



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

FRANCISCO LUÍS ALMEIDA PAES

**ASSOCIAÇÃO DO *Papilomavírus humano* COM OS TUMORES
ESOFÁGICOS E GÁSTRICOS**

RECIFE
2017

FRANCISCO LUÍS ALMEIDA PAES

**ASSOCIAÇÃO DO *Papilomavírus humano* COM OS TUMORES
ESOFÁGICOS E GÁSTRICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva Neto.

Co-Orientadora: Profa. Dra. Carina Scanoni Maia.

Linha de pesquisa: Modelos morfofisiológicos e imunológicos das Doenças.

RECIFE

2017

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

- P126a Paes, Francisco Luís Almeida.
Associação do papilomavírus humano com os tumores esofágicos e gástricos / Francisco Luís Almeida Paes. – 2017.
56 f.: il.; tab.; 30 cm.
- Orientador: Jacinto da Costa Silva Neto.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Patologia. Recife, 2017.
Inclui referências e anexos.
1. Papilomavírus humano. 2. Neoplasia gástrica. 3. Neoplasia esofágica. 4. Imuno-histoquímica. I. Silva Neto, Jacinto da Costa (Orientador). II. Título.
- 616.07 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2017-340)



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Centro de Ciências da Saúde - UFPE

Av. Prof. Moraes Rego 1235 - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife - PE

Prédio da Pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde (CCS) - térreo

Fone/Fax: (81) 2126.8529

<http://www.ppgpatologiaufpe.com>

DISSERTAÇÃO DEFENDIDA E APROVADA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM PATOLOGIA.

AUTOR: Francisco Luís Almeida Paes

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Patologia

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: **“Associação do Papilomavírus Humano Com Os
Tumores Esofágicos e Gástricos”**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Jacinto Da Costa Silva Melo

DATA DA DEFESA E APROVAÇÃO: 15 de setembro de 2017

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Mariana Montenegro de Melo Lira

Prof. Dr. Luiz Lúcio Soares da Silva

Profa. Dra. Elyda Gonçalves de Lima

Dedicado com carinho à Ana, Fellipe e
meus pais, Luiz e Luzinete (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sua Luz Divina à guiar-me hoje e sempre, em todos os momentos da minha existência.

Ao Professor e orientador Dr. Jacinto da Costa Silva Neto, pela dedicação e conhecimento transmitidos, permanente estímulo, confiança e paciência nas dificuldades encontradas durante esta jornada.

À Professora e co-orientadora Dra. Carina Scanoni Maia, pelas sugestões que melhoraram a qualidade deste trabalho.

Ao Professor Dr. Antônio Carlos de Freitas, pelo apoio e conhecimento compartilhado, sempre disposto a nos ajudar nas dúvidas que surgiram.

Ao Professor Dr. Nicodemos Telles de Pontes Filho, exemplo de dedicação acadêmica e pelos conhecimentos compartilhados por ocasião da banca de qualificação.

Ao Professor Dr. Mário Ribeiro de Melo Jr, pelos incentivos prestados e conhecimentos compartilhados para a realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisas Citológicas e Moleculares (LPCM), Dafne, Giwellington, Jonathan, Athos, Wolffi, Ariadne e aos colegas integrantes do Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental (LEMTE), Kamylla e Elias, pela disponibilidade, conhecimento e pela ajuda prestada, tão fundamental para a conduta e execução dos experimentos.

Ao meu amigo, meu irmão camarada André Silva, amigo de tantas emoções e grande incentivador deste trabalho. Obrigado pela valorosa contribuição.

À colega Silvânia Paz, pela amizade, disponibilidade e experiência na confecção das amostras para experimento.

À todos os professores do Programa de Pós Graduação em Patologia (POSPAT), sem os quais não seria possível chegar até aqui.

Tenho a certeza de que só alcancei este nível de aprendizado e experiência científica porque fui orientado e ajudado pelos melhores.

À todos vocês, os meus sinceros agradecimentos!

*"A ciência sem religião é manca, a
religião sem ciência é cega"*

Albert Einstein

RESUMO

Alguns estudos têm demonstrado a presença DNA-HPV, bem como, a expressão de oncoproteínas do vírus em tumores esofágicos e gástricos. Entretanto, o papel do *Papilomavírus humano* (HPV) nesses tumores, permanece controverso. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo verificar a presença do HPV em amostras de tumores esofágicos e gástricos, bem como detectar a expressão das proteínas p16^{INK4a} e E6 através da imuno-histoquímica. Nesse estudo foram incluídas 89 biópsias parafinadas, obtidas do Laboratório de Anatomia Patológica do HC-UFPE. A detecção do DNA-HPV foi efetuada pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) com *primers* consenso MY09/MY11 e a análise da expressão da oncoproteína viral E6 e da proteína p16 foi realizada por imuno-histoquímica. O DNA viral foi detectado em 92,85% de lesões benignas, 95% de lesões malignas de esôfago, 86,7% de lesões benignas e 75% de lesões malignas de estômago. Por meio da imuno-histoquímica, o presente estudo verificou a expressão da oncoproteína E6 do HPV em 14,28% das lesões benignas e 25% das lesões malignas em espécimes de esôfago, assim como em 6,7% das lesões benignas e 25% das lesões malignas em espécimes de estômago. A expressão da proteína p16 por imuno-histoquímica foi detectada em 50% dos tumores esofágicos e 77% no estômago. Embora o presente estudo tenha mostrado a presença do HPV nas lesões esofágicas e gástricas não assegura que o vírus atue como fator carcinogênico destas lesões, entretanto, estudos que venham a comprovar a presença do DNA viral no genoma celular podem ser um passo inicial para buscar compreender seu papel nestas lesões.

Palavras-Chave: Papilomavírus Humano. Neoplasia gástrica. Neoplasia esofágica. Imuno-histoquímica.

ABSTRACT

Some studies have demonstrated the presence of DNA-HPV as well as the expression of virus oncoproteins in esophageal and gastric tumors. However, the role of human papillomavirus (HPV) in these tumors remains controversial. Thus, the present work aimed to verify the presence of HPV in samples of esophageal and gastric tumors, as well as to detect the expression of p16INK4a and E6 proteins through immunohistochemistry. In this study, 89 paraffin-shaped biopsies were obtained from the HC-UFPE Pathology Anatomy Laboratory. DNA-HPV detection was performed by the polymerase chain reaction (PCR) technique with consensus primers MY09 / MY11 and analysis of the expression of the E6 viral oncoprotein and the p16 protein was performed by immunohistochemistry. Viral DNA was detected in 92.85% of benign lesions, 95% of malignant esophageal lesions, 86.7% of benign lesions and 75% of malignant lesions of the stomach. By means of immunohistochemistry, the present study verified the expression of HPV E6 oncoprotein in 14.28% of benign lesions and 25% of malignant lesions in esophageal specimens, as well as 6.7% of benign lesions and 25% of malignant lesions on stomach specimens. Expression of the p16 protein by immunohistochemistry was detected in 50% of esophageal tumors and 77% in the stomach. Although the present study has shown the presence of HPV in esophageal and gastric lesions, it does not ensure that the virus acts as a carcinogenic factor of these lesions, however, studies that prove the presence of viral DNA in the cellular genome may be an initial step to seek to understand their role in these injuries.

Key-Words: Human papillomavirus. Esophageal neoplasm. Gastric neoplasm. Immunohistochemistry

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Genoma do DNA circular dupla fita do HPV. _____	16
Figura 2 - Mecanismo de ação da oncoproteína E6. (JO e KIM, 2005). _____	21
Figura 3 - Eletroforese de HPV das LB (01-10) de esôfago, extraído de tecido parafinado utilizando o DNeasy® Blood Tissue Kit. _____	33
Figura 4 - Eletroforese de HPV das LB (11-14) e LM (15-30) de esôfago, extraído de tecido parafinado utilizando o DNeasy® Blood Tissue Kit. _____	34
Figura 5 - Eletroforese de HPV das LM (31-34) e GC (35-40) de esôfago; e LB (41-52) de estômago, extraído de tecido parafinado utilizando o DNeasy® Blood Tissue Kit. _____	34
Figura 6 - Eletroforese de HPV das LM (53, 57-59) e LB (54-56) de estômago, extraído de tecido parafinado utilizando o DNeasy® Blood Tissue Kit. _____	35
Figura 7 - Eletroforese de HPV de amostras aleatórias de esôfago e estômago para confirmação, de tecido parafinado utilizando o DNeasy® Blood Tissue Kit. _____	35
Figura 8 - Eletroforese de HPV das LM (60-79) de estômago, extraído de tecido parafinado utilizando o DNeasy® Blood Tissue Kit. _____	36
Figura 9 - Eletroforese de HPV do GC (80-89) de estômago, extraído de tecido parafinado utilizando o DNeasy® Blood Tissue Kit. _____	36
Figura 10 - Eletroforese de HPV de casos negativos aleatórios de esôfago e estômago, de tecido parafinado utilizando o DNeasy® Blood Tissue Kit. _____	37
Figura 11 - Frequência de espécimes positivo para o DNA do HPV nas lesões benignas (LB) e nas lesões malignas (LM). _____	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lesões benignas e malignas em esôfago e estômago.....	25
Tabela 2 - Sequência dos oligonucleotídeos e tamanho dos fragmentos	29
Tabela 3 - Quantitativo das lesões benignas e malignas do esôfago e estômago de acordo com as características histomorfológicas.	31
Tabela 4 - Imuno-histoquímica da oncoproteína E6 do HPV em esôfago	32
Tabela 5 - Imuno-histoquímica da oncoproteína E6 do HPV em estômago	32
Tabela 6 - Imuno-histoquímica da proteína p16 em esôfago	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDK	Ciclina Dependente de Quinase
DAB	3',3' Diaminobenzidina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
E1,2,4,5,6 e 7	Proteínas Virais Precoces do HPV
E2F	Fator de Transcrição E2F
E6AP	Complexo E6 ligaseUbiquitina Celular
GC	Grupo Controle
HE	Hematoxilina e Eosina
HPV	<i>Papilomavírus humano</i>
IHQ	Imuno-Histoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
L1 e L2	Proteínas Tardias, codificantes do <i>capsídeo</i> viral do HPV
LB	Lesões benignas
LCR	(do inglês, <i>Long Control Region</i>) Longa região de controle
LM	Lesões malignas
MY09 e MY11	<i>Primers</i> específicos para identificação do HPV
ORF	(do inglês, <i>Open Reading Frames</i>) Região codificante de leitura aberta
p/v	Proporção peso/volume
p16 ^{INK4a}	Proteína inibidora de quinase4 dependente de ciclina
p53	Proteína supressora de tumor
pb	Pares de bases
PBS	Tampão Fosfato-Salina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pRb	Proteína do Retinoblastoma
RNA	Ácido Ribonucleico
SAME	Serviço de Arquivo Médico e Estatística
URR	do inglês, <i>Upstream Regulatory Region</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1	Classificação e estrutura genômica do HPV.....	16
2.2	Ciclo biológico do HPV	17
2.3	Expressão de biomarcadores	18
2.4	HPV em lesões esofágicas e gástricas.....	18
2.5	Oncoproteína E6.....	20
2.6	A proteína p16 ^{INK4a}	21
3	OBJETIVOS.....	23
3.1	Geral.....	23
3.2	Específicos	23
4	MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1	Tipo de estudo.....	24
4.2	Local de estudo e origem das amostras	24
4.3	Material de estudo	24
4.4	Critérios de inclusão	25
4.5	Critérios de exclusão	25
4.6	Aspectos Éticos	26
4.7	Riscos e benefícios.....	26
4.8	Técnicas laboratoriais.....	26
4.8.1	Histopatologia.....	26
4.8.2	Imuno-histoquímica	27
4.8.3	Reação Imuno-histoquímica da oncoproteína viral E6 e p16 ^{INK4a}	27
4.8.4	Extração do DNA.....	28
4.8.5	Deteção do DNA viral	29
5	RESULTADOS	31
5.1	Caracterização das amostras	31
5.2	Análise da detecção do DNA do HPV em tecido esofágico e gástrico	32
5.3	Expressão imuno-histoquímica da oncoproteína E6.....	32
5.4	Expressão imuno-histoquímica da proteína p16.....	33
6	DISCUSSÃO.....	39
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	43

REFERÊNCIAS.....	44
Anexo A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa/CCS/UFPE	54

1 INTRODUÇÃO

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), no Brasil, apenas para o ano de 2016, foram estimados 10.810 casos novos de câncer de esôfago e 20.520 casos novos de câncer de estômago. Nesse mesmo ano, a estimativa para Pernambuco, foi de 340 casos novos de câncer de esôfago (7,5/100.000 habitantes) e 850 casos novos de câncer de estômago (18,07/100.000 habitantes)(INSTITUTO, 2016).

