wang Y, Liu Z. Diabetes mellitus and risk of hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Diabetes Res Rev* 2012; 28: 109-122.
179. Wang C, Wang X, Gong D, Ben Q, Qiu W, Chen Y et al. Increased risk of hepatocellular carcinoma in patients with diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Int J Cancer* 2012; 130: 1639-1648.
180. Chen J, Han Y, Xu C, Xiao T, Wang B. Effect of type 2 diabetes mellitus on the risk for hepatocellular carcinoma in chronic liver diseases: a meta-analysis of cohort studies. *Eur J Cancer Prev* 2015; 24: 89-99.
181. Baffy G, Brunt EM, Caldwell SH. Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: an emerging menace. *J Hepatol* 2012; 56: 1384-1391.
182. Humpage AR, Falconer IR. Mycrocystin-LR and liver tumor promotion: effects on cytokinesis, ploidy, and apoptosis in cultured hepatocytes. *Env Toxicol* 1999; 14: 61-75.
183. Bosch FX, Ribes J, Cléries R, Díaz M. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *J HIV Ther* 2005; 8: 77-84.

184. El-Serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterol* 2007; 132: 2557-2576.
185. Pellicano R, Ménard A, Rizzetto M, Mégraud F. *Helicobacter* species and liver diseases: association or causation? *Lancet Infect. Dis.* 2008; 8: 254-260.
186. Harrison AS, Bacon BR. Relation of hemochromatosis with hepatocellular carcinoma: epidemiology, natural history, pathophysiology, screening, treatment and prevention. *Med Clin North Am* 2005; 89: 391-409.
187. ElMBERG M, Hulterantz R, EkBOM A, Brandt L, Olsson S, Olsson R et al. *Gastroenterol* 2003; 125: 1733-1741.
188. Eriksson S, Carlson J, Velez R. Risk of cirrhosis and primary liver cancer in alpha 1-antitrypsin deficiency. *N Engl J Med* 1986; 314: 736-739.
189. Needham M, Stockley RA. Alpha 1-antitrypsin deficiency 3: clinical manifestations and natural history. *Thorax* 2004; 59: 441-445.
190. Raju K, Bangalore GN, Thuruvekere SN, Pathavanalli VN. Wilson's disease: A Clinical autopsy case report with review of literature. *J Nat Sci Biol Med* 2015; 6: 248-252.
191. Thattil R, Dufour JF. Hepatocellular carcinoma in a non-cirrhotic patient with Wilson's disease. *W J Gastroenterol* 2013; 19: 2110-2113.
192. Pfeiffenberger J, Mogler C, Gotthardt DN, Schulze-Bergkamen H, Litwin T, Reuner U et al. Hepatobiliary malignancies in Wilson Disease. *Liver Int* 2015; 35: 1615-1622.
193. Yu SZ. Primary prevention of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 1995; 10: 674-682.
194. Zhou M, Tu WW, Xu J. Mechanisms of microcystin-LR-induced cytoskeletal disruption in animal cells. *Toxicon* 2015;101: 92-100.
195. Svircev Z, Baltić V, Gantar M, Juković M, Stojanović D, Baltić M. Molecular aspects of microcystin-induced hepatotoxicity and hepatocarcinogenesis. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 2010; 28:39-59.

196. Yeoman AD, Al-Chalabi T, Karani JB, Quaglia A, Devlin J, Mieli-Vergani G et al. Evaluation of risk factors in the development of hepatocellular carcinoma in autoimmune hepatitis: Implications for follow-up and screening. *Hepatol* 2008; 48: 863-870.
197. Flores A, Marrero JA. Emerging trends in hepatocellular carcinoma. Focus on diagnosis and therapeutics. *Clin Med Insights Oncol* 2014; 8: 71-76.
198. Danielsson Borssén A, Almer S, Prytz H, Wallerstedt S, Friis-Liby IL, Bergquist A, Nyhlin N. Hepatocellular and extrahepatic cancer in patients with autoimmune hepatitis-a long-term follow-up study in 634 Swedish patients. *Scand J Gastroenterol* 2015; 50: 217-223.
199. Linet MS, Gridley G, Nyren O, Mellekjaer L, Olsen JH, Keehn S et al. Primary liver cancer, other malignancies, and mortality risks following porphyria: a cohort study in Denmark and Sweden. *Am J Epidemiol* 1999; 149: 1010-1015.
200. Stewart MF. Review of hepatocellular cancer, hypertension and renal impairment as late complications of acute porphyria and recommendations for patient follow-up. *J Clin Pathol* 2012; 65: 976-980.
201. Gisbert JP, Garcia-Buey L, Pajares JM, Moreno-Otero R. Prevalence of hepatitis C virus infection in porphyria cutanea tarda: systematic review and meta-analysis. *J Hepatol* 2003; 39: 620-627.
202. Guo YM, Wei WY, Shen XZ. Tumor necrosis factor 308 polymorphisms and hepatocellular carcinoma risk: a meta-analysis. *Hepatogastroenterol* 2010; 57: 926-931.
203. Qin H, Liu B, Shi T, Liu Y, Sun Y, Ma Y. Tumor necrosis factor-alpha polymorphisms and hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. *J Int Med Res* 2010; 38: 760-768.
204. White DL, Li D, Nurgalieva Z, El-Serag HB. Genetic variants of glutathione S-transferase as possible risk factors for hepatocellular carcinoma: a HuGE systematic review and meta-analysis. *Am J Epidemiol* 2008; 167: 377-389.

205. Nilsson HO, Mulchandani R, Tranberg KG, Stenram U, Wadström T. *Helicobacter* species identified in liver from patients with cholangiocarcinoma e hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol* 2001; 121: 1023-1024.
206. Verhoef C, Pot RGJ, de Man RA, Zondervan PE, Kuipers EJ, Ijzermans JN et al. Detection of identical *Helicobacter* DNA in the stomach and in the non-cirrhotic liver of patients with hepatocellular carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15: 1171-1174.
207. Pellicano R, Mazzafero V, Grigioni WF, Cutufia MA, Fagoonee S, Silengo L et al. *Helicobacter* species sequences in liver samples from patients with and without hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroentrol* 2004; 10: 598-601.
208. Ponzetto A, Pellicano R, Leone N, Berrutti M, Turrini F, Rizzetto M. *Helicobacter pylori* seroprevalence in cirrhotic patients with hepatitis B virus infection. *Nether J Med* 2000; 56: 206-210.
209. Ponzetto A, Pellicano R, Cutufia MA, Turrini F, Grigioni WF et al. *Helicobacter* infection and cirrhosis in hepatitis C virus carriage: is it na innocent bystander or a troublemaker? *Med Hypo* 2000; 54: 275-277.
210. Spinzi G, Pellicano R, Minole G, Terreni N, Cutufia MA, Fagoonee S et al.. *Helicobacter pylori* seroprevalence in hepatitis C virus positive patients with cirrhosis. The Como cross-sectional study. *Panminerva medica* 2001, 43: 85-87.
211. Leone N, Pellicano R, Brunello F, Cutufia MA, Berruti M, Fagoone S et al. *Helicobacter pylori* seroprevalence in patients with cirrhosis of the liver and hepatocellular carcinoma. *Cancer Det Prev* 2003; 27: 494-497.
212. Ponzetto A, Pellicano A, Redaelli A, Rizzetto M, Roffi L. *Helicobacter pylori* infection in patients with hepatitis C virus positive chronic liver diseases. *New Micobiol* 2003; 26: 321-328.
213. Queiroz DM, Rocha AM, Rocha GA, Cinque SM, Oliveira AG et al. Association between *Helicobacter pylori* infection and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus. *Dig Dis Sci* 2006; 51: 370-373.
214. Casafont F, Martin L, Pons-Romero F. Bacterial overgrowth in the small intestine in chronic liver disease. In: Blum, HE; Bode, J.Ch; Bode, Ch; Sartor, RB,

editors. Gut and the liver. London: Kluwer Academic Publishers; 1998. Pp 332-337.

215. Tsuneyama K, Harada K, Kono N, Hiramatsu K, Zen Y, Sendo Y et al. Scavenger cells with Gram-positive bacterial lipoteichoic acid infiltrate around the damaged interlobular bile ductus of primary biliary cirrhosis. *J Hepatol* 2001; 35: 156-163.

216. Itoh M, Wada K, Tan S, Kitano Y, Kai J, Makino I. Antibacterial action of bile acids against *Helicobacter pylori* and changes in its ultrastructural morphology: effect of unconjugated dihydroxy bile acid. *J Gastroenterol* 1999; 34(5): 571-576.

217. Ito K, Nakamura M, Toda G, Negishi M, Torii A, Ohno T. Potential role of *Helicobacter pylori* in hepatocarcinogenesis. *Int J Mol Med* 2004; 13(2): 221-227.

218. Al-Soud A, Stenram U, Ljungh A, Tranberg KG, Nilsson HO, Wadstrom T. DNA of *Helicobacter* spp. and common gut bacteria in primary liver carcinoma. *Dig Liv Dis* 2008; 40(2): 126-131.

219. Ihrig M, Schrenzel MD, Fox JG. Differential susceptibility to hepatic inflammation and proliferation in AXB recombinant inbred mice chronically infected with *Helicobacter hepaticus*. *Am J Pathol* 1999; 155: 571-582.

220. Taylor NS, Fox JG, Yan L. *In vitro* hepatotoxic factor in *Helicobacter hepaticus*. *H. pylori* and other *Helicobacter* species. *J Med Microbiol* 1995; 42: 48-42.

221. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 2001; 357: 539-545.

222. Ito K, Yamaoka Y, Ota H, El-Zimaity H, Graham DY. Adherence, internalization and persistence of *Helicobacter pylori* in hepatocytes. *Dig Dis Sci* 2008; 53: 2541-2549.

223. Huang Y, Fan XG, Wang ZM, Zhou JH, Tian XF, Li N. Identification of *Helicobacter* species in human liver samples from patients with primary hepatocellular carcinoma. *J Clin Pathol* 2004; 57: 1273-1277.