Os tumores esofágicos possuem duas variantes morfológicas: adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas. O adenocarcinoma esofágico geralmente ocorre no terço distal do esôfago e pode invadir a região do cárdia gástrico adjacente. Já metade dos carcinomas de células escamosas ocorre no terço médio do esôfago(TURNER, 2010).

No estômago, o adenocarcinoma é o tipo de neoplasia maligna mais comum, compreendendo mais de 90% de todos os cânceres gástricos, sendo classificados de acordo com sua localização, morfologia macroscópica e histológica. Embora a incidência de adenocarcinoma gástrico esteja diminuindo, a de câncer do cárdia gástrico está aumentando (INSTITUTO, 2016).

Vários são os fatores que podem contribuir para o surgimento de neoplasias em órgãos como esôfago e estômago, dentre eles tabagismo, consumo exagerado de álcool, deficiência de micronutrientes, infecção por *Helicobacter pylori* (causador de gastrite crônica), metaplasia intestinal e displasia glandular (BUCCHiet al., 2016; FAKHRAEI et al., 2016).

Além dos fatores citados anteriormente, o *Papilomavírus humano* (HPV) também tem sido associado na etiologia do carcinoma esofágico (SYRJÄNEN, 1982; SYRJÄNEN et al., 1982) e em diversos outros órgãos tais como mucosa oral, cabeça e pescoço, estômago, ânus, cólon, reto, bexiga, pênis, próstata, pulmão, mama, pele (BELTRÃO et al., 2015; ESQUENAZI et al., 2010; FREITAS et al., 2016; LIMA et al., 2016; TEZAL, 2012).

A participação do HPV nos tumores esofágicos e gástricos tem sido estudada por alguns grupos de pesquisa avaliando a presença do DNA viral, bem como, a expressão das oncoproteínas E6 e E7, além de outras proteínas

potencialmente envolvidas, dentre elas a proteína p16^{INK4a} e pRb (TERMINI e VILLA, 2008; CARVALHO, 2010).

Nos tumores induzidos pelo HPV, em modelo cervical, ocorre a integração do genoma viral com o genoma da célula hospedeira, levando à expressão de oncoproteínas virais E6 e E7. E6 degrada p53 e assim impede a apoptose da célula hospedeira, enquanto que E7 inativa funcionalmente pRb (proteína do retinoblastoma), evitando que se ligue ao fator de transcrição E2F. Tanto p53 como pRb, são proteínas supressoras de tumor que regulam o ciclo celular, já o fator E2F promove uma expressão aumentada de p16^{INK4a} (p16) no núcleo e no citoplasma da célula hospedeira podendo ser detectada por imuno-histoquímica. (MAHAJAN, 2016).

A patogenia molecular do carcinoma de células escamosas esofágicas e células gástricas permanece indefinida, mas as alterações na atividade de diversos genes supressores de tumor, incluindo as proteínas p53 e p16, provavelmente, estão envolvidas (TAGAVI et al., 2010).

A atividade de supressão tumoral da p16/pRb, frequentemente está inativa em muitos tipos de cânceres humanos que resulta em impacto na regulação de um grupo de genes envolvidos no controle da progressão do ciclo celular, permitindo que a célula entre na fase S, ultrapassando o ponto de checagem G1/S36 (DING et al., 2010).

Em virtude da escassez de literatura e da importância em se compreender melhor a relação entre as proteínas mencionadas acima na gênese do câncer de esôfago e estômago, faz-se necessário avaliar a presença e expressão das proteínas p16 e E6 do HPV em amostras de lesões benignas e malignas do esôfago e do estômago, visando contribuir com o esclarecimento dos mecanismos carcinogênicos e sua possível associação ao HPV.

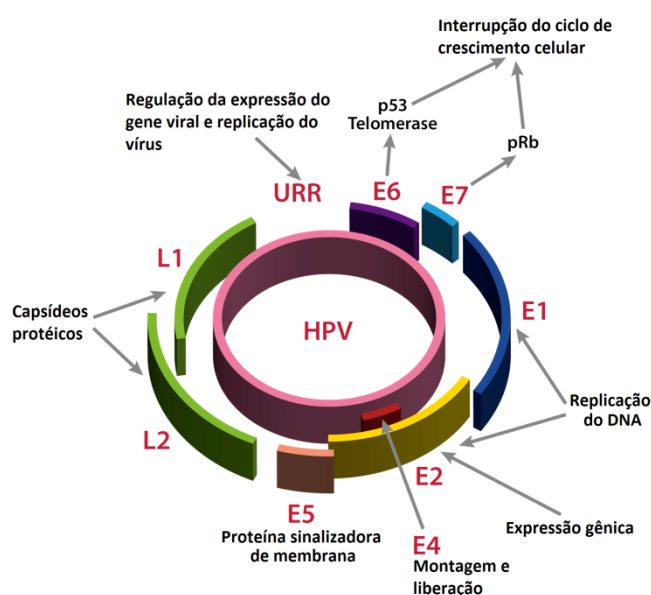
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Classificação e estrutura genômica do HPV

O HPV é um vírus pertencente à família *Papillomaviridae*, com diâmetro aproximado de 55 nm composto por 72 capsômeros de simetria icosaédrica não revestido por envelope lipídico. O genoma viral é composto por um DNA de dupla fita circular com aproximadamente 8.000 pares de bases e massa molecular de 5×10^6 daltons (ESQUENAZI et al., 2010; ROMANOS et al., 2015).

Seu genoma está dividido em: uma região codificante, com oito quadros de leitura aberta ORF (do inglês, *Open Reading Frames*); região precoce E (do inglês, *Early*) contendo os genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7, necessários à replicação viral e com propriedades de transformação oncogênica; região tardia L (do inglês, *Late*) contendo os genes L1 e L2 que possuem códigos para a transformação de proteínas do capsídeo viral; e outra região não codificante LCR (do inglês, *Long Control Region*) ou URR (do inglês, *Upstream Regulatory Region*), variando de 400 a 1000 pbs, localizadas entre as regiões L1 e E6, que controla a replicação do DNA e transcrição dos genes virais (ALBRING; BRENTANO; VARGAS, 2006; MOUGIN; NICOLIER; DECRION-BARTHOD, 2008; SOUTO; FALHARI; CRUZ, 2005; ZUR HAUSEN, 1999).

Figura 1 - Genoma do DNA circular dupla fita do HPV.



Fonte: Disponível em: <https://www.genpathdiagnostics.com/womens-health/gencerv/>

A transformação maligna induzida pelo HPV depende da integração dos oncogenes E6 e E7 do HPV ao genoma do hospedeiro, associado à persistência da infecção, a baixa imunidade celular e cofatores tais como, estado nutricional, polimorfismo viral, tabagismo e ingestão de álcool (ROSA et al., 2009).

2.2 Ciclo biológico do HPV

A infecção pelo HPV ocorre quando o vírus se instala nas células da camada basal do epitélio escamoso através de microfissuras. Na camada basal a replicação é não-produtiva, ou seja, é mínima, não se produzindo alterações identificáveis histologicamente. Já nas células escamosas diferenciadas das camadas suprabasais ocorre uma replicação do tipo produtiva com evidentes manifestações morfológicas como coilocitose e atipias celulares. (ELEUTÉRIO JÚNIOR; GIRALDO; GONÇALVES, 2006; BERNARD et al., 2010).

Segundo a literatura, no modelo cervical, o HPV infecta as células da membrana basal do epitélio escamoso e entra em processo de diferenciação. O vírus depende da maquinaria de replicação do DNA da célula hospedeira para se propagar, e induzir a proliferação das células infectadas. As proteínas E6 e E7, produtos de oncogenes virais, são fundamentais para garantir as características de malignidade do HPV (ROMANOS et al., 2015).

A proteína E6 interage com proteínas regulatórias do ciclo celular, proteína supressora tumoral p53 e a degrada por ubiquitinação. A proteína E7 interage com a pRb que limita a entrada na fase S, ao ligar-se às proteínas E2F, reguladoras de genes (FERRAZ; SANTOS; DISCACCIATI, 2012).

A expressão alterada do gene E7 inibe a atividade da pRb que tem um papel fundamental na manutenção da célula em G1, por formar complexos estáveis com o fator de transcrição de RNA mensageiro, E2F celular. A progressão do ciclo celular a partir da fase G1 é regulada por proteínas chamadas ciclinas, as quais formam um complexo com proteínas chamadas quinases ciclina-dependentes (CDKs). Os complexos ciclina-CDK regulam a fosforilação de proteínas envolvidas na

progressão do ciclo celular. E7 é uma potente inibidora da atividade da p21 e p27, inibidores de CDK, evitando o controle de checagem da fase G1. A proteína p16 atua como inibidora de CDK, mantendo a pRb hipofosforilada e controlando negativamente a progressão do ciclo. Assim, os genes virais E6 e E7 atuam em duas fases do ciclo celular do hospedeiro: no controle da passagem da fase G1 para a fase S e na regulação da apoptose celular. (CARVALHO, 2010; FERRAZ; SANTOS; DISCACCIATI, 2012; TOKUGAWA et al., 2002; TRINGLER et al., 2004).

2.3 Expressão de biomarcadores

A p16 é detectada quando o gene pRb sofre mutação, sendo detectado ou inativado por ação viral através da expressão do oncogene E7 do HPV. De maneira inversa, nos casos clínicos que contêm o gene pRb intacto, essa proteína fica reduzida não sendo, portanto expressa no epitélio normal, nas células proliferativas e nas lesões inflamatórias (O'NEILL; MCCLUGGAGE, 2006).

Entretanto, em lesões infectadas por HPV, E7 liga-se a pRB, impedindo a formação do complexo E7-E2F, levando a E2F livre e quanto mais livre estiver, maior será a expressão de p16, que se acumula na célula podendo ser detectada por métodos imuno-histoquímicos (BRASILEIRO-FILHO, 2011).