224. Bulajic M, Panic N, Stimec B, Isaksson B, Jesenofsky R, Schneider-Brachert W et al. PCR in *Helicobacter* spp. Diagnostic in extragastric malignancies of digestive system. Eur J Gastroenterol Hepatol 2012; 24: 117-125.
225. Shibata D. Extraction of DNA from paraffin-embedded tissue for analysis by polymerase chain reaction: new tricks from an old friend. Human Pathol 1994; 25: 561-563.
226. Bumer G, Rabinovitch OS, Loeb LA. Analysis of c-Ki-ras mutations in human colon carcinoma by cell sorting polymerase chain reaction and DNA sequencing. Cancer Res 1989; 49: 2141-2146.
227. Frye RA, Benz CC, Liu E. Detection of amplified oncogenes by differential polymerase chain reaction. Oncogene 1989; 4: 1153-1157.
228. Pääbo S. Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning and enzymatic amplification. Proc Natl Acad Sci 1989; USA 86: 1939-1943.
229. Brandsma JL. Detection and typing of papillomavirus DNA in formaldehyde-fixed paraffin-embedded tissue. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1990; 116: 844-848.
230. Muñoz-cadavid C, Rudd S, Zaki SR, Patel M, Moser SA, Brandt ME et al. Improving molecular detection of fungal DNA in formalin-fixed paraffin-embedded tissues: comparison of five tissue DNA extraction methods using panfungal PCR. J Clin Microbiol 2010; 48: 2147-2153.
231. Greer CE, Wheller CM, Manos MM. Sample preparation and PCR amplification from paraffin-embedded tissues. PCR Methods Appl 1994; 3(Suppl): S113-122.
232. Pavelic J, Gall-Troselj K, Bosnar MH, Kardum MM, Pavelic K. PCR amplification of DNA from archival specimens. A methodological approach. Neoplasma 1996; 43: 75-81.
233. Liu L, Johnson RM, Traweek ST. Rearrangement of the BCL-2 gene in follicular lymphoma. Diagn Mol Pathol 1993; 2: 241-247.

234. Shi SR, Datar R, Liu C, Wu L, Zhang Z, Cote RJ et al. DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: heat-induced retrieval in alkaline solution. *Histochem Cell Biol* 2004; 122: 211-218.
235. Bonin S, Petrera F, Rosai J, Stanta G. DNA and RNA obtained from Bouin's fixed tissues. *J Clin Pathol* 2005; 58: 313-316.
236. Tian XF, Fan XG, Zhang Y, Huang Y, Dai H, Ying RS. Procurement and identification of bacteria in paraffin-embedded liver tissues of hepatocellular carcinoma by laser-assisted microdissection technique. *APMIS* 2008; 116: 10-15.
237. Pirouz T, Zounubi L, Keivani H, Rakhshani N, Hormazdi M. Detection of *Helicobacter pylori* in paraffin-embedded specimens from patients with chronic liver diseases, using the amplification method. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 1456-1459.
238. Pugh RN, Murray-Lyon IM, Dawson JL, Pietroni MC, Williams R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg* 1973; 646-649.
239. Rabelo-Gonçalves E, Rõesler B, Guardia AC, Milan A, Hara N, Escanhoela C et al. Evaluation of five DNA extraction methods for detection of *H. pylori* in formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) liver tissue from patients with hepatocellular carcinoma. *Pathol Res Pract* 2014; 210:142-6.
240. Nascimento EM, Spinelli MO, Rodrigues CJ. Protocolo da extração de DNA de material parafinado para análise de microssatélites em leiomioma. *J Bras Patol Med Lab* 2003; 39: 253-255.
241. Saiki RK, Gelfand S, Stoffel, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988; 239: 487-491.
242. Rocha GA, Queiroz DMM, Mendes EN, Lage AP, Barbosa AJ. Simple carbolfuchsin staining for showing *C. pylori* and other spiral bacteria in gastric mucosa. *J Clin Pathol* 1989; 42: 1004-1005.
243. Bosseti C, Turati F, La Vecchia C. Hepatocellular carcinoma epidemiology. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2014; 28: 753-770.

244. Cougot D, Neuvent C, Buendia MA. HBV induced carcinogenesis. *J Clin Virol* 2005; 34(Suppl1): S75-S78.
245. Kew MC. Prevention of hepatocellular carcinoma. *HPB (Oxford)* 2005; 7: 16-25.
246. Zanetti AR, Van Damme P, Shouval D. The global impact of vaccination against hepatitis B: a historical overview. *Vaccine* 2008; 26: 6266-6273.
247. Coppola N, De Stefano G, Marrocco C, Scarano F, Scolastico C, Tarantino L et al. *Helicobacter* spp. and liver diseases. *Infez Med* 2003; 11: 201-207.
248. Esmat G, El-Bendary M, Zakarya S, Ela MA, Zalata K. Role of *Helicobacter pylori* in patients with HCV-related chronic hepatitis and cirrhosis with or without hepatocellular carcinoma: possible association with disease progression. *J Vir Hep* 2012; 19: 473-479.
249. Colwell RR, Brayton P, Herringthorn D, Tall B, Huq A, Levine MM. Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* O1 revert to a cultivable state in the human intestine. *World J Microbiol Biotechnol* 1996; 12: 28-31.
250. Senoh M, Ghosh-Banerjee J, Ramamurthy T, Colwell RR, Miyoshi S, Nair GB et al. Conversion of viable but nonculturable enteric bacteria to culturable by co-culture with eukaryotic cells. *Microbiol Immunol* 2012; 56: 112-115.
251. Su X, Chen X, Hu J, Shen C, Ding L. Exploring the potential environmental functions of viable but non-culturable bacteria. *World J Microbiol Biotechnol* 2013; 29: 2213-2218.
252. Li N, Han L, Chen J, Lin X, Chen H, She F. Proliferative and apoptotic effects of gastric epithelial cells induced by coccois *Helicobacter pylori*. *J Basic Microbiol* 2013; 53: 147-155.
253. Castera L, Pawlotsky JM. Noninvasive diagnosis of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *MedGenMed* 2005; 7:39-43.
254. Sakr SA, Badrah GA, Sheir RA. Histological and histochemical alterations in liver of chronic hepatitis C virus with *Helicobacter pylori* infection. *Biom Pharmacother* 2013; 67: 367-374.

255. Goo MJ, Ki MR, Lee HR, Yang HJ, Yuan DW, Hong IH et al. *Helicobacter pylori* promotes hepatic fibrosis in the animal model. *Lab Invest* 2009; 89: 1291-1303.
256. Ki MR, Goo MJ, Park JK, Hong IH, Ji AR, Han SY et al. *Helicobacter pylori* accelerates hepatic fibrosis by sensitizing transforming growth factor- β 1-induced inflammatory signaling. *Lab Invest* 2010; 90: 1507-1516.
257. García-Trevijano ER, Iraburu M, Fontana L, Domínguez-Rosales JA, Auster A, Covarrubias-Pinedo A et al. Transforming growth factor 1 induces the expression of alpha (1) procollagen mRNA by a hydrogen peroxide C/EBP dependent mechanism in rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 1999; 29: 960-970.
258. Wheeler M, Kono H, Yin M, Nakagami M, Uesugi T, Arteel G. The role of Kupffer cell oxidant production in early ethanol-induced liver disease. *Free Radic Biol Med* 2001; 31: 1544.
259. Nault JC. Pathogenesis of hepatocellular carcinoma according to aetiology. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2014; 28: 937-947.
260. De Bac C, Stroffolini T, Gaeta GB, Taliani G, Giusti G. Pathogenic factors in cirrhosis with and without hepatocellular carcinoma: a multicenter Italian study. *Hepatology* 1994; 20: 1225-1230.
261. Morgan TR, Mandayam S, Jamal MM. Alcohol and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol* 2004; 127: 587-596.
262. Sam SS, Lebel KA, Bissaillon CL, Tafe LJ, Tsongalis GJ, Lefferts JA. Automation of genomic DNA isolation from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Pathol Res Pract* 2012; 208: 705-707.
263. Chen R, Fan XG, Huang Y, Li N, Chen H. *In vitro* cytotoxicity of *Helicobacter pylori* on hepatocarcinoma HepG2 cells. *Al Zheng* 2004; 23: 44-49.
264. Chen W, Li D, Cannan RJ, Stubbs RS. Common presence of *Helicobacter* DNA in the gallbladder of patients with gallstone diseases and controls. *Dig Liv Dis* 2003; 35: 237-243.

265. Matsumoto A, Arao S, Otsuki M. Role of [beta]-1 integrins in adhesion and invasion of hepatocellular carcinoma cells. *Hepatol* 1999; 29: 68-74.
266. Yanagisawa N, Geironson L, Al-Soud WA, Ljung S. Expression of matrix metalloprotease-2, -7, and -9 on human colon, liver and bile duct cell lines by enteric and gastric *Helicobacter* species. *FEMS Immuno Med Microbiol* 2005; 44: 197-204.
267. Hirata Y, Maeda S, Mitsuno Y, Akanuma M, Yamaji Y, Ogura K et al. *Helicobacter pylori* activates the cyclin D1 gene through mitogen-activated protein kinase pathway in gastric cancer cells. *Infect Immun* 2001; 69: 3965-3971.
268. Zhang YFX, Huang YK, Chen R, Dai H. *Helicobacter pylori* enhances cyclin D1, PCNA expression in HepG2 cell line. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2004; 12: 695-696.
269. Caputo R, Tuccillo C, Manzo BA, Zarrilli R, Tortora G, Blanco C del V et al. *Helicobacter pylori* VacA toxin up-regulates vascular endothelial growth factor expression in MKN 28 gastric cells through an epidermal growth factor receptor-cyclooxygenase-2-dependent mechanism. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2015-2021.
270. Francavilla A, Ieradi E, Francavilla R, Principi M, Gentile A, Margiotta M et al. Immunohistochemical detection of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin in the hepatocytes of patients with isolated hypertransaminasaemia. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1999; 31: 669-674.
271. Teufel A, Staib F, Kanzler S, Weinmann A, Schulze-Bergkamen H, Galle PR. Genetics of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2271-2282.
272. Kodama M, Murakami K, Okimoto T, Watanabe K, Fujioka T, Sato R. Expression of mutant type-p53 products in *H. pylori* - associated chronic gastritis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1541-1546.
273. Wang J, Chi DS, Kalin GB, Sosinski C, Miller LE, Burja I, Thomas E. *Helicobacter pylori* infection and oncogeneexpressions in gastric carcinoma and its precursor lesions. *Dig Dis Sci* 2002; 47: 107-113.

274. Liu ZF; Chen CY; Tang et al. Gene-expression profiles in gastric epithelial cells stimulated with spiral and coccoid *Helicobacter pylori*. J Med Microbiol 2006; 55: 1009-1015.
275. Kondo S, Shinomura Y, Kanayama S, Higashimoto Y, Kiyohara T, Yasunaga Y et al. *Helicobacter pylori* increases gene expression of hepatocyte growth factor in human gastric mucosa. Biochem Biophys Res Commun 1995; 210: 960-965.
276. Konturek PC, Konturek SJ, Sulekova Z, Meixner H, Bielanski W, Starzynska T et al - Expression of hepatocyte growth factor, transforming growth factor α , apoptosis related proteins Bax and Bcl-2, and gastrin in human gastric cancer. Aliment Pharmacol Ther 2001; 15: 989-999.
277. Suzuki M, Suzuki H, Masaoka T, Tanaka S, Susuki K, Ishii H. *Helicobacter pylori* eradication treatment modulates epithelial cell proliferation and tissue content of hepatocyte growth factor in gastric mucosa. Aliment Pharmacol Ther 2004; S1: 158-164.

APÊNDICES

Dados demográficos e clínicos dos pacientes do grupo GA (CHC)

Código	Idade	Sexo	Etiologia do carcinoma hepatocelular						fatores associados	fatores assoc + álcool	Escore Child-Pugh	MELD	PCR
			VHC	VHB	consumo álcool	hemocromatose	deficiência α-1	criptogénica					
785412-9	58	M	1	0	1	0	0	0	1	2	1	-	2
257924-7	51	M	1	0	1	0	0	0	1	2	1	-	2
297435-8	52	M	1	0	1	0	0	0	1	2	1	-	1
1003541-7	62	M	0	0	1	0	0	0	0	1	1	-	2
988504-7	45	M	1	0	1	0	0	0	1	2	1	-	1
720425-3	34	M	0	1	0	0	0	0	1	1	1	-	1
691761-9	67	M	1	0	0	1	0	0	2	2	1	-	2
774950-6	56	M	0	1	1	0	0	0	1	2	1	-	2
1038050-1	72	M	0	0	1	0	0	0	0	1	1	-	2
1046812-1	73	M	0	0	1	0	0	0	0	1	1	-	2
789164-2	35	M	1	0	1	0	0	0	1	2	1	-	2
962616-8	39	M	1	0	1	0	0	0	1	2	1	10	2
1037189-7	52	M	0	0	0	0	0	1	1	1	3	20	1
1025334-4	57	F	1	0	0	0	0	0	1	1	1	-	2
285403-3	65	M	1	0	0	1	0	0	2	2	2	-	2
672769-2	59	F	1	0	1	0	0	0	1	2	1	24	1
1002883-0	60	M	0	0	0	0	1	0	1	1	3	23	1
1030622-0	52	M	1	0	1	0	0	0	1	2	3	13	2
1007110-0	54	M	1	0	1	0	0	0	1	2	3	20	2
1004576-1	46	M	1	1	1	0	0	0	2	3	2	29	1
1035586-7	65	M	0	0	1	0	0	0	0	1	3	28	1
1042751-7	52	F	0	1	0	1	0	0	2	2	3	25	1
910718-8	59	F	0	0	1	0	0	0	0	1	2	24	2
671202-7	58	M	1	0	1	0	0	0	1	2	1	24	1
691818-8	48	M	1	0	0	0	0	0	1	1	1	24	1
996779-8	46	M	1	0	1	0	0	0	1	2	2	24	1
1017608-9	46	M	1	0	1	1	0	0	2	3	3	24	2
420555-7	56	M	0	0	1	0	0	0	0	1	2	20	2
977675-7	63	M	0	0	1	0	0	0	0	1	1	24	1
894935-1	56	M	1	0	0	0	0	0	1	1	2	24	1
861712-2	62	F	1	0	0	0	0	0	1	1	1	24	2
1021779-2	63	M	1	0	0	0	0	0	1	1	2	24	2
893408-1	39	M	0	1	0	0	0	0	1	1	1	24	2
724795-4	60	M	1	0	1	0	0	0	1	2	2	20	2
1057114-8	50	M	1	0	1	0	0	0	1	2	2	20	1
424863-0	35	F	0	0	0	0	0	1	1	1	2	24	2
319399-7	43	M	1	0	0	0	0	0	1	1	3	23	1
1063387-9	71	F	0	0	0	0	0	1	1	1	1	-	1
1082286-0	53	M	1	0	1	0	0	0	1	2	1	-	2
1002135-1	49	M	1	0	0	0	0	0	1	1	2	-	1
824007-4	43	M	1	0	0	0	0	0	1	1	1	29	1
904058-6	51	M	1	0	0	0	0	0	1	1	1	20	1
995659-8	50	M	1	0	1	0	0	0	1	2	2	24	1
862394-3	52	M	1	0	1	0	0	0	1	2	2	29	1
1007431-0	50	M	1	0	1	0	0	0	1	2	1	24	2
415004-5	55	M	1	0	1	0	0	0	1	2	1	29	2
697651-0	50	M	1	0	1	0	0	0	1	2	3	21	2
733445-2	58	M	0	0	1	1	0	0	1	2	2	-	1
884287-4	44	M	0	1	1	0	0	0	1	2	1	24	2
631349-9	69	F	1	0	0	0	0	0	1	1	3	24	2
910831-6	45	M	1	0	0	0	0	0	1	1	3	24	1
442441-0	46	M	1	0	0	0	0	0	1	1	3	-	2
924526-9	52	M	0	0	1	0	0	0	0	1	2	29	1
950250-8	54	M	1	0	0	0	0	0	1	1	2	20	1
1005537-6	58	M	1	0	1	0	0	0	1	2	3	30	2
701830-3	57	M	1	0	0	0	0	0	1	1	2	-	1
1015085-3	50	M	1	0	1	0	0	0	1	2	1	-	1

Apêndice 1

Etiologia do CHC e PCR

0-Ausente; 1-Positivo; 2-Negativo

Dados demográficos e clínicos dos pacientes do grupo GB (Controle)

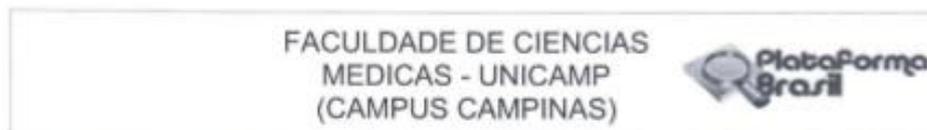
CÓDIGO	SEXO	IDADE	PCR
887003-9	F	19	1
658021-4	F	27	2
697623-3	M	19	1
409566-3	F	18	2
1046172-1	F	28	2
323763-8	F	39	2
980803-5	F	32	2
695472-8	M	51	2
405538-8	M	52	2
990496-6	M	18	1
1007892-6	M	38	1
998082-7	M	39	2
808693-1	M	50	2
1031856-0	F	37	2
278066-4	M	62	2
723429-5	F	59	1
1061630-2	F	43	2
389038-1	F	33	2
1070700-8	F	42	2
683370-2	F	30	2
1092748-8	F	30	1
121390-7	F	38	1
716297-8	F	67	2
1027090-2	F	36	2
859515-0	M	56	2
758361-1	F	59	1
788098-0	M	25	2
684543-8	M	56	2
936763-1	M	56	2

Apêndice 2

1- Positivo
2- negativo

ANEXOS

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCM/UNICAMP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Pesquisa do *Helicobacter pylori* em tecido hepático fixado e emblocado de pacientes com carcinoma hepatocelular

Pesquisador: Elizabeth Maria Afonso Rabelo Gonçalves

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 15183513.6.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas - UNICAMP

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 414.616

Data da Relatoria: 30/09/2013

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma emenda ao projeto original. Neste estudo será realizado com dois grupos: GA e GB. No grupo GA serão incluídas 55 amostras de tecido hepático fixado e emblocado de pacientes com carcinoma hepatocelular e o grupo GB será composto por 35 amostras de tecido hepático fixado e emblocado com alterações histológicas

mínimas ou dentro dos limites da normalidade, constituindo o grupo controle. Será extraído o DNA genômico destas amostras para detecção do *Helicobacter pylori* através da PCR. Os resultados serão submetidos para análise estatística visando a comparação da presença da bactéria nos dois grupos, bem como sua relação com os vírus das hepatites tipo B e C.

Objetivo da Pesquisa:

Amplificar e sequenciar o DNA do *H. pylori* em amostras fixadas e emblocadas de tecido tumoral e peritumoral de pacientes com CHC;

- Realizar a técnica da microdissecção a laser para obtenção do DNA específico da bactéria;
- Verificar a morfologia do *H. pylori* através da microscopia eletrônica por varredura;
- Comparar os resultados obtidos com a pesquisa do *H. pylori* em fragmentos parafinados do fígado de indivíduos sem doença hepática preexistente;
- Verificar possível relação entre a presença do *H. pylori* com os vírus das hepatites tipo B e C nos

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



Continuação do Parecer: 414.616

pacientes com CHC.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não haverá riscos, tampouco benefícios diretos aos participantes envolvidos na pesquisa, pois trata-se de um estudo utilizando-se de amostras já coletadas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Serão utilizadas amostras fixadas e emblocadas de tecido hepático de 45 amostras de pacientes atendidos no Ambulatório de Lesões Focais e no Ambulatório de Gastroenterologia do HC/UNICAMP.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

esta emenda refere-se ao aumento da amostra.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

-apresentou carta solicitando emenda ao projeto original.