Em lesões de alto grau e câncer, no modelo cervical, verifica-se aumento da expressão de p16, sendo identificada como um biomarcador associado a expressão desregulada dos oncogenes do HPV (BAHNASSY et al. 2007; KLAES et al., 2001; SANO et al., 1998; TERMINI; VILLA, 2008; WANG et al., 2004; WENTZENSEN et al., 2005).

2.4 HPV em lesões esofágicas e gástricas

Em termos de incidência, o câncer de esôfago é de três a quatro vezes mais comum entre homens do que entre mulheres. No Brasil, o câncer de esôfago é o sexto mais incidente, para ambos os sexos. A sobrevida em cinco anos é baixa, por

volta de 15% a 25%. Por se tratar de um câncer de prognóstico ruim, as taxas de mortalidade aproximam-se das taxas de incidência em razão da alta letalidade dessa neoplasia (INSTITUTO, 2016).

O tipo de tumor mais comum no câncer de esôfago é o carcinoma de células escamosas (CCE), seguido pelo adenocarcinoma (AC). Existem diferenças epidemiológicas e etiológicas significativas entre eles. O CCE é mais prevalente sendo o subtipo predominante. O AC está associado com o esôfago de Barrett, sendo menos frequente (EDGREN; ADAMI; WEIDERPASS; NYRÉN, 2013).

Recentes mudanças foram observadas no curso da doença. A incidência de AC de esôfago tem sido crescente em vários países ocidentais, em parte devido ao aumento na prevalência de fatores de risco conhecidos, tais como: excesso de peso e obesidade, além de uma mudança da localização primária, saindo do terço inferior e indo para a junção esofagiana e gastroesofagiana. Em contrapartida, o CCE está em constante declínio em função da redução do consumo de tabaco e álcool ao longo do tempo (INSTITUTO, 2016).

Alguns fatores carcinogênicos ambientais como o consumo de tabaco, consumo crônico de álcool e deficiências nutricionais (CAMARGO et al., 2014; CASTELLSAGUÉ et al., 1999) podem causar CCE. Refluxo gastro-esofágico (RGE) e esôfago de Barrett são os mais importantes fatores de risco conhecidos para o AC (BHAT et al., 2011; HVID-JENSEN et al., 2011).

Quanto ao câncer gástrico, a maioria dos casos ocorre em países em desenvolvimento, com médio ou baixo índice de desenvolvimento humano (IDH), e alta prevalência de infecção pela bactéria *Helicobacter pylori*. Além disso, a taxa de incidência é mais alta no sexo masculino do que no feminino. Apesar de ter sido a segunda causa de morte por câncer no mundo em ambos os sexos em 2012, a série histórica das taxas de mortalidade apresentou declínio ao longo do tempo em vários países. Essa tendência repete-se na série temporal das taxas de incidência. Três explicações podem ter contribuído para esse declínio: a melhor conservação dos alimentos, o consumo de alimentos frescos e a redução de alimentos conservados no sal (INSTITUTO, 2016).

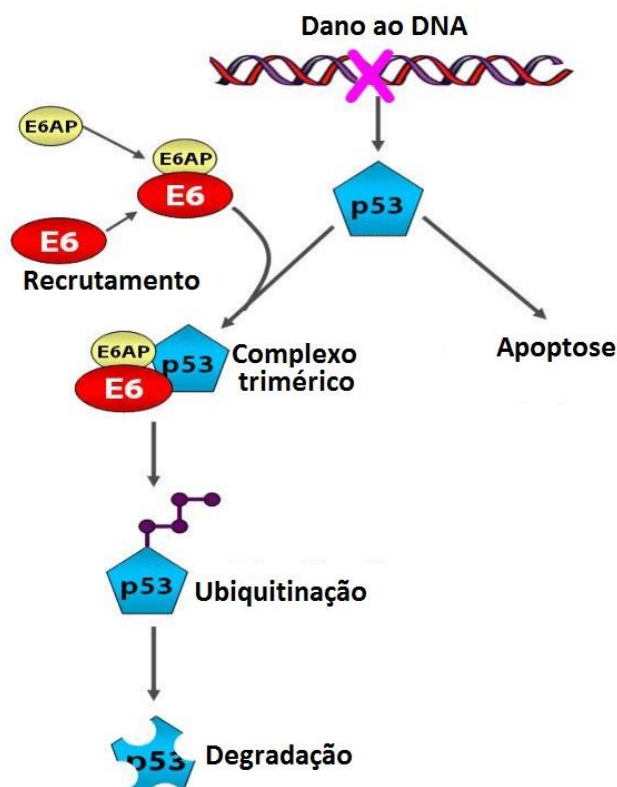
Além desses fatores, diversas infecções virais têm sido associadas a neoplasia gastro-esofágicas, dentre elas está a infecção pelo HPV. Estudos mostram que o HPV poderia desempenhar um papel potencial na patogênese do câncer gástrico. Entretanto, essa relação só pode ser confirmada pela detecção do HPV nas células de lesões precursoras (displasia gástrica ou adenoma)(ZENG, et al., 2016).

2.5 Oncoproteína E6

E6 é uma oncoproteína superexpressa pelo hospedeiro após o HPV integrar seu genoma ao DNA da célula infectada. Uma das funções desta proteína é interação e degradação da proteína pró-apoptótica BAK e a ubiquitinação e degradação da proteína p53. Resultando na resistência da célula à apoptose e o aumento da instabilidade cromossômica por acúmulo de mutações no genoma da célula hospedeira (ZUR HAUSSEN, 2002).

A oncoproteína E6 recruta uma ubiquitina celular ligase associada à proteína (E6AP) que forma um complexo trimérico com a p53 a qual leva a ubiquitinação e degradação da p53. A ubiquitinação é uma modificação pós-traducional dinâmica e reversível. Sem a proteína p53, a célula perde a capacidade de identificar e corrigir possíveis danos ao DNA. Assim, aumenta a frequência das mutações, e esse acúmulo é a causa subjacente ao desenvolvimento de neoplasias (MOODY et. al., 2010).

Figura 2 - Mecanismo de ação da oncoproteína E6. (JO e KIM, 2005).



Outra via de inativação da p53 é quando a E6 liga-se com a p300, impedindo a acetilação e inibindo a transcrição do gene e sua expressão (PATEL et. al., 1999).

A E6 induz a expressão da telomerase, responsável pela replicação das extremidades finais do DNA, os telômeros. Estes são perdidos progressivamente ao longo das repetidas replicações celulares, sendo importantes na integridade do genoma codificante. A oncoproteína E6 ativa a transcriptase reversa da telomerase (TERT) que estimula a ação da telomerase através da interação da E6AP com moduladores, repressores, ativadores e fatores nucleares de transcrição que se ligam aos sítios promotores do TERT (MOODY et. al, 2010).

2.6 A proteína p16^{INK4a}

As neoplasias resultam da perda do controle da regulação do ciclo celular promovida, dentre outros fatores, por alterações em proteínas reguladoras do ciclo celular, tais como: p16, p53, CDK4 ou pRb.

A proteína p16, inibidora de quinase4, é uma reguladora da divisão celular, superexpressa pela presença da oncoproteína E7 do HPV. A inativação da pRb pela oncoproteína E7 do HPV estimula a liberação do fator de transcrição E2F induzindo a célula a sair da fase G1 e entrar na fase S do ciclo celular, causando a perda do *feed-back* negativo entre pRb e o gene CDKN2A, este segue com a produção e acúmulo da p16 no núcleo e citoplasma da célula (BERGERON et al., 2010).

Estudos mostram que a superexpressão da proteína p16^{INK4a}, pode ser utilizada para estimar a evolução e extensão das lesões cervicais e auxiliar na diminuição das variações diagnósticas inter-observadores. Sua expressão é observada em núcleos e citoplasmas de células displásicas do epitélio escamoso, assim como em tumores ginecológicos, trato ano genital e orofaringe (MAHAJAN, 2016; MISSAOUI et al., 2010; RAJCANI et al., 2009).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Verificar a possível associação entre o *Papilomavírus humano* e os tumores esofágicos e gástricos.

3.2 Específicos

- Caracterização dos pacientes.
- Detectar a presença de DNA-HPV através da PCR nas amostras.
- Verificar a expressão da oncoproteína E6 em amostras parafinadas de esôfago e estômago;
- Verificar a expressão da proteína p16^{INK4a} em amostras parafinadas de esôfago e estômago;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tipo de estudo

Foi utilizado neste estudo o método observacional, analítico, transversal.

4.2 Local de estudo e origem das amostras

O estudo foi realizado tendo como base a análise dos prontuários médicos realizada no Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME) do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE).

As amostras de biópsias foram obtidas no arquivo de blocos parafinizados do Laboratório de Anatomia Patológica do (HC-UFPE).

4.3 Material de estudo

Foram selecionadas 89 biopsias parafinadas constituídas de 40 (quarenta) casos de esôfago e 49 (quarenta e nove) casos de estômago contendo representação significativa de lesões benignas e malignas (Tabela 1), no período compreendido entre o ano de 2013 a 2015.

Tabela 1 - Lesões benignas e malignas em esôfago e estômago.

Órgão	Lesão benigna	Lesão maligna
Esôfago	• Pólipo hiperplásico	• Carcinoma escamoso
	• Papiloma escamoso	• Adenocarcinoma
	• Displasia epitelial escamosa	• Neoplasia maligna pouco diferenciada
	• Neoplasia fusocelular	
Estômago		• Neoplasia mesenquimal de alto grau
	• Pólipo hiperplásico	• Tumor carcinóide
	• Tumor estromal	• Carcinoma de células em anel de sinete
		• Adenocarcinoma

4.4 Critérios de inclusão

Prontuários médicos devidamente preenchidos;

Amostras de biópsias parafinadas e preservadas;

Casos com o devido Relatório Anatomopatológico completo.

4.5 Critérios de exclusão

Amostras parafinadas que se apresentaram danificadas e/ou escassas;

Amostras parafinadas que não continham adequada identificação ou sem Relatório Anatomopatológico completo.

4.6 Aspectos Éticos

O presente trabalho foi aprovado sob CAAE n 45268415.9.0000.5208 do Comitê de Ética em Pesquisa/Centro de Ciências da Saúde/Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) obedecendo integralmente os princípios éticos estabelecidos na resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS) (Anexo A).

4.7 Riscos e benefícios

Quanto aos riscos, ocorreu um desgaste das amostras contendo a lesão patológica.

Não há benefícios diretos, porém como benefícios indiretos esta pesquisa pretende corroborar no esclarecimento do processo carcinogênico tumoral esofágico e gástrico.

4.8 Técnicas laboratoriais

4.8.1 Histopatologia

As amostras parafinadas foram encaminhadas para o Laboratório de Histotecnologia do Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFPE (PPGP/UFPE) a fim de obter-se cortes de 4 µm de espessura em micrótomo. Partes desses cortes foram estendidas em lâminas de vidro foscas e coradas em hematoxiliana e eosina (HE) confirmadas através do diagnóstico histopatológico. Os demais cortes foram estendidos em lâminas de vidro foscas silanizadas para ser realizada a reação imuno-histoquímica.