Recomendações:

- sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

- emenda aprovada.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

CAMPINAS, 03 de Outubro de 2013

Assinador por:
Fátima Aparecida Bottcher Luiz
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

Página 02 de 02

Anexo 1

LETTER TO THE EDITOR

Improved Detection of *Helicobacter pylori* DNA in Formalin-fixed Paraffin-embedded (FFPE) Tissue of Patients with Hepatocellular Carcinoma Using Laser Capture Microdissection (LCM)

Dear Editor,

Helicobacter DNA has been detected in hepatic tissues from patients with various hepatobiliary diseases, mainly cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). Although the role of *Helicobacter* spp. in pathogenesis of these diseases remains unclear, the available data suggest that *Helicobacter* infection may play a role in hepatic carcinogenesis [1]. Considering that HCC is one of the most common malignancies with more than 500,000 new tumors diagnosed annually [2], further studies related to *H. pylori* and development of HCC have fundamental importance on the understanding of its pathogenesis. Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue represents an extraordinary source for molecular studies as genomic DNA can be extracted from this sample. However, DNA extraction from FFPE tissues is challenging because nucleic acids are commonly fragmented and cross-linked with proteins. Furthermore, methods of DNA extraction from FFPE tissue are generally laborious and time-consuming. Laser capture microdissection (LCM) is a recently developed technique for isolation of pure populations of cells from tissue sections by microscopic visualization. Because of its high precision and accuracy, LCM has been employed in cancer-related studies. In this work, we used LCM technique to improve the detection of *H. pylori* in FFPE liver from patients with HCC. With this aim, six *H. pylori*-positive samples detected by polymerase chain reaction (PCR) with *H. pylori*-specific 16S rRNA primers were selected. The sequence of the sense primer (JW21) was 5'-GCGACCTGCTGGAA-CATTAC-3' (position 691-710) and the antisense primer (JW22) was 5'-CGTTAGCTCCATTACTGGAGA-3' (position 829-809) [3]. Tissue samples were cut on 0.17 mm PEN membrane-covered slides (Carl Zeiss, Microimaging GmbH, Göttingen, Germany) and then routine staining with carbol fuchsin was performed [4]. Thereafter, stained bacteria were microdissected using a PALM MicroBeam system (Carl Zeiss, Microimaging GmbH, Göttingen, Germany) and then ejected

into the Eppendorf tube cap by a single laser shot (Fig. 1C,D). After microdissection, a digestion buffer was added into Eppendorf for DNA extraction. The crude lysate was directly employed as template for PCR [4]. The samples were further amplified using *H. pylori* 16S rRNA primers as previously described [3], and amplicons were identified by sequence analysis. Microorganisms resembling *H. pylori* were observed in hepatic sinus from HCC samples (Fig. 1A,B). The number of cocci was greater than of bacilli as previously described [5]. PCR results showed that all six microdissected samples were positive for 16S rRNA gene and showed 98% similarity to 16S rRNA gene of *H. pylori* by sequence analysis (GeneBank accession number CP003419.1). Nevertheless, we cannot exclude the possibility of cross-reaction of these primers with other *Helicobacter* spp. These results demonstrated that LCM can be extensively applied for identification of *H. pylori* in FFPE liver tissue of HCC patients. Considering that bacteria were mainly found in peritumoral tissue, this technique was highly effective for obtaining a targeted bacterial population within a selected area in the HCC tissue. Beyond that, LCM simplified the *H. pylori* detection because extracted DNA was used directly as a template for PCR amplification. Further studies will be performed to isolate *H. pylori* from other tissues using LCM technique.

Acknowledgements and Disclosures

We thank to Dr. Marilía Afonso Rabelo Buzalaf and Dr. Bruna Maria Roesler for their contribution to English version of the letter.

Competing interests: the authors have no competing interest.

Financial Support

This work was supported by grants from FAPESP (2009/09889-5) and FAEPEX (10111).

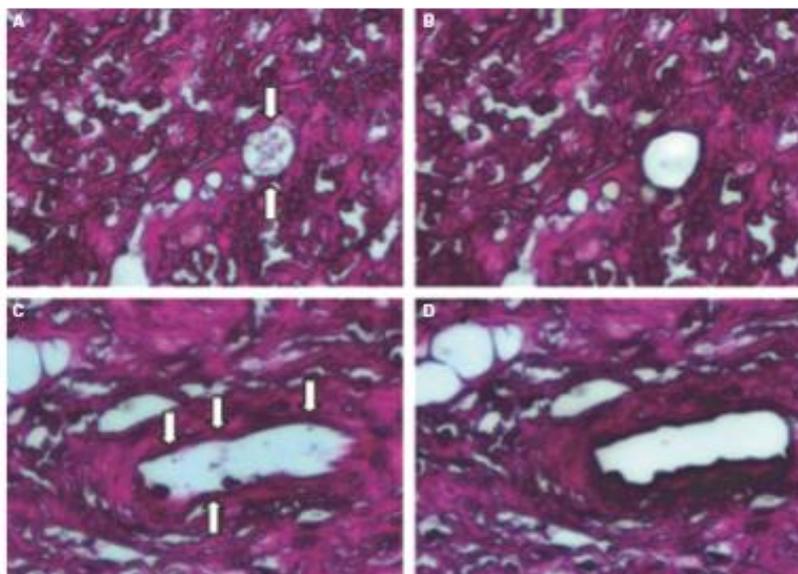


Figure 1 Optical microscopy of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) liver fragments of hepatocellular carcinoma (HCC) patients with PCR positive *H. pylori* 16S rRNA and stained with carbol fuchsin. In (A) and (C) bacteria are represented within sinusoid (arrows) before microdissection (magnification: 610X). In (B) and (D) the same samples are represented after bacterial microdissection (magnification: 610X).

Elizabeth Maria Afonso Rabelo-Gonçalves,^{*} Ilária C. Sgardioli,[†] Iscia Lopes-Cendes,[†] Cecília Amélia Fazzio Escanhoela,[‡] Jazon Romilson de Souza Almeida[§] and José Murilo Robilotta Zeitune[§]

^{*}Laboratory of Bacteriology, Gastrocenter, State University of Campinas, Campinas, São Paulo Brazil, [†]Department of Medical Genetic, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas, São Paulo Brazil, [‡]Department of Anatomic Pathology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas, São Paulo Brazil, [§]Gastrocenter, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas, São Paulo Brazil

Reprint Requests to: Elizabeth M. A. Rabelo-Gonçalves, Laboratory of Bacteriology, Gastrocenter, State University of Campinas, Rua Carlos Chagas 420, 13083-878, Campinas, São Paulo, Brazil. E-mail: elizabeth.goncalves@gc.unicamp.br

References

- 1 Tu QV, Okoli AS, Kovach Z, Mendz GL. Hepatocellular carcinoma: prevalence and molecular pathogenesis of *Helicobacter* spp. *Future Microbiol* 2009; 4: 1283-301.
- 2 Trevisani F, Cantarini MC, Wands JR, Bernardi M. Recent advances in the natural history of hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 2008; 7: 1299-305.
- 3 Piroux T, Zounoubi L, Keivani H, Rakhshani N, Hormazdi M. Detection of *Helicobacter pylori* in paraffin-embedded specimens from patients with chronic liver diseases, using the amplification method. *Dig Dis Sci* 2009; 54: 1456-9.
- 4 Tian XP, Fan XG, Zhang Y, Huang Y, Dai H, Ying RS. Procurement and identification of bacteria in paraffin-embedded liver tissues of hepatocellular carcinoma by laser-assisted microdissection technique. *APMIS* 2008; 116: 10-5.
- 5 Xuan S, Li N, Qiang X, Zhou RR, Shi YX, Jiang WJ. *Helicobacter* infection in hepatocellular carcinoma tissue. *World J Gastroenterol* 2006; 12:2335-40.

Anexo 2



Original Article

Evaluation of five DNA extraction methods for detection of *H. pylori* in formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) liver tissue from patients with hepatocellular carcinoma[☆]



Elizabeth Rabelo-Gonçalves^{☆,†}, Bruna Roesler[☆], Ana Carolina Guardia[☆], Arlete Milan[☆],
Natalicia Hara[☆], Cecília Escanhoela[☆], Jazon Almeida[☆], Ilka Boin[☆], José Murilo Zeitune[☆]

[☆]Laboratory of Bacteriology, Gastrocenter, State University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

[†]Department of Anatomic Pathology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

[☆]Gastrocenter, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 February 2013

Received in revised form 11 October 2013

Accepted 6 November 2013

Keywords:

Helicobacter pylori

DNA

Paraffin embedded

Liver

16S Ribosomal RNA

ABSTRACT

Since *Helicobacter* spp. DNA was identified in liver tissue resected from patients with hepatocellular carcinoma (HCC), researchers have suggested a role of this bacterium in hepatic carcinogenesis. Archives of formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissues represent an extraordinary source for clinical studies providing many advantages. However, DNA extraction from FFPE tissues is laborious, time-consuming and still remains a challenge. The aim of this study was to evaluate five protocols for DNA extraction from FFPE liver obtained from patients with HCC in order to detect *Helicobacter pylori* DNA. These methods were: (1) QIAamp FFPE Tissue Kit, (2) QIAamp DNA Mini Kit, (3) Wizard SV Genomic DNA Purification System, (4) RealAmp FFPE gDNA MiniPrep System and (5) phenol-chloroform. *H. pylori* detection was performed using 16S rRNA gene amplification by PCR. The highest total amount of DNA was obtained using the phenol-chloroform method. Analyses of 16S rRNA gene amplification did not show statistically significant differences among the methods ($p = 0.466$), although the highest percentage of positive cases (70%) was found in samples extracted with phenol-chloroform. We suggest that of the five methods evaluated, phenol/chloroform is the most suitable for detection of *H. pylori* in FFPE liver from patients with HCC.

© 2013 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

Primary hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common malignancies, with more than 500,000 new tumors diagnosed annually [10]. Since *Helicobacter* spp. DNA was identified in liver tissue from patients with HCC, several researchers have suggested a role of *Helicobacter pylori* in hepatic carcinogenesis [20].

H. pylori is one of the most common bacterial agents worldwide [15]. It presents two different morphologic aspects: spiral and coccoid form, the latter observed *in vivo* and induced *in vitro* under stress conditions [7]. Furthermore, it induces a persistent infection and is classified as a type I carcinogen because of its role in the development of gastric malignancies [12]. However, whether this

bacterium causes liver tumors or acts as a cofactor in the process of carcinogenesis in association with hepatitis virus needs further investigation.

In most pathology laboratories, archives of formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissues represent the only tissue specimens available for routine diagnostics. One of the important advantages of using FFPE tissues is that they are the easiest samples to store and transport [9]. Because of this, FFPE tissues have been used in PCR-based studies related to cancer research, genetics, infectious diseases and molecular epidemiology [4]. In addition, employing FFPE samples allow retrospective and prospective studies to correlate molecular findings with therapy and clinical outcome [27].

Nevertheless, DNA extraction from FFPE tissues is challenging because this material is frequently scarce, degraded and contains substances that inhibit the molecular procedures [18,19]. The formalin fixation process may damage the DNA, due to the crosslinking of proteins and DNA hydrolysis caused by gradual transformation of the formaldehyde into formic acid within tissue [1]. This is particularly troublesome when long DNA regions are amplified, old paraffin blocks are used or fixation time is over three days [4,9].

[☆] FAPESP (n° 2009/09880-5).

[†] Corresponding author at: Laboratory of Bacteriology, Gastrocenter, State University of Campinas, Rua Carlos Chagas 430, Campinas, São Paulo 13083-878, Brazil. Tel.: +55 19 3521 8557; fax: +55 19 3521 8566.

E-mail addresses: elizabethgoncalves@unicamp.br, emggoncalves@palm.com.br (E. Rabelo-Gonçalves).

In recent years, several protocols have been developed to optimize DNA recovery from FFPE tissues [1,2,4,5,13,16,17,23]. In general, the first step of these protocols is removing paraffin from tissue slices using organic solvents such as xylene. Then, the dried tissue must be treated to liberate DNA, and further purification is frequently necessary to improve the quality of DNA yield. However, extensive purification procedures may increase the risk of sample contamination with each manipulation [4].