Também foram recortados em maior espessura, cerca de 10µm, para extração de DNA visando a detecção do HPV. As amostras foram congeladas a -20°C até o momento do processamento.

4.8.2 Imuno-histoquímica

Desenvolvida em 1941 por Coons e colaboradores, baseia-se no princípio da ligação antígeno-anticorpo (Ag-Ac) conjugado a um marcador cromógeno. O valor prático dessa técnica reside na identificação de várias estruturas celulares a nível funcional e morfológico sem provocar nenhum tipo de dano a ligação estabelecida entre o anticorpo e o antígeno. Propiciando a observação microscópica de onde se encontra o anticorpo e, conseqüentemente, o antígeno analisado. Pode ser aplicada para fins diagnósticos, prognósticos, indicação terapêutica, estudo de doenças infecciosas e outras doenças (FERRO, 2010).

Podendo ser útil na identificação, diagnóstico, prognóstico e tratamento das lesões pré-neoplásicas do câncer de esôfago e estômago, através da identificação e quantificação de proteínas que apresentam o seu perfil de expressão alterado nessas lesões, como por exemplo, a oncoproteína viral E6 e a proteína p16.

4.8.3 Reação Imuno-histoquímica da oncoproteína viral E6 e p16^{INK4a}

A imuno-histoquímica para detecção das proteínas E6 HPV-16/18 e p16 foi realizada no Laboratório de Pesquisas Citológicas e Moleculares-LPCM, onde as lâminas de vidro fosco silanizadas contendo os cortes de 4µm de espessura da biopsia parafinada foram desparafinadas em primeiro xilol e incubadas por 60 minutos em estufa à 60°C, seguido por incubação em segundo xilol por 30 minutos à temperatura ambiente, em seguida foram imersas em três sequências de álcool etílico á 100%, 80% e 70% por 5 minutos cada, lavadas em água destilada e mergulhadas em PBS por 5 minutos. Concluída esta etapa, foi realizada a recuperação antigênica em panela de pressão elétrica contendo tampão citrato em pH 6,0.

As lâminas foram resfriadas à temperatura ambiente para em seguida serem imersas em H₂O₂ + metanol à proporção de 1:1 por 30 minutos, lavadas em água destilada por 5 minutos e imersas em duas sequências de PBS por 5 minutos cada. Foi realizado bloqueio com PBS-BSA à 1% por 1 hora à temperatura ambiente, em seguida as lâminas foram imersas em duas sequências de PBS por 5 minutos cada. As amostras foram incubadas com anticorpos monoclonais de rato (anticorpo primário) contra a proteína E6 HPV-16/18 (Santa Cruz Biotechnology, code: sc-460; diluição 1:200). e p16^{INK4a} (Santa Cruz Biotechnology, code: G-175-405; diluição 1:400) por 2 horas em câmara úmida à 37°C, em seguida foram imersas em duas sequências de PBS por 5 minutos cada, incubadas com o anticorpo secundário (ADVANCE™ HRP Link; Dako, Glostrup, Denmark) por 20 minutos à temperatura ambiente e imersas em duas sequências de PBS por 5 minutos cada, para em seguida serem incubadas com o anticorpo terciário (ADVANCE™ HRP Enzyme; Dako, Glostrup, Denmark) por 20 minutos a temperatura ambiente. As lâminas seguiram para incubação com solução cromógena de 3',3'-diaminobenzidina (DAB) por 3 minutos, lavadas com água destilada, contra-coradas com hematoxilina de Mayer por 5 minutos, lavadas em água corrente, desidratadas com álcool etílico 70%, 80%, 100%, e 100% por 3 minutos cada, seguida de mergulho em xilol I e xilol II por 5 minutos cada, terminada esta etapa, foram montadas com lamínula de vidro e Entellan® (Merk) (LOPES et al. 2005; PEDROSO, 2008).

Foi considerado o tipo celular (epitelial escamoso ou glandular), bem como a posição das reações (núcleo ou citoplasma). Sendo classificados como positivos: fraco (+), moderado (++) e forte (+++) através da intensidade da marcação. Foi usado o seguinte parâmetro de eliminação: marcação pontual (apenas em um espaço pequeno e limitado) não foi considerado. Quando a marcação era difusa foi analisada a intensidade da marcação.

As fotografias foram obtidas pelo programa Axio Vision registrando as reações positivas para a imuno-histoquímica e a graduação da intensidade foi realizada através do software Image J.

4.8.4 Extração do DNA

As amostras de esôfago e estômago parafinadas tiveram seu DNA extraído utilizando o kit de extração DNeasy®Blood&Tissue Kit (QUIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha), seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante.

Em seguida, todas as amostras foram quantificadas através de um espectrofotômetro modelo Nano Drop 2000c da ThermoScientific.

A integridade do DNA foi confirmada por PCR, amplificando um fragmento de 110 pares de base (pb) do gene da β -globina PC04 e GH20, utilizando o conjunto de *primers* especificados na Tabela 2.

As condições da PCR foram as seguintes: 95°C durante 5 minutos; seguido por 30 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C, 1 minuto a 72°C e extensão final de 5 minutos a 72°C. Os produtos de PCR foram visualizados após eletroforese em um gel de Agarose 2%, por 30 minutos a 100 volts e corado em brometo de etídio.

Tabela 2 - Sequência dos oligonucleotídeos e tamanho dos fragmentos

Primer	Sequência (5'→3')	Tamanho (pb)	Referência
PC04	ACACAACGTGTGTTCACTAGC	110pb	Baldez, et al., (2009)
GH20	CAACTTCATCCACGTTTACC		
MY09	CGTCCMARRGGAWACTGATC	450pb	Manos et al., (1989)
MY11	GCMCAGGGWCATAAAYAATGG		
GP5	TTTGTTACTGTGGTAGATAC	110pb	de Roda Husman et al., (1995)
GP6	GAAAAATAAACTGTAAATCA		

4.8.5 Detecção do DNA viral

Amplificação em cadeia da polimerase(PCR) utiliza enzima capaz de sintetizar DNA a partir de uma cópia dessa molécula, em reação que inclui aquecimentos e resfriamentos sucessivos na presença de *primers* ou sequências iniciadoras específicas para a amplificação do DNA desejado (SILVA et al.,2004).

A detecção do DNA viral foi realizada no Laboratório de Estudos Moleculares e Terapia Experimental-LEMTE do Laboratório Central do Centro de Biociências-CB/UFPE, onde utilizamos dois conjuntos de *primers*.

A primeira amplificação utilizou o *primer* consenso e degenerado MY09 e MY11, com aproximadamente 450 pb derivados da região L1 do genoma do HPV. A termociclagem foi realizada com uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto com posterior extensão final a 72°C por 5 minutos.

Em seguida foi realizada uma Nested PCR a partir do MY09/MY11 com os iniciadores GP5/GP6, amplificando um fragmento de aproximadamente 110pb da região L1 do genoma do HPV. Essa associação revela mais de 23 tipos de HPVs oncogênicos e não oncogênicos (de Roda Husman et al., 1995).

As amostras foram amplificadas na presença de controles positivo (plasmídeo do HPV-16 clonado) ou amostra com lesão HPV-positiva. A termociclagem para os *primers* GP5/GP6 foi realizada com uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 44°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e 30 segundos com posterior extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos da PCR foram visualizados em gel de Agarose na concentração de 2%, por 30 minutos a 100volts e corados com brometo de etídio.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização das amostras

Das 89 amostras analisadas, 40 pertencem ao grupo de biópsias esofágicas e 49 pertencem ao grupo de biópsias gástricas. Ambas foram divididas em três subgrupos: o grupo das lesões benignas (LB), o grupo das lesões malignas (LM) e grupo controle (GC).

As lesões benignas e as malignas foram distribuídas de acordo com as características histomorfológicas da lesão (Tabela 3).

Tabela 3 - Quantitativo das lesões benignas e malignas do esôfago e estômago de acordo com as características histomorfológicas.

Órgão	Lesão benigna	Quantidade	Lesão maligna	Quantidade
Esôfago	Pólipo hiperplásico	6	Carcinoma escamoso	13
	Papiloma escamoso	6	Adenocarcinoma	6
	Displasia epitelial escamosa	1	Neoplasia maligna pouco diferenciada	1
	Neoplasia fusocelular	1		
Estômago	Pólipo hiperplásico	12	Neoplasia mesenquimal de alto grau	1
			Tumor carcinóide	1
	Tumor estromal	3	Carcinoma de células em anel de sinete	13
			Adenocarcinoma	9

5.2 Análise da detecção do DNA do HPV em tecido esofágico egástrico

Todas as amostras foram examinadas usando oligonucleotídeos de amplo espectro MY09/MY11 para detecção de HPV. No entanto, não houve amplificação nas amostras analisadas. Subsequentemente, foi realizado o *nested* PCR a partir do MY09/MY11 com os iniciadores degenerados GP5/GP6, ocorreu à amplificação do fragmento de aproximadamente 110pb da região L1 viral do HPV. O resultado da amplificação foi verificado por eletroforese em gel de agarose à 2% (p/v), corado em brometo de etídio e visualizado sob luz violeta (Figura 3-11).

5.3 Expressão imuno-histoquímica da oncoproteína E6

A imuno-histoquímica para a oncoproteína E6 foi realizada em biópsias parafinadas. Sua avaliação foi realizada a partir da média de *pixels* dada pelos histogramas de cada amostra analisada, sendo elas agrupadas pelo grau da lesão onde, para as biópsias esofágicas, 14 foram LB, 20 foram LM e 6 GC (Tabela 3) e para as biópsias gástricas 15 foram LB, 24 foram LM e 10 GC (Tabela 4).

Tabela 4 - Imuno-histoquímica da oncoproteína E6 do HPV em esôfago

Tipo de lesão	Casos positivos/total	%
LB	2/14	14,3
LM	5/20	25
GC	0/6	0

Tabela 5 - Imuno-histoquímica da oncoproteína E6 do HPV em estômago

Tipo de lesão	Casos positivos/total	%
LB	1/15	6,7
LM	6/24	25
GC	0/10	0

5.4 Expressão imuno-histoquímica da proteína p16

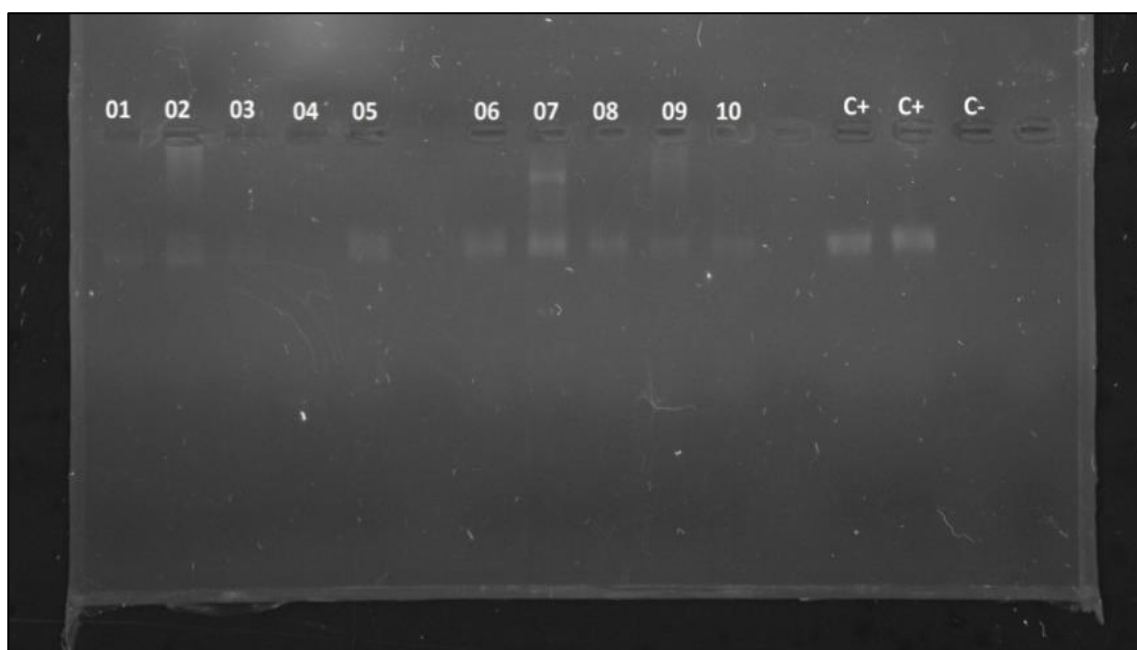
A imuno-histoquímica para p16 foi realizada nas biópsias esofágicas e gástricas. Os espécimes esofágicos apresentaram perfil de positividade semelhantes nas LB e nas LM (Tabela 6).