In this paper, we compared five different protocols for DNA extraction from FFPE tissue obtained from patients with HCC in order to detect *H. pylori* DNA. These protocols ranged from a home-made method to commercial kits. To the best of our knowledge, two of the five protocols have not been previously evaluated in *H. pylori* DNA extraction from FFPE liver tissue. The protocols were assessed for time spent on performing the procedure, quality of DNA detection and efficiency of *H. pylori* detection.

Materials and methods

Samples

10 cases of FFPE liver tissue from patients with HCC were included in this study, nine from male patients and one from females, aged 46–64 years old (mean age 55.1). Fragments of liver were obtained during hepatic surgery (either transplantation or partial hepatectomy). This is a retrospective study, and the paraffin blocks included were selected from specimens archived from 2008 to 2012. Besides, the study was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, UNICAMP (CEP 616/2009).

Tissue preparation

For each paraffin block, two to five 5- μ m-thick sections were cut and placed in five different microtubes related to each method of extraction. Firstly, one milliliter of xylene was added to each tube and centrifuged at 12,000 rpm for 5 min, and the supernatant was discarded. This procedure was carried out for three times. The specimens were then rehydrated through graded ethanol (500 μ l pure ethanol, 500 μ l 95% ethanol and 500 μ l 70% ethanol) and centrifuged at 12,000 rpm for 5 min in each washing step. Finally, the tubes were kept open for the remaining ethanol evaporation. These procedures were used for deparaffinization of FFPE tissues in four of the DNA extraction methods described here (M1, M2, M3 and M5).

DNA extraction

Five different methods were performed for DNA extraction from FFPE liver tissue as follows.

Method 1 (M1) – Two or three slices (5 μ m) from each sample were collected, and DNA extraction was performed using QIAamp DNA FFPE Tissue (Qiagen Inc., Chatsworth, California, USA) according to the manufacturer's instructions. During tissue digestion with proteinase K, samples remained in a water bath for 18 h. Samples were eluted in 30 μ l of TAE buffer and stored at -20°C .

Method 2 (M2) – About two or three tissue slices (5 μ m) from each sample were collected, and DNA extraction was performed using QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen Inc., Chatsworth, California, USA) with minor modifications. For tissue digestion, 252 μ l AL buffer + 28 μ l proteinase K were added, and samples remained in a water bath for 18 h. This method uses two proprietary buffers named AW1 and AW2. Washing steps with these buffers were done twice, and samples were eluted in 40 μ l of TAE buffer and stored at -20°C .

Method 3 (M3) – Two or three slices (5 μ m) from each sample were collected, and DNA extraction was performed using Wizard

SV Genomic DNA Purification System (Promega Corp., Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions. For tissue digestion with proteinase K, samples remained in a water bath for 18 h. Samples were eluted in 40 μ l of nuclease free water and stored at -20°C .

Method 4 (M4) – Three to five slices (5 μ m) from each sample were collected, and DNA extraction was performed using ReiaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System (Promega Corp., Madison, WI, USA). This commercial kit uses a deparaffinization method without xylene or other solvents. Paraffin was eliminated during a single step of incubation in mineral oil at 80°C for 1 min. Further procedures were done according to the manufacturer's manual with minor modifications. After 3 h incubation in a water bath, it was observed that the pellets were still abundant, so it was necessary to add 100 μ l digestion buffer and 10 μ l of proteinase K to complete tissue digestion. Finally, samples were eluted in 30 μ l of elution buffer and stored at -20°C .

Method 5 (M5) – Three to five slices (5 μ m) from each sample were collected, and DNA extraction was performed using the phenol–chloroform protocol previously described [3]. Briefly, after deparaffinization, the samples were resuspended in 419 μ l of digestion buffer containing 1 M Tris-HCl (pH 7.5), 1% sodium dodecyl sulfate and 11 μ l of proteinase K (10 mg/ml). Then, the mixture was incubated at 55°C for 18 h for tissue digestion. DNA was extracted from lysed samples by adding 430 μ l of phenol, vortexing the mixture and centrifuging it at 12,000 rpm for 15 min. The supernatant was removed and transferred into a new tube in which 430 μ l of phenol/chloroform (1:1) mixture was added. After vortexing and centrifuging at 12,000 rpm for 15 min, the supernatant was transferred into a new vial and 430 μ l of chloroform/isoamyl alcohol (24:1) mixture was added. Then, supernatant was transferred to a new tube to which 75 μ l of 2 M ammonium acetate and 750 μ l ice-cold ethanol were added to precipitate nucleic acids; the mixture was centrifuged at 12,000 rpm for 30 min, and the residual was discarded. The precipitate was washed with 500 μ l ice-cold 70% ethanol, and the residual was discarded. Tubes were air dried, and samples were resuspended in 40 μ l Tris EDTA (pH 8.0) buffer and stored at -20°C .

Evaluation of extracted DNA

DNA yield

The total amount and purity of DNA for each extraction method were assessed by spectrophotometry (NanoDrop 1000 Full Spectrum UV/Vis Spectrophotometer – Wilmington, DE 19810 – USA). The total amount of DNA was obtained in ng/ μ l, and the A260/280 ratio was calculated for protein impurities. DNA was considered viable for amplification when A260/280 ratio value was from 1.7 to 2.0 [6].

PCR assays

In order to verify DNA quality, PCR for β -globin gene amplification was performed [20]. For this purpose, 1 μ l of DNA sample was added to a final volume of 20 μ l PCR mix containing deoxynucleoside triphosphates (dNTPs) at concentrations of 200 μM each, 2.0 μ l of 25 mM MgCl_2 , 0.2 μ l of GoTaq Hot Start Polymerase (Promega Corp., Madison, WI, USA), 4.0 μ l of 5 \times GoTaq Flexi Buffer (supplied with the enzyme) and 20 pmol of each primer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Amplification reactions included an initial 2-minute denaturation step at 94°C , followed by 35 cycles of 30 s at 94°C , 30 s at 55°C and 30 s at 72°C . A final extension step for 7 min at 72°C was carried out. The sequence of primers and size of amplicons are described in Table 1.

The second PCR assay was performed to detect 16S rRNA of *H. pylori* in all the samples as previously described, with modifications [26]. Therefore, 2 μ l of DNA sample was added to a

Table 1
Description of the pairs of primers used in the amplification of human beta-globin gene and 16S rRNA from *H. pylori*.

Gene/Primers	Sequence (5'–3')	Size/References
β -Globin		
PCO3	ACACACTGGTTCACCTAGC	110bp
PCO4	CAACTTCATCCAGCTTCAC	Saito et al. [21]
16S rRNA		
JW21	GCGACTCTCTGGAACTTAC	139bp
JW22	CGTAGCTGCATTACTGGAGA	Pitoutz et al. [26]

final volume of 25 μ l PCR mix containing deoxynucleoside triphosphates (dNTPs) at concentrations of 200 μ M each, 2.0 μ l of 25 mM MgCl₂, 0.25 μ l of GoTaq Hot Start Polymerase (Promega Corp., Madison, WI, USA), 5.0 μ l of 5 \times GoTaq Flexi Buffer (supplied with the enzyme) and 20 pmol of each primer. Amplification reactions included an initial 2-minute denaturation step at 94 °C, followed by 40 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 55 °C and 45 s at 72 °C. A final extension step for 7 min at 72 °C was carried out. All PCR reactions were performed twice in a PTC-100 Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc., Watertown, MA, EUA). The sequence of primers and size of amplicons are described in Table 1.

Detection of PCR products

For analysis of the amplified products of each PCR assay in the five different extraction methods, 5 μ l of the amplicons were electrophoresed on 1.5% agarose gels stained by ethidium bromide (1 μ g/ml). The amplicons were visualized by UV transillumination, and a 100 base pair ladder was used as standard.

Statistical analysis

Data obtained from total amount of DNA, A260/280 ratio and *H. pylori*-positive samples in all five methods of DNA extraction were submitted to a variance analysis to verify possible differences. For statistical analysis, the SAS System for Windows (Statistical Analysis System), version 9.2, SAS Institute Inc., 2002–2008, Cary, NC, USA was used. Differences were considered statistically significant when p -value \leq 0.05.

Results

In general, the phenol–chloroform method was the most laborious, time-consuming and toxic (phenol) when compared to commercial kits. In relation to deparaffinization steps, RealiaPrep FFPE gDNA Miniprep System (Promega Corp., Madison, WI, USA) was considered the quickest method because it has only one single step from deparaffinization using mineral oil. During tissue digestion with proteinase K, samples were kept at 55–56 °C overnight (at least for 18 h) in all five methods. Considering the DNA purification steps, hands-on-time was lowest and similar for both the Wizard SV Genomic DNA Purification System (Promega Corp., Madison, WI, USA) and QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen Inc., Chatsworth, California, USA), followed by RealiaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System (Promega Corp., Madison, WI, USA) and QIAamp DNA FFPE Tissue (Qiagen Inc., Chatsworth, California, USA). The phenol/chloroform method was the most time consuming. These results are described in Table 2.

DNA yield and purity

The mean values for total amount and purity of DNA for each method are shown in Table 3. The results of A260/280 were higher in methods 2 and 5 (QIAamp DNA Mini Kit and phenol–chloroform,

Table 2
Data of estimated time spent (in minutes) on performing each step of DNA extraction method.

	Deparaffinization step	Tissue digestion step	Purification step
QIAamp DNA FFPE tissue	\approx 60 min	Overnight	\approx 90 min
QIAamp DNA Mini Kit	\approx 60 min	Overnight	\approx 40 min
Wizard SV Genomic DNA	\approx 60 min	Overnight	\approx 40 min
ReliaPrep™ FFPE gDNA	1–2 min	Overnight	\approx 90 min
Phenol–chloroform method	\approx 60 min	Overnight	\approx 120 min

Table 3
Mean values and standard deviations of the purity and total amount of DNA comparing the five DNA extraction methods.

DNA extraction method	Purity (A260/280 ratio)	Amount of DNA (ng/ μ l)
QIAamp DNA FFPE Tissue (M1)	1.85 \pm 0.08	172.92 \pm 78.37
QIAamp DNA Mini Kit (M2)	1.97 \pm 0.05	181.61 \pm 136.17
Wizard SV Genomic DNA (M3)	1.79 \pm 0.05	176.66 \pm 77.90
ReliaPrep™ FFPE gDNA (M4)	1.89 \pm 0.05	124.24 \pm 62.44
Phenol–chloroform method (M5)	1.95 \pm 0.04	701.92 \pm 525.26
	$p < 0.001^a$	$p = 0.009^b$

^a p Value for the difference in the purity of DNA for M2 and M5 in relation to M1, M3 and M4.