Tabela 6 - Imuno-histoquímica da proteína p16 em esôfago

Tipo de lesão	Casos positivos/total	%
LB	7/14	50
LM	9/20	45
GC	0/6	0

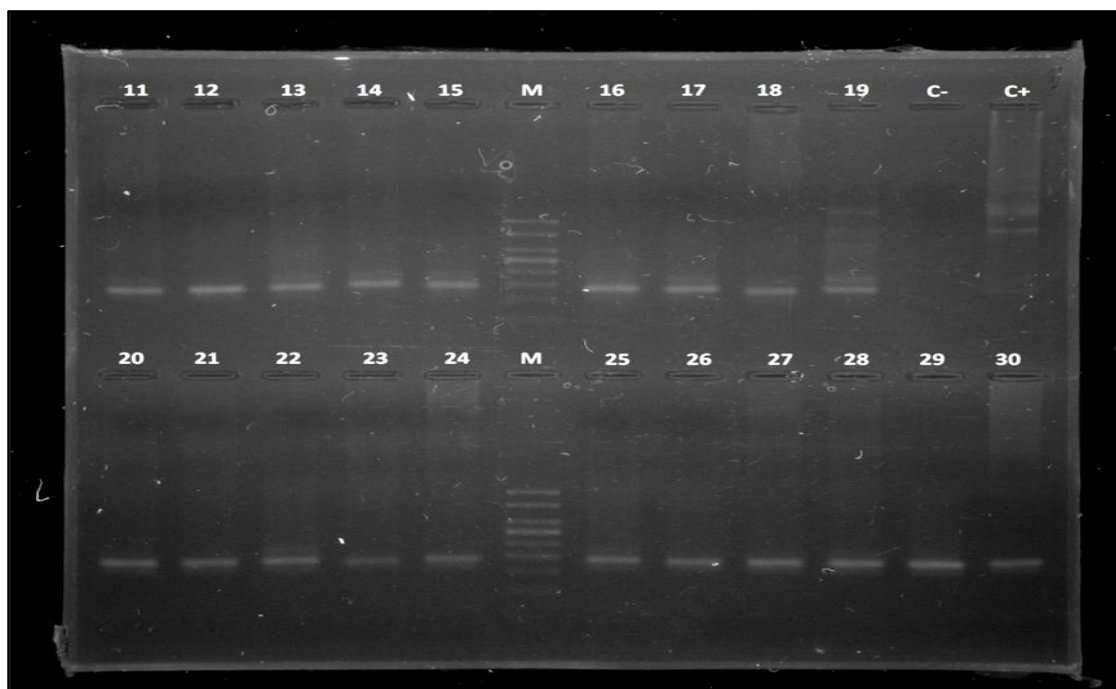
Todos os espécimes gástricos do grupo controle apresentaram positividade, certamente devido a falta de especificidade ocorrida na marcação das lesões gástricas, sendo, portanto, desconsideradas para qualquer tipo de análise.

Figura 3 - Eletroforese de HPV das LB (01-10) de esôfago, extraído de tecido parafinado utilizando o DNeasy®BloodTissue Kit.



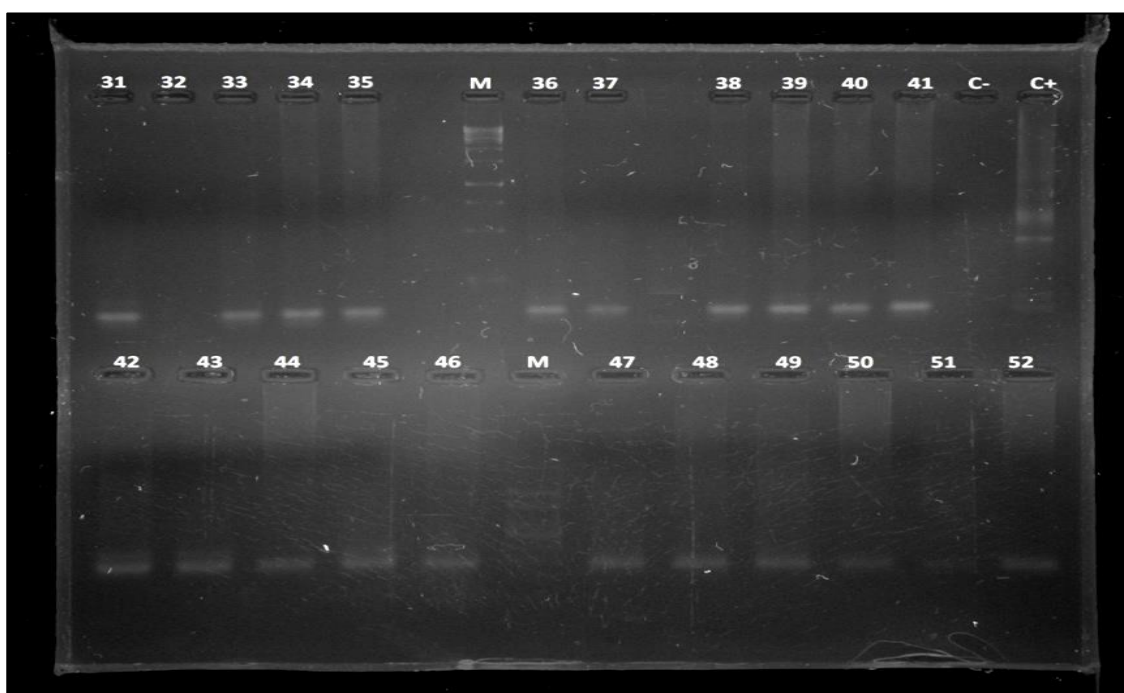
Legenda: O controle positivo C+ corresponde ao plasmídeo do HPV 16; o controle negativo C- corresponde ao mix não contendo os *primers* GP5/6.

Figura 4 - Eletroforese de HPV das LB (11-14) e LM (15-30) de esôfago, extraído de tecido parafinado utilizando o DNeasy®BloodTissueKit.



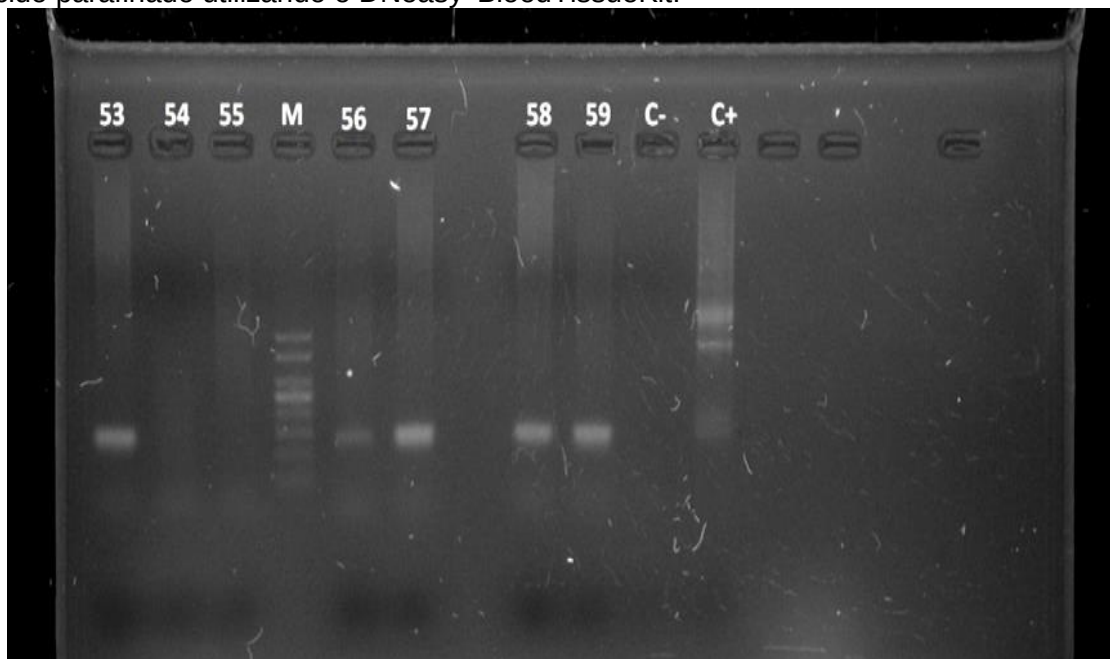
Legenda: O padrão de peso molecular está representado pela letra M de 1Kb; o controle positivo C+ corresponde ao plasmídeo do HPV 16; o controle negativo C- corresponde ao mix não contendo os *primers* GP5/6.

Figura 5 - Eletroforese de HPV das LM (31-34) e GC (35-40) de esôfago; e LB (41-52) de estômago, extraído de tecido parafinado utilizando o DNeasy®BloodTissueKit.



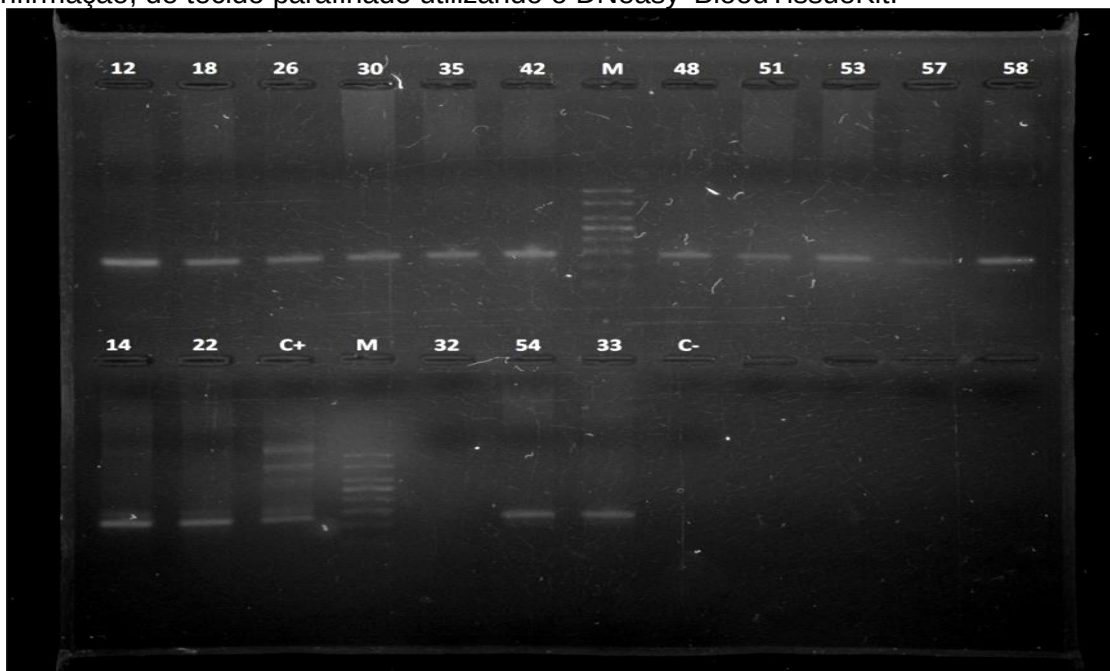
Legenda: O padrão de peso molecular está representado pela letra M de 1Kb; o controle positivo C+ corresponde ao plasmídeo do HPV 16; o controle negativo C- corresponde ao mix não contendo os *primers* GP5/6.

Figura 6 - Eletroforese de HPV das LM (53, 57-59) e LB (54-56) de estômago, extraído de tecido parafinado utilizando o DNeasy®BloodTissueKit.



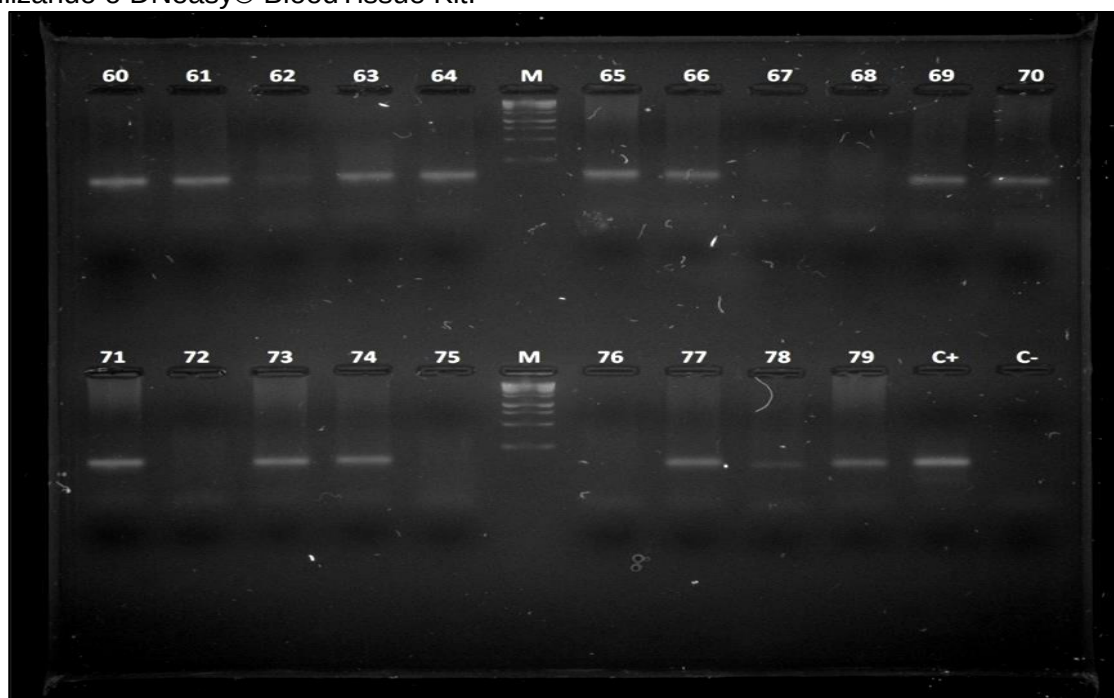
Legenda: O padrão de peso molecular está representado pela letra M de 1Kb; o controle positivo C+ corresponde ao plasmídeo do HPV 16; o controle negativo C- corresponde ao mix não contendo os *primers* GP5/6.

Figura 7 - Eletroforese de HPV de amostras aleatórias de esôfago e estômago para confirmação, de tecido parafinado utilizando o DNeasy®BloodTissueKit.



Legenda: O padrão de peso molecular está representado pela letra M de 1Kb; o controle positivo C+ corresponde ao plasmídeo do HPV 16; o controle negativo C- corresponde ao mix não contendo os *primers* GP5/6.

Figura 8 - Eletroforese de HPV das LM (60-79) de estômago, extraído de tecido parafinado utilizando o DNeasy® BloodTissue Kit.



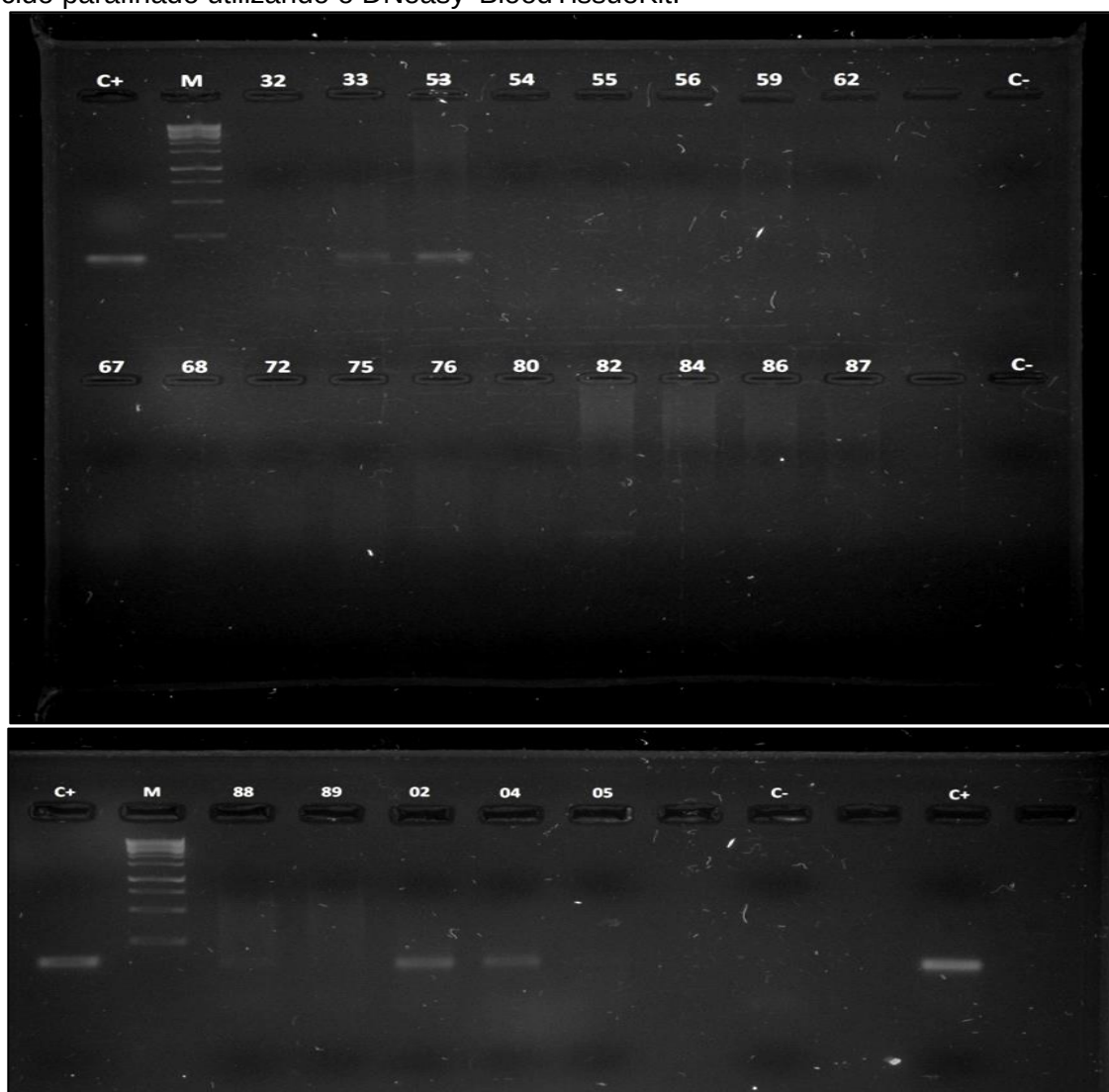
Legenda: O padrão de peso molecular está representado pela letra M de 1Kb; o controle positivo C+ corresponde ao plasmídeo do HPV 16; o controle negativo C- corresponde ao mix não contendo os primers GP5/6.

Figura 9 - Eletroforese de HPV do GC (80-89) de estômago, extraído de tecido parafinado utilizando o DNeasy® BloodTissue Kit.



Legenda: O padrão de peso molecular está representado pela letra M de 1Kb; o controle positivo C+ corresponde ao plasmídeo do HPV 16; o controle negativo C- corresponde ao mix não contendo os *primers* GP5/6.

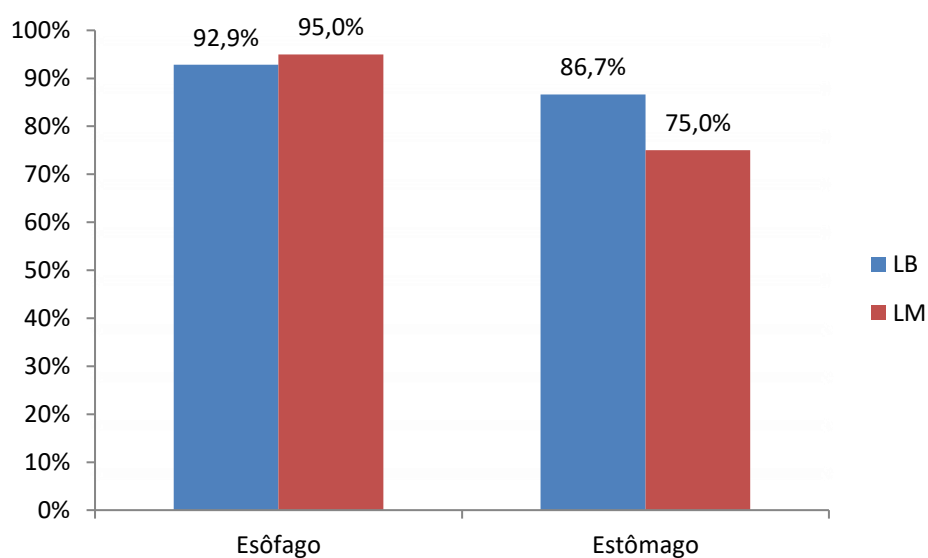
Figura 10 - Eletroforese de HPV de casos negativos aleatórios de esôfago e estômago, de tecido parafinado utilizando o DNeasy®BloodTissueKit.