^b p Value for the difference in the amount of DNA for M5 in relation to M1, M2, M3 and M4.

^c p Value for the Friedman's test for related samples. Multiple differences for the Wilcoxon's test.

respectively), suggesting that these methods yielded a higher purity of the DNA extracted ($p < 0.001$). The highest total amount of DNA was obtained using the phenol–chloroform method compared to the other four extraction methods ($p = 0.009$).

PCR amplification

The results of PCR amplification in samples of five methods of DNA extraction are described in Table 4. The β -globin gene was amplified in all methods and samples (Fig. 1). The 16S rRNA *H. pylori* gene positivity was 40% in samples extracted with QIAamp DNA FFPE Tissue (M1), QIAamp DNA Mini Kit (M2) and ReliaPrep™ FFPE

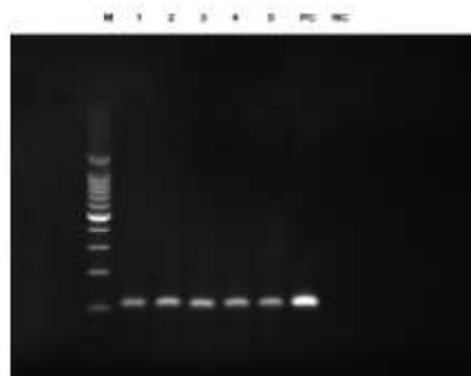


Fig. 1. Amplification of a 110 bp human beta-globin DNA fragment. Lane M: molecular size marker (100–1000 bp); lane 1: positive sample extracted with M1; lane 2: positive sample extracted with M2; lane 3: positive sample extracted with M3; lane 4: positive sample extracted with M4; lane 5: positive sample extracted with M5; PC: positive control (DNA from human blood); NC: negative control (double-distilled water).

Table 4
Results for 16S rRNA *H. pylori* gene amplification in each sample considering the five methods of DNA extraction. The rate of positive cases is expressed in percentage.

Cases	Method 1 QIAamp DNA FFPE	Method 2 QIAamp DNA Mini	Method 3 Wizard SV Genomic	Method 4 ReliaPrep™ FFPE	Method 5 Phenol-chloroform	p-Value ^{a,b}
01	+	–	–	–	+	M1 × M2 p = 1.000
02	–	+	+	–	+	M1 × M3 p = 0.564
03	+	+	+	–	+	M1 × M4 p = 1.000
04	–	+	+	+	+	M1 × M5 p = 0.083
05	–	–	–	–	–	M2 × M3 p = 0.564
06	–	–	–	+	+	M2 × M4 p = 1.000
07	–	–	–	–	–	M2 × M5 p = 0.180
08	+	+	+	+	+	M3 × M4 p = 0.564
09	–	–	–	–	–	M3 × M5 p = 0.317
10	+	–	+	+	+	M4 × M5 p = 0.083
Total	4/10 (40%)	4/10 (40%)	5/10 (50%)	4/10 (40%)	7/10 (70%)	p = 0.466 ^a

Total, total of positive amplification/total samples (%); +, positive; –, negative.
^a p-Value for the Cochran's test comparing the five protocols pooled together.
^b p-Value for the Mc Nemar's test comparing each pair.

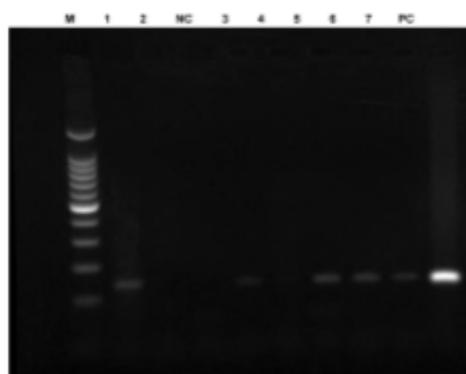


Fig. 2. Amplification of a 139 bp *H. pylori* 16S rRNA gene. Lane M: molecular size marker (100–1000 bp); lane 1: positive sample extracted with M5; lane 2: negative sample; NC: negative control (double-distilled water); lane 3: positive sample extracted with M1; lane 4: negative sample; lane 5: positive sample extracted with M2; lane 6: positive sample extracted with M3; lane 7: positive sample extracted with M4; PC: positive control (*H. pylori* DNA from FFPE gastric tissue).

gDNA (M4): 50% in samples extracted with Wizard SV Genomic DNA (M3) and 70% in samples extracted with phenol–chloroform (M5). However, analyses of 16S rRNA *H. pylori* gene amplification did not show statistically significant differences among the five methods tested ($p = 0.466$) (Fig. 2).

Discussion

The diagnosis of *H. pylori* infection in the liver tissue of patients with HCC has often been conducted using fresh tissue samples. However, the employment of FFPE tissue for *H. pylori* diagnosis can be very useful not only in retrospective studies but also in the characterization of strains or virulence factors and in the correlation with histopathological data and presence of bacteria. Furthermore,

FFPE tissues have several advantages over fresh or frozen tissue samples in that they are easy to handle and have inexpensive long-term storage [24].

It has frequently been described that the effectiveness of PCR using DNA from FFPE tissue is affected by multiple factors, including the type of fixative used, the fixation time, the DNA extraction method, the length of the PCR target, the concentration of DNA and the PCR protocol itself [11].

Considering the DNA extraction method, we compared four commercial kits (QIAamp FFPE Tissue Kit/Qiagen, QIAamp DNA Mini Kit/Qiagen, Wizard SV Genomic DNA Purification System/Promega and ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System/Promega) with the phenol–chloroform method. Although all five methods were able to produce viable DNA as the β -globin gene was amplified in all samples tested, in general, the commercial kits proved to be less laborious and toxic than the phenol–chloroform technique. These results were confirmed by other authors [8].

Furthermore, routine methods for DNA extraction from FFPE tissues generally include an initial deparaffinization step using xylene or similar organic solvent followed by several washing steps with graded ethanol. These steps were performed in four of the five methods tested, except for ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System/Promega which employed a single deparaffinization step using mineral oil only. This is particularly advantageous since extra manipulation increases the potential for carryover contamination. Moreover, the danger of accidentally removing small tissue fragments by pipetting is also reduced. Authors also reported the use of mineral oil in deparaffinization of long-term archived FFPE samples [13].

In relation to *H. pylori* DNA amplification, we observed that all four commercial protocols had similar results. Although a higher percentage of positive amplicons from samples extracted with phenol–chloroform technique was obtained, these results were not statistically significant. We believe this probably occurred because we used a reduced number of cases ($n = 10$). Then, we suggest that future studies employing a larger number of paraffin blocks are needed to confirm this finding.

It is important to consider that the liver fragments employed here were larger tissue samples, and phenol–chloroform was the most efficient method in producing a high yield of DNA. In our

Anexo 3

opinion, this probably occurred because commercial kits have columns for DNA purification and a large amount of tissue may clog these columns, hampering the final DNA elution. This is particularly troublesome when target DNA exists in a small quantity in the tissue as probably happens with *H. pylori* DNA in the liver [28–30]. Because of this, we suggest that phenol–chloroform is the most suitable method for *H. pylori* DNA extraction using FFPE liver samples with a large amount of tissue. Italian researchers have observed that small section of tissue resulted in a higher rate of amplification. This may be explained by a longer fixation time, probably used with bigger tissue fragments [1]. In the case of liver samples with a smaller fragment, as specimens obtained from needle biopsy, we assume that further investigation is necessary to ascertain the appropriate extraction method to detect *H. pylori* DNA.

Formalin fixation may damage the DNA due to crosslinking with proteins, which subsequently results in extensive nucleic acid fragmentation, preventing the amplification of high molecular weight DNA [1,11]. In our study, we used samples stored in non-buffered 10% formalin for a relatively long exposure time of about 5–7 days because they were collected during hepatic surgery. So we believe that amplification of 16S rRNA *H. pylori* gene was successful, despite the extraction method, because we amplified smaller PCR products (139 bp). Inoue et al. concluded that tissues have to be fixed immediately for one day to remain viable for amplification by PCR of fragments up to 200 bp [25]. Similar findings are confirmed by other investigators [4,5,12,14,26].

It is important to know that the FFPE liver fragments used here had tumoral and peritumoral tissue in the same paraffin block. Considering that the necrotic state and nuclease content of tissues can also be important in recovering intact DNA [22], we believe that phenol–chloroform was the most suitable method for *H. pylori* DNA detection in our samples, although it did not show a statistically significant result.

Shibata (1994) reports that a common source of failure in the amplification of DNA extracted from FFPE tissue is the addition of too much of the crude extract to the PCR [5]. In fact, the total amount of DNA in most sections is usually large and a 10-fold dilution will often reduce potential PCR inhibitors. This occurred in some of our samples extracted with phenol–chloroform, and dilution was important for the detection of *H. pylori*.

In summary, we conclude that of the five methods of DNA extraction from FFPE liver tested here, the phenol–chloroform method is the most suitable for detection of *H. pylori* in these samples. Considering that bacteria must be present in small number in the liver and the phenol–chloroform technique resulted in a higher final concentration of DNA, we suggest that the use of this method may help to clarify the role of *H. pylori* in the pathogenesis of HCC.

Acknowledgments

We thank Joseane Morari for helpful laboratory support and Pericles Florencio Lima for his assistance with the figures.