Legenda: O padrão de peso molecular está representado pela letra M de 1Kb; o controle positivo C+ corresponde ao plasmídeo do HPV 16; o controle negativo C- corresponde ao mix não contendo os *primers* GP5/6.

Nos espécimes de esôfago, o DNA do HPV foi positivo em 92,9% (13/14) nas lesões benignas e em 95% (19/20) nas lesões malignas. Nos espécimes de estômago, o DNA do HPV foi positivo em 86,7% (13/15) nas lesões benignas e em 75% (18/24) nas lesões malignas (Figura 11).

Figura 11 - Frequência de espécimes positivo para o DNA do HPV nas lesões benignas (LB) e nas lesões malignas (LM).



6 DISCUSSÃO

Estudos atuais estimam que 23% de todas as neoplasias malignas humanas estão associadas a agentes infecciosos (ZUR HAUSEN, 2009;OMS 2013;BRÜCHER e JAMALL, 2014;BRAVO e FELEZ-SANCHEZ, 2015).Entre eles, o *Papilomavírus humano* (HPV) sendo responsável por 27,9% (ZUR HAUSEN, 2009) a 30,0% (BRAVO et al., 2010) de todos os casos de câncer incidentes no mundo.Muitas ferramentas diagnósticas têm sido desenvolvidas para investigar neoplasias (VARGA, OLIVEIRA, GRETEN, 2014), consequentemente favoreceram a implementação de diferentes métodos para identificar os Papilomavírus humanos, tais como: *Southern blot* (LETO et al., 2011), imuno-histoquímica (IHC) (ARALDI et al., 2015), hibridização cromogênica *in situ* (CISH) (MELO et al., 2015), microscopia eletrônica (ARALDI et al., 2014) e PCR utilizando iniciadores específicos e/ou degenerados (ARALDI et al., 2015; MELO et al., 2014). Por meio da imuno-histoquímica, o presente estudo verificou a presença da expressão da oncoproteína E6 do HPV em espécimes de esôfago e estômago e proteína p16 em espécimes de esôfago e estômago analisados em lesões benignas e nas lesões malignas.

A presença da oncoproteína E6 do HPV em esôfago e estômago apresentaram-se de forma semelhante nas lesões carcinogênicas, com aproximadamente 25% de positividade, através da verificação imuno-histoquímica. Deve ser dada importância a esse dado, segundo Arteaga-Núñez et al. (2014) essa oncoproteína tem um forte potencial de transformação maligna do tecido infectado, sendo uma das responsáveis pelo início do processo neoplásico e pela sua progressão.

A expressão alterada (aumentada ou reduzida) da proteína p16 pode estar diretamente relacionada à progressão tumoral em vários tipos de câncer , induzido ou não pelo HPV.FELIN et al. (2008) destaca que a proteína p16 não pode ser associada ao estágio destes tumores, devendo ser mais amplamente estudada em relação a outros parâmetros histopatológicos, tais como invasão e tamanho do tumor. Avaliando a expressão de p16 através da imuno-histoquímica, a positividade foi absoluta no grupo controle para estômago gerando discussões sobre a eficiência do anticorpo, bem como sua especificidade para este tipo de amostra. Embora os espécimes tenham sido analisados através de imuno-histoquímica para p16, não

houve concordância estatística entre os resultados obtidos. Interessante observar que nos estudos de meta-análise e revisões sistemáticas verifica-se que as análises imuno-histoquímicas predominavam entre os anos de 1990 até início dos anos 2000, mas que aos poucos foram sendo substituídas por análises de expressão através de técnicas moleculares, tal como, PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR), certamente isso ocorreu devido à baixa especificidade também verificada no presente estudo (YONG, XUDONG, LIJIE, 2013; WANG et al., 2016).

Entre estas técnicas, a PCR é a mais utilizada devido à sua alta sensibilidade (LETO et al., 2011). As diferenças na prevalência de HPV dependem em grande parte do teste utilizado e do tipo de amostras e sua conservação.

Estudo realizado por Antonsson, Knight e Whiteman (2016) não detectaram o DNA do HPV em nenhum dos espécimes esofágicos analisados. Mesmo utilizando iniciadores MY09/11 na primeira reação da PCR, porém, em seguida, utilizaram *primers* GP5+/6+, menores (aproximadamente 140 pb), os quais têm melhor capacidade de alinhamento. Entretanto, são menos específicos em amostras parafinadas. A importância da PCR para detecção do HPV está na habilidade de detectar e amplificar pequenas quantidades de DNA-HPV, sendo inerente um controle laboratorial rigoroso a fim de reduzir contaminações e falsos positivos. É necessária carga viral suficiente de HPV para modificar as células na lesão. Portanto a técnica utilizada foi suficientemente sensível para detectar com precisão a presença de DNA de HPV nos espécimes analisados.

Os resultados demonstram altas taxas de infecção do DNA do HPV, corroborando com Zhang et al. (2011) que sugere a infecção por HPV como um fator de risco suspeito ou potencialmente modificável na carcinogênese esofágica. Um possível evento de integração pode ser associado ao uso crônico do tabaco e consumo excessivo de álcool.

As pesquisas que relacionam ou que tentam relacionar lesões via HPV são maiores em tecidos esofágicos do que em gástricos (MEHRYAR et al., 2015; YONG et al., 2013). Essa prevalência decorre não por conta de achados amostrais aleatórios, mas por conta do tipo do tecido e, conseqüentemente do desenvolvimento de lesões escamosas. O modelo de desenvolvimento neoplásico com etiologia do

HPV é oriundo de estudos com lesões escamosas, deixando uma lacuna de questionamentos consideráveis para lesões glandulares.

Considerando que o anticorpo utilizado para E6 foi desenvolvido a partir de HPV subtipos 16 e 18, a reatividade tendo sido de aproximadamente 25% para ambos os tecidos, enquanto a presença do DNA viral foi de 95% nas lesões malignas de esôfago e de 75% nas lesões malignas de estômago. Essa discrepância dos dados pode ocorrer caso os HPVs que infectam, transitoriamente ou permanentemente o estômago sejam outros tipos virais, esses anticorpos não encontraram epítomos e, conseqüentemente não reajam. Essa informação fica ainda mais intrigante devido a PCR que apresentou positividade para estômago e esôfago. Essa positividade pode representar infecção por outros genótipos virais que não o HPV-16 e/ou 18.

É importante citar que o conjunto de *primers* utilizado nos experimentos anelam com aproximadamente 40 tipos de HPVs epitélio trópicos humano. Para que fosse possível reconhecer qual o subtipo viral deveria ser realizado o sequenciamento, porém, esse objetivo não foi realizado por falta de recursos financeiros.

As lesões malignas com positividade para E6 podem representar apenas infecção persistente pelos HPVs 16 e/ou 18 (anticorpo obtido desses dois tipos virais). Dois subtipos bastante frequentes em nossa região e nos trabalhos que associam a lesões cervicais. O HPV-16 é o subtipo mais frequente no mundo e sua associação a lesões escamosas cervicais já foi devidamente comprovada. Essa associação também pode está ocorrendo no esôfago e de forma persistente, a qual evolui para câncer. Porém no estudo de LUDUMER et al. (2015), ele afirma que o HPV não tem papel etiológico significativo na maioria dos casos de esôfago. Entretanto Soheili et al. (2015) mostrou que a infecção por HPV pode desempenhar um papel na carcinogênese esofágica apenas em regiões de alta incidência.

Embora o presente estudo tenha mostrado a presença do DNA-HPV em lesões benignas e lesões malignas de esôfago e estômago, de acordo com Pastrez et al. (2017) não é possível afirmar com segurança, que a carcinogênese está associada ao HPV. Estudos utilizando um quantitativo amostral maior e técnicas moleculares mais refinadas, tais como: sequenciamento para HPV e expressão das

oncoproteínas em tumores frescos através de RNAm, precisam ser realizadas para esclarecimento mais contundente.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Foi detectado o DNA do HPV em amostras com lesões tumorais esofágicas e gástricas;
- A presença da oncoproteína E6 foi verificada em 25% dos espécimes de carcinoma;
- A presença da proteína p16 foi verificada em, aproximadamente, 50% das amostras esofágicas avaliadas e 77% das amostras gástricas avaliadas;
- A presença do HPV nas lesões esofágicas e gástricas não asseguram que o vírus atue como fator carcinogênico destas lesões, entretanto, estudos que venham a comprovar a presença do DNA viral no genoma celular podem ser um passo inicial para buscar compreender seu papel nestas lesões.

REFERÊNCIAS

ALBRING L.; BRENTANO, J. E.; VARGAS, V. R. A. O câncer do colo do útero, o papilomavírus humano (HPV) e seus fatores de risco e as mulheres indígenas. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**; v.38, n.2, p.87-90.2006.

ALBUQUERQUE, G.S. Avaliação imunohistoquímica da oncoproteína E6, p16^{ink4a}, MMP-3 e TIMP-2 nas lesões precursoras e câncer cervical de mulheres infectadas pelo HPV de alto risco oncogênico. **Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco**. 2016.

ANTONSSON, A.; KNIGHT, L.; WHITEMAN, D.C. Human papillomavirus not detected in esophageal adenocarcinoma tumor specimens. **Cancer Epidemiology** v.41 p.96–98, 2016.

ANTUNES, L.C.M.; PROLLA, J.C.; LOPES, A.B.; ROCHA, M.P.; FAGUNDES, R.B. No evidence of HPV DNA in esophageal squamous cell carcinoma in a population of Southern Brazil. **World Journal of Gastroenterology** v.19, n.39, p.6598-6603, 2013.

ARALDI, R.; GIOVANNI, D.; MELO, T.; DINIZ, N.; MAZZUCHELLI-DE-SOUZA, J.; SANT'ANA, T.; CARVALHO, R.; BEÇAK, W.; STOCCO, R. Bovine papillomavirus isolation by ultracentrifugation. **J Virol Methods**. v.208, p.119–124, 2014.

ARALDI, R.; MELO, T.; NEVES, A.; SPADACCI-MORENA, D.; MAGNELLI, R.; MÓDULO, D.; DE-SÁ-JÚNIO, P.; MAZZUCHELLI-DE-SOUZA, J.; CARVALHO, R.; BEÇAK, W.; et al. Hyperproliferative action of bovine papillomavirus (BPV): Genetics and histopathological aspects. **Genet Mol Res**. v.14, p.12942–12954, 2015.

ARTEAGA-NÚÑEZ, J.; RODRÍGUEZ-DELFÍN, L.; PESANTES-VERA, M. VILLANUEVA-BALTUANO, M. Detección molecular de regiones oncogénicas E6 y E7 de virus del papiloma humano mediante PCR en pacientes Papanicolaou negativo del instituto regional de enfermedades neoplásicas de la libertad. **Sciendo** v.17, n.2, 2014.

BAHNASSY, A.A.; ZEKRI, A.R.; SALEH, M.; LOTAYEF, M.; MONEIR, M.; SHAWKI, O. The possible role of cell cycle regulators in multistep process of HPV-associated cervical carcinoma carcinoma. **BMC Clin Pathol**; v.24, n.7, p.4. 2007.