References

- [1] A. Gillo-Tos, L. De Marco, V. Fiano, F. Garcia-Itagado, R. Dielsch, P. Boffeta, F. Merletti, Efficient DNA extraction from 25-year-old paraffin-embedded tissues: study of 305 samples, *Pathology* (2007) 345–348.
- [2] R.B. Rogers, L.C. Alpert, R.A.S. Hise, G.J. Buffone, Analysis of DNA in fresh and fixed tissue by the polymerase chain reaction, *Am. J. Pathol.* (1990) 541–548.
- [3] R.M. Ilsester, T.R. Oliveira, S.C.R. Costa, J.M.R. Zetlme, Is there any relationship between *Helicobacter pylori* dupA gene and the development of early and advanced gastric cancer in Brazilian patients? *J. Med. Res. Sci.* (2012) 15–24.
- [4] C.E. Green, C.M. Wheeler, M.M. Mano, Sample preparation and PCR amplification from paraffin-embedded tissues, *PCR Methods Appl.* (1994) S113–S122.
- [5] D. Shibata, Extraction of DNA from paraffin-embedded tissue for analysis by polymerase chain reaction: new tricks from an old friend, *Hum. Pathol.* (1994) 561–563.
- [6] E.M. Nascimento, M.O. Spínelli, C.J. Rodrigues, N. Bozzini, DNA extraction from paraffin material: protocol in order to analyse microsatellites in uterine leiomyoma, *J. Bras. Patol. Med. Lab.* (2003) 253–255.
- [7] E.M.A. Ribeiro-Gonçalves, N.F. Nishimura, J.M.R. Zetlme, Acute inflammatory response in the stomach of BALB/c mice challenged with coccoidal *Helicobacter pylori*, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* (2002) 1201–1206.
- [8] E.R.C. Rivero, A.C. Neves, M.G. Silva-Valeziela, S.O.M. Sousa, E.D. Nomes, Simple salting-out method for DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues, *Pathol. Res. Pract.* (2006) 523–529.
- [9] F. Karlson, M. Kalantari, M. Chitemere, B. Johansson, B. Hagmar, Modifications of human and viral deoxyribonucleic acid by formaldehyde fixation, *Lab. Invest.* (1994) 604–611.
- [10] E. Trevisani, M.C. Cantarini, J.R. Wands, M. Bernanti, Recent advances in the natural history of hepatocellular carcinoma, *Carcinogenesis* (2008) 1299–1305.
- [11] G. Marchetti, A. Goel, L. Calozzi, L. Vago, M. Nebuloni, M.C. Rossi, A.D. Esposito, A. Randera, E. Franzetti, Evaluation of PCR in detection of *Mycobacterium tuberculosis* from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: comparison of four amplification assays, *J. Clin. Microbiol.* (1998) 1512–1517.
- [12] IARC, Working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans, *Jpn. J. 7-14 June 1994*, IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, *Bios. Hum.* (1994) 220.
- [13] J. Liu, S.H. Kennedy, J. Szarek, J.W. Kenzler, A. Xu, K.T. Zonderman, High-quality genomic DNA extraction from formalin-fixed and paraffin-embedded samples using mineral oil, *Anal. Biochem.* (2009) 265–267.
- [14] K.S. Funabashi, D. Barcelos, I. Vlahos, M. Souza-e-Silva, M.L.A.P. Oliveira e Sousa, M.F. Franco, E.S.M. Inamura, DNA extraction and molecular analysis of non-tumoral liver, spleen, and brain from autopsy samples: the effect of formalin fixation and paraffin embedding, *Pathol. Res. Pract.* (2012) 584–591.
- [15] M.M. Khalifa, R.R. Shalal, R.K. Aziz, *Helicobacter pylori*: a poor man's gut pathogen? *Gut Pathog.* (2010) 2–12.
- [16] M.T.P. Gilbert, T. Hauksson, M. Bruce, J.J. Sanchez, S.R. Lucas, L.H. Jewell, E.C. Marck, M. Wornley, The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues which methods are useful when? *PLoS ONE* (2007) e537.
- [17] N. Lashya, B. Grünwald, O. Azimzadeh, S. Engleit, H. Hober, S. Tapio, M. Auble, Nucleic acids from long-term preserved (FFPE) tissues are suitable for downstream analyses, *Virchows Arch.* (2012) 131–140.
- [18] P.J. Coates, A.J. d'Audenne, G. Khan, H.O. Kangno, G. Stavits, Simplified procedures for applying the polymerase chain reaction to routinely fixed paraffin wax sections, *J. Clin. Pathol.* (1991) 115–118.
- [19] R. Coura, J.C. Profa, I. Meurer, P. Ashton-Profa, An alternative protocol for DNA extraction from formalin fixed and paraffin wax embedded tissue, *J. Clin. Pathol.* (2005) 894–895.
- [20] R. Pellicani, A. Miliant, M. Rizzato, F. Mègraud, *Helicobacter* species and liver diseases: association or causation, *Lancet Infect. Dis.* (2008) 254–260.
- [21] R.K. Saki, S. Scharf, F. Faltona, K.B. Mellis, G.T. Horn, H.A. Erick, N. Arheim, Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnostic of sickle cell anemia, *Science* (1985) 1350–1352.
- [22] S.E. Goetz, S.R. Hamilton, B. Vogelstein, Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin-embedded tissues, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1985) 118–126.
- [23] S.H. Shi, R.J. Coté, L. Wu, C. Liu, R. Datar, Y. Shi, D. Liu, H. Liu, C.R. Taylor, DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections based on the antigen retrieval principle: heating under the influence of pH, *J. Histochem. Cytochem.* (2002) 1005–1011.
- [24] S.S. Sam, K.A. Leibel, C.L. Bassalun, L.J. Yaff, G.J. Tsongalis, J.A. Lefferts, Anticipation of genomic DNA isolation from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues, *Pathol. Res. Pract.* (2012) 705–707.
- [25] T. Inoue, K. Nishimura, H. Kataoka, M. Kono, Feasibility of archival non-buffered formalin fixed and paraffin-embedded tissues for PCR amplification and analysis of resected gastric carcinoma, *Pathol. Int.* (1996) 997–1004.
- [26] T. Pinxter, L. Zomudi, H. Keizani, M. Bahshani, M. Hornaardi, Detection of *Helicobacter pylori* in paraffin-embedded specimens from patients with chronic liver diseases, using the amplification method, *Dig. Dis. Sci.* (2009) 1456–1459.
- [27] U. Lehmann, H. Kreipe, Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded biopsies, *Methods* (2001) 409–418.
- [28] Y. Huang, X.G. Fan, Z.M. Wang, J.H. Zhou, X.F. Tian, M. Li, Identification of *Helicobacter* species in human liver samples from patients with primary hepatocellular carcinoma, *J. Clin. Pathol.* (2004) 1273–1277.
- [29] X.F. Tian, X.G. Fan, Y. Huang, H. Dai, R.S. Ying, Pronunciation and identification of bacteria in paraffin-embedded liver tissues of hepatocellular carcinoma by laser-assisted microdissection technique, *APMIS* (2008) 10–15.
- [30] E.M. Ribeiro-Gonçalves, L.C. Spagnoli, I. Lopes-Cendes, C.A. Escarvalho, J.R. Almeida, J.M. Zetlme, Improved detection of *Helicobacter pylori* DNA in formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue of patients with hepatocellular carcinoma using laser capture microdissection (LCM), *Helicobacter* (2013) 244–245.

Licença do periódico *Helicobacter* para re-uso da *letter* (Apêndice 1)

**JOHN WILEY AND SONS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Sep 13, 2015

This Agreement between Elizabeth Gonçalves ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	3707111091245
License date	Sep 13, 2015
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Helicobacter
Licensed Content Title	Improved Detection of Helicobacter pylori DNA in Formalin-fixed Paraffin-embedded (FFPE) Tissue of Patients with Hepatocellular Carcinoma Using Laser Capture Microdissection (LCM)
Licensed Content Author	Elizabeth Maria Afonso Rabelo-Gonçalves, Ilária C. Sgardioli, Iscia Lopes-Cendes, Cecília Amélia Fazzio Escanhoela, Jazon Romilson de Souza Almeida, José Murilo Robilotta Zeitune
Licensed Content Date	Jan 28, 2013
Pages	2
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Author of this Wiley article
Format	Print and electronic
Portion	Full article
Will you be translating?	No
Order reference number	September 30th
Title of your thesis / dissertation	Detection of Helicobacter pylori in paraffin embedded non-tumoral liver samples from patients with hepatocellular carcinoma
Expected completion date	Sep 2015
Expected size (number of pages)	95
Requestor Location	Elizabeth Gonçalves Kapellenstrasse 13 Hofheim am Taunus, Germany 65719 Attn: Elizabeth Gonçalves
Billing Type	Invoice
Billing Address	Elizabeth Gonçalves Kapellenstrasse 13 Hofheim am Taunus, Germany 65719 Attn: Elizabeth Gonçalves
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a "Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work (collectively "WILEY"). By clicking accept in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your Rightslink account (these are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

Terms and Conditions

- The materials you have requested permission to reproduce or reuse (the "Wiley Materials") are protected by copyright.
- You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sub licensable (on a stand-alone basis), non-transferable, worldwide, limited license to reproduce the Wiley Materials for the purpose specified in the licensing process. This license is for a one-time use only and limited to any maximum distribution number specified in the license. The first instance of republication or reuse granted by this licence must be completed within two years of the date of the grant of this licence (although copies prepared before the end date may be distributed thereafter). The Wiley Materials shall not be used in any other manner or for any other purpose, beyond what is granted in the license. Permission is granted subject to an appropriate acknowledgement given to the author, title of the material/book/journal and the publisher. You shall also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Wiley Material. Permission is also granted on the understanding that nowhere in the text is a previously published source acknowledged for all or part of this Wiley Material. Any third party content is expressly excluded from this permission.
- With respect to the Wiley Materials, all rights are reserved. Except as expressly granted by the terms of the license, no part of the Wiley Materials may be copied, modified, adapted (except for minor reformatting required by the new Publication), translated, reproduced, transferred or distributed, in any form or by any means, and no derivative works may be made based on the Wiley Materials without the prior permission of the respective copyright owner. You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Wiley Materials. You may not license, rent, sell, loan, lease, pledge, offer as security, transfer or assign the Wiley Materials on a stand-alone basis, or any of the rights granted to you hereunder to any other person.
- The Wiley Materials and all of the intellectual property rights therein shall at all times remain the exclusive property of John Wiley & Sons Inc, the Wiley Companies, or their respective licensors, and your interest therein is only that of having possession of and the right to reproduce the Wiley Materials pursuant to Section 2 herein during the continuance of this Agreement. You agree that you own no right, title or interest in or to the Wiley Materials or any of the intellectual property rights therein. You shall have no rights hereunder other than the license as provided for above in Section 2. No right, license or interest to any trademark, trade name, service mark or other branding ("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you

shall not assert any such right, license or interest with respect thereto.

- NEITHER WILEY NOR ITS LICENSORS MAKES ANY WARRANTY OR REPRESENTATION OF ANY KIND TO YOU OR ANY THIRD PARTY, EXPRESS, IMPLIED OR STATUTORY, WITH RESPECT TO THE MATERIALS OR THE ACCURACY OF ANY INFORMATION CONTAINED IN THE MATERIALS, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY, ACCURACY, SATISFACTORY QUALITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, USABILITY, INTEGRATION OR NON-INFRINGEMENT AND ALL SUCH WARRANTIES ARE HEREBY EXCLUDED BY WILEY AND ITS LICENSORS AND WAIVED BY YOU
- WILEY shall have the right to terminate this Agreement immediately upon breach of this Agreement by you.
- You shall indemnify, defend and hold harmless WILEY, its Licensors and their respective directors, officers, agents and employees, from and against any actual or threatened claims, demands, causes of action or proceedings arising from any breach of this Agreement by you.
- IN NO EVENT SHALL WILEY OR ITS LICENSORS BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR ENTITY FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, EXEMPLARY OR PUNITIVE DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, PROVISIONING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.
- Should any provision of this Agreement be held by a court of competent jurisdiction to be illegal, invalid, or unenforceable, that provision shall be deemed amended to achieve as nearly as possible the same economic effect as the original provision, and the legality, validity and enforceability of the remaining provisions of this Agreement shall not be affected or impaired thereby.
- The failure of either party to enforce any term or condition of this Agreement shall not constitute a waiver of either party's right to enforce each and every term and condition of this Agreement. No breach under this agreement shall be deemed waived or excused by either party unless such waiver or consent is in writing signed by the party granting such waiver or consent. The waiver by or consent of a party to a breach of any provision of this Agreement shall not operate or be construed as a waiver of or consent to any other or subsequent breach by such other party.
- This Agreement may not be assigned (including by operation of law or otherwise) by

you without WILEY's prior written consent.

- Any fee required for this permission shall be non-refundable after thirty (30) days from receipt by the CCC.
- These terms and conditions together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein) form the entire agreement between you and WILEY concerning this licensing transaction and (in the absence of fraud) supersedes all prior agreements and representations of the parties, oral or written. This Agreement may not be amended except in writing signed by both parties. This Agreement shall be binding upon and inure to the benefit of the parties' successors, legal representatives, and authorized assigns.
- In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall prevail.
- WILEY expressly reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
- This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process.
- This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York, USA, without regards to such state's conflict of law rules. Any legal action, suit or proceeding arising out of or relating to these Terms and Conditions or the breach thereof shall be instituted in a court of competent jurisdiction in New York County in the State of New York in the United States of America and each party hereby consents and submits to the personal jurisdiction of such court, waives any objection to venue in such court and consents to service of process by registered or certified mail, return receipt requested, at the last known address of such party.

WILEY OPEN ACCESS TERMS AND CONDITIONS

Wiley Publishes Open Access Articles in fully Open Access Journals and in Subscription journals offering Online Open. Although most of the fully Open Access journals publish open access articles under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) License only, the subscription journals and a few of the Open Access Journals offer a choice of Creative Commons Licenses: Creative Commons Attribution (CC-BY) license [Creative Commons Attribution Non-Commercial \(CC-BY-NC\) license](#) and [Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs \(CC-BY-NC-ND\) License](#). The license type is clearly identified on the article.

Copyright in any research article in a journal published as Open Access under a Creative Commons License is retained by the author(s). Authors grant Wiley a license to publish the article and identify itself as the original publisher. Authors also grant any third party the right to use the article freely as long as its integrity is maintained and its original authors,

citation details and publisher are identified as follows: [Title of Article/Author/Journal Title and Volume/Issue. Copyright (c) [year] [copyright owner as specified in the Journal]. Links to the final article on Wiley's website are encouraged where applicable.

The Creative Commons Attribution License

The [Creative Commons Attribution License \(CC-BY\)](#) allows users to copy, distribute and transmit an article, adapt the article and make commercial use of the article. The CC-BY license permits commercial and non-commercial re-use of an open access article, as long as the author is properly attributed.

The Creative Commons Attribution License does not affect the moral rights of authors, including without limitation the right not to have their work subjected to derogatory treatment. It also does not affect any other rights held by authors or third parties in the article, including without limitation the rights of privacy and publicity. Use of the article must not assert or imply, whether implicitly or explicitly, any connection with, endorsement or sponsorship of such use by the author, publisher or any other party associated with the article.

For any reuse or distribution, users must include the copyright notice and make clear to others that the article is made available under a Creative Commons Attribution license, linking to the relevant Creative Commons web page.

To the fullest extent permitted by applicable law, the article is made available as is and without representation or warranties of any kind whether express, implied, statutory or otherwise and including, without limitation, warranties of title, merchantability, fitness for a particular purpose, non-infringement, absence of defects, accuracy, or the presence or absence of errors.

Creative Commons Attribution Non-Commercial License

The [Creative Commons Attribution Non-Commercial \(CC-BY-NC\) License](#) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes. (see below)

Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivs License

The [Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License \(CC-BY-NC-ND\)](#) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, is not used for commercial purposes and no modifications or adaptations are made. (see below)

Use by non-commercial users

For non-commercial and non-promotional purposes, individual users may access, download, copy, display and redistribute to colleagues Wiley Open Access articles, as well as adapt, translate, text- and data-mine the content subject to the following conditions:

- The authors' moral rights are not compromised. These rights include the right of "paternity" (also known as "attribution" - the right for the author to be identified as such) and "integrity" (the right for the author not to have the work altered in such a way that the author's reputation or integrity may be impugned).

- Where content in the article is identified as belonging to a third party, it is the obligation of the user to ensure that any reuse complies with the copyright policies of the owner of that content.
- If article content is copied, downloaded or otherwise reused for non-commercial research and education purposes, a link to the appropriate bibliographic citation (authors, journal, article title, volume, issue, page numbers, DOI and the link to the definitive published version on **Wiley Online Library**) should be maintained. Copyright notices and disclaimers must not be deleted.
- Any translations, for which a prior translation agreement with Wiley has not been agreed, must prominently display the statement: "This is an unofficial translation of an article that appeared in a Wiley publication. The publisher has not endorsed this translation."

Use by commercial "for-profit" organisations

Use of Wiley Open Access articles for commercial, promotional, or marketing purposes requires further explicit permission from Wiley and will be subject to a fee. Commercial purposes include:

- Copying or downloading of articles, or linking to such articles for further redistribution, sale or licensing;
- Copying, downloading or posting by a site or service that incorporates advertising with such content;
- The inclusion or incorporation of article content in other works or services (other than normal quotations with an appropriate citation) that is then available for sale or licensing, for a fee (for example, a compilation produced for marketing purposes, inclusion in a sales pack)
- Use of article content (other than normal quotations with appropriate citation) by for-profit organisations for promotional purposes
- Linking to article content in e-mails redistributed for promotional, marketing or educational purposes;
- Use for the purposes of monetary reward by means of sale, resale, licence, loan, transfer or other form of commercial exploitation such as marketing products
- Print reprints of Wiley Open Access articles can be purchased from: corporatesales@wiley.com

Further details can be found on Wiley Online Library <http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-410895.html>

Other Terms and Conditions:

v1.9

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

Licença do periódico Pathology Research and Practice para re-uso do manuscrito (Apêndice 2)

**ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Sep 13, 2015

This is a License Agreement between Elizabeth Gonçalves ("You") and Elsevier ("Elsevier") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the payment terms and conditions.

All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.

Supplier	Elsevier Limited The Boulevard, Langford Lane Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK
Registered Company Number	1982084
Customer name	Elizabeth Gonçalves
Customer address	Kapellenstrasse 13 Hofheim am Taunus, Hessen 65719
License number	3707120189064
License date	Sep 13, 2015
Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	Pathology - Research and Practice
Licensed content title	Evaluation of five DNA extraction methods for detection of H. pylori in formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) liver tissue from patients with hepatocellular carcinoma
Licensed content author	Elizabeth Rabelo-Gonçalves, Bruna Roesler, Ana Carolina Guardia, Ariete Milan, Natália Hara, Cecília Escanhoela, Jazon Almeida, Ilka Boin, José Murilo Zeitune
Licensed content date	March 2014
Licensed content volume number	210
Licensed content issue number	3
Number of pages	5
Start Page	142
End Page	146
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Intended publisher of new work	other
Portion	full article
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	Yes
Will you be translating?	No
Title of your thesis/dissertation	Detection of Helicobacter pylori in paraffin embedded non-tumoral liver samples from patients with hepatocellular carcinoma

Expected completion date	Sep 2015
Estimated size (number of pages)	95
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Permissions price	0.00 EUR
VAT/Local Sales Tax	0.00 EUR / 0.00 GBP
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.

3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier at permissions@elsevier.com)

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.

7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. **License Contingent Upon Payment:** While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. **Warranties:** Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

10. **Indemnity:** You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

11. **No Transfer of License:** This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.

12. **No Amendment Except in Writing:** This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

13. **Objection to Contrary Terms:** Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

14. **Revocation:** Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation:** This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only

unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article. If this license is to re-use 1 or 2 figures then permission is granted for non-exclusive world rights in all languages.

16. Posting licensed content on any Website: The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com>; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com>. All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

Posting licensed content on Electronic reserve: In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

17. For journal authors: the following clauses are applicable in addition to the above:

Preprints:

A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been peer-reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.).

Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).

If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.

Accepted Author Manuscripts: An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.

Authors can share their accepted author manuscript:

- immediately

- via their non-commercial person homepage or blog
 - by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript
 - via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group
 - directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use
 - for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement
- after the embargo period
 - via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository
 - via commercial sites with which Elsevier has an agreement

In all cases accepted manuscripts should:

- link to the formal publication via its DOI
- bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do
- if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

Published journal article (JPA): A published journal article (PJA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all value-adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.

Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles:

Subscription Articles: If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version.

Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.

Gold Open Access Articles: May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a [CrossMark logo](#), the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

Please refer to Elsevier's [posting policy](#) for further information.

18. For book authors the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

19. Thesis/Dissertation: If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

Elsevier Open Access Terms and Conditions

You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing. Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our [open access license policy](#) for more information.

Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier:

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated.

The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:

CC BY: The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article (including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>.

CC BY NC SA: The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the

formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>.

CC BY NC ND: The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>. Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Associating advertising with the full text of the Article
- Charging fees for document delivery or access
- Article aggregation
- Systematic distribution via e-mail lists or share buttons

Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

20. Other Conditions:

v1.7

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.



Campinas, 01 de outubro de 2015.

DECLARAÇÃO

Declaramos, por meio deste documento, que não estamos infringindo os direitos autorais transferidos às editoras "John Wiley and Sons" e "Elsevier", referentes aos manuscritos apresentados nesta Tese (Anexos 2 e 3).

Cordialmente,

A handwritten signature in black ink, reading "Elizabeth Maria Afonso Rabelo Gonçalves", is written over a horizontal line.

Aluna: Elizabeth Maria Afonso Rabelo Gonçalves

A handwritten signature in black ink, reading "Jazon Romilson de Souza Almeida", is written over a horizontal line.

Orientador: Prof. Dr. Jazon Romilson de Souza Almeida