BALDEZ DA SILVA, M.F.P.T.; CHAGAS, B.S.; GUIMARÃES, V.; KATZ, L.M.C.; FELIX, P.M.; MIRANDA, P.M.; LIMA, A.A.; ARRAES, L.C.; MARTINS, D.B.G.; LIMA FILHO, J.L.; STOCCO, R.C.; CROVELLA, S.; FREITAS, A.C.; BEÇAK, W. HPV 31 and HPV 33 incidence in cervical samples from women in Recife, Brazil. **Genetics and Molecular Research**.n.8 v.4, p.1437-1443, 2009.

BELTRÃO, M.; WANDERLEY, M.S.O.; SANTANA, N.A.; BRUNESKA, D.; LIMA-FILHO, J.L. Site of infections associated with human papillomavirus. **Arch Gynecol Obstet**, v.291, p.481-491, 2015.

BERGERON, C.; ORDI, J.; SCHMIDT, D.; TRUNK, M.J.; KELLER, T.; RIDDER, R. European CINtec Histology Study Group. Conjunctive p16^{INK4a} testing significantly increases accuracy in diagnosing high-grade cervical intraepithelial neoplasia. **Am J Clin Pathol**. v.133, n.3, p.395-406, 2010.

BERNARD, H.U.; BURK, R.D.; CHEN, Z.; VAN DOORSLAER, K.; ZUR HAUSEN, H.; VILLIERS, E.M. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**. v.401, n.1, p.70-79, 2010.

BHAT, S.; COLEMAN, H.G.; YOUSEF, F.; JOHNSTON, B.T.; MCMANUS, D.T.; GAVIN, A.T.; MURRAY, L.J. Risk of malignant progression in Barrett's esophagus patients: results from a large population-based study. **J Natl Cancer Inst**. v.103, p.1049-1057, 2011.

BOSHART, M. et al. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. **The EMBO Journal**, v.3, n.5, p.1151-1157, 1984.

BRASILEIRO FILHO, G.; Distúrbios do crescimento e diferenciação celulares. In (8Ed) Bogliolo, **Patologia Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011, p. 226-281.

BRAVO, I.; FELEZ-SANCHEZ, M. Papillomaviruses: Viral evolution, cancer and evolutionary medicine. **Evol Med Public Health**, p.32–51, 2015.

BRAVO, I.; SAN JOSÉ, S.; GOTTSCHLING, M. The clinical importance of understanding the evolution of papillomaviruses. **Trends Microbiol**, v.18, p.432–438, 2010.

BRÜCHER, B.; Jamall I. Epistemology of the origin of cancer: A new paradigm. **BMC Cancer**, v.15, p.1–15, 2014.

BUCCHI, D.; STRACCI, F.; BUONARA, N.; MASANOTTI, G. Human papillomavirus and gastrointestinal cancer: A review. **World J Gastroenterol**, n.22, v.33, p.7415-7430, 2016.

CAMARGO, M.C.; KIM, W.H.; CHIARAVALLI, A.M.; KIM, K.M.; CORVALAN, A.H.; MATSUO, K.; YU, J.; SUNG, J.J.; HERRERA-GOEPFERT, R.; MENESES-GONZALES, F.; KIJIMA, Y.; NATSUGOE, S.; LIAO, L.M.; LISSOWSKA, J.; KIM, S.; HU, N.; GONZALES, C.A.; YATABE, Y.; KORIYAMA, C.; HEWITT, S.M.; AKIBA, S.; GULLEY, M.L.; TAYLOR, P.R.; RABKIN, C.S. Improvement survival of gastric cancer with tumour Epstein-Barr virus positivity: an international pooled analysis. **Gut**, v.63, p.236-243, 2014.

CARVALHO, M.G.D.; **Valor preditivo da avaliação do DNA e da expressão dos genes E6/E7 do papilomavírus humano na evolução da neoplasia intraepitelial cervical de grau 2**. Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas, 2010.

CASTELLSAGUÉ, X.; MUÑOZ, N.; DE STEFANI, E.; VICTORA, C.G.; CASTELLETTO, R.; ROLÓN, P.A.; QUINTANA, M.J. Independent and joint effects of tobacco smoking and alcohol drinking on the risk of esophageal cancer in men and women. **Int J Cancer**, v.82, p.657-664, 1999.

DE RODA HUSMAN, A.M.; WALBOOMERS, J.M.; VAN DEN BRULE, A.J.; MEIJER, C.J.; SNIJDERS P.J. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. **J Gen Virol**, v.76, n.4, p.1057-1062, 1995.

DING, G.C.; REN, J.L.; CHANG, F.B.; LI, J.L.; YUAN, L.; SONG, X.; ZHOU, S.L.; GUO, T.; FAN, Z.M.; ZENG, Y.; WANG, L.D. Human papillomavirus DNA and P16^{INK4A} expression in concurrent esophageal and gastric cardia cancers. **World Journal of Gastroenterology**, v.16, n. 46, p.5901-5906, 2010.

EDGREN, G.; ADAMI, H.O.; WEIDERPASS, E.; NYRÉN, O. A global assessment of the oesophageal adenocarcinoma epidemic. **Gut**, v.62, p.1406-1414, 2013.

ELEUTÉRIO JÚNIOR, J.; GIRALDO, P.C.; GONÇALVES, A.K. Marcadores imunohistoquímico de lesões precursoras do câncer do colo uterino associadas ao HPV: o papel da proteína de supressão tumoral p16^{INK4a}. **J. Bras. Doenças Sex. Transm**, v.18, n.1, p.62-65.2006.

ESQUENAZI, D.; BUSSOLOTI-FILHO, I.; CARVALHO, M.G.C.; BARROS, F.S. The frequency of human papillomavirus findings in normal oral mucosa of healthy people by PCR. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v.76, n.1.2010.

FAKHRAEI, F.; HAGHSHEENAS, M.R.; HOSSEINI, V.; RAFIEI, A.; NAGHSHVAR, F.; ALIZADEH-NAVAEI, R. Detection of human papillomavirus DNA in gastric carcinoma specimens in a high-risk of Iran. **Biomedical Reports**, v.5, p.371-375, 2016.

FELIN, I.P.D.; GRIVICICH, I.; FELIN, C.R.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. p53, p16 E COX-2 expression in esophageal squamous cell carcinoma and histopathological association. **Arq Gastroenterol**, v.45, n.4, p.308-12. 2008.

FERLAY, J.; SHIN, H.R.; BRAY, F.; FORMAN, D.; MATHERS, C.; PARKIN, D.M. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **Int. J. Cancer**, v.127, p.2893–2917, 2010.

FERRAZ, L.C.; SANTOS, A.B.R.; DISCACCIATI, M.G. Ciclo celular, HPV e evolução da neoplasia intraepitelial cervical: seleção de marcadores biológicos. **J Health Sci Inst**, v.30, v.2, p.107-11, 2012.

FERRO, A.B. Imunocitoquímica. Instituto Politécnico de Lisboa - **Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa**. Licenciatura em Anatomia Patológica e Tanatológica. 2010.

FREITAS, A.C.; GURGEL, A.P.; LIMA, E.G.; SÃO MARCOS, B.F.; AMARAL, C.M.M. Human Papillomavirus and lung carcinogenesis: an overview. **J Cancer Res Clin Oncol**, 2016.

HVID-JENSEN. F.; PEDERSEN. L.; DREWES, A.M.; SØRENSEN, H.T.; FUNCH-JENSEN. P. Incidence of adenocarcinoma among patients with Barrett's esophagus. **N Engl J Med**, v.365, p.1375-1383, 2011.

INSTITUTO Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2016**: incidência de câncer no Brasil – Rio de Janeiro: INCA, 2015.

JO, H.; KIM, J.W. Implications of HPV infection in uterine cervical cancer. **Cancer Ther**, v.3, p. 419-434, 2005.

KARLSEN, F.; KALANTARI, M.; JENKINS, A.; PETTERSEN, E.; KRISTENSEN, G.; HOLM, R.; JOHANSSON, B.; HAGMAR, B. Use of Multiple PCR Primer Sets for Optimal Detection of Human Papillomavirus. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 2095–2100. Sept. 1996.

KAY, P.; MEEHAN, K.; WILLIAMSON, A.L. The use of nested polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism for the detection and typing of mucosal human papillomaviruses in samples containing low copy numbers of viral DNA. **J Virol Metv**, 105, p.159-170.2002.

KLAES, R.; FRIEDRICH, T.; SPITKOVSKY, D.; RIDDER, R.; RUDY, W.; PETRY, U.; et al. Overexpression of p16 (INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. **Int J Cancer**; v.92, n.2, p.276-84. 2001.

KLAES, R.; BENNER, A.; FRIEDRICH, T.; RIDDER, R.; HERRINGTON, S.; JENKINS, D. et al. p16^{INK4a} immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. **Am J Sur Pathol**, v.26, p.1389-99, 2002.

LETO, M.; SANTOS-JÚNIOR, G.; PORRO, A.; TOMIMORI, J. Human papillomavirus infection: Etiopathogenesis, molecular biology and clinical manifestations. **An Bras Dermatol**, v.86, p.306–317, 2011.

LIMA, E.G.; AMARAL, C.M.M.; PEIXE, F.C.Q.; GURGEL, A.P.A.D.; SILVA-NETO, J.C.; FREITAS, A.C. Putative mechanisms of viral transmission and molecular dysregulation of mammary epithelial cells by human Papillomavirus: implications for breast cancer. **Current Molecular Medicina**, v.16, p.1-10, 2016.

LOPES, F.F.; CRUZ, M.C.F.N.; PEREIRA, A.L.A.; SILVEIRA, E.J.D.; GALVÃO, H.C.; SOUZA, L.B.; FREITAS, R.A. Análise imuno-histoquímica das citoqueratinas em ameloblastoma e tumor odontogênico adenomatóide. **J. Bras. Patol. Med.**, v.41, n.6, 2005.

LUDUMER, E.B.; STEPHENS, S.J.; PALTA, M.; WILLETT, C.G.; CZITO, B.G. Infecção tumoral do vírus do papiloma humano no carcinoma de células escamosas esofágicas. **Revista de Oncologia Gastrointestinal**, v.6, p.287-295. 2015.

MAHAJAN, A. Practical issues in the application of p16 immunohistochemistry in diagnostic pathology. **Human pathology**, v.51, p.64-74, 2016.

MANOS, MM.; TING, Y.; WRIGHT, DK.; LEWIS, AJ.; BROKER, TR.; WOLINSKY, S.M. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. **Cancer Cells**, v.7, n.17, p.209–214. 1989.

MEHRYAR, M.M.; LI, S.Y.; LIU, H.W.; LI, F.; ZHANG, F.; ZHOU, Y.B.; ZENG, Y.; LI, J.T. Prevalence of human papillomavirus in esophageal carcinoma in Tangshan, China. **World Journal of Gastroenterology**, v.21, n.10, 2015.

MELO, T.; ARALDI, R.; PESSOA, N.; DE-SÁ-JÚNIOR, P.; CARVALHO, R.; BEÇAK, W.; STOCCO. Bostaurus papillomavirus activity in peripheral blood mononuclear cells: Demonstrating a productive infection. **Genet Mol Res**, v.14, p.1612-1627, 2015.

MELO, T.; CARVALHO, R.; MAZZUCHELLI-DE-SOUZA, J.; DINIZ, N.; VASCONCELOS, S.; ASSAF, S.; ARALDI, R.; RUIZ, R.; KERKIS, I.; BEÇAK, W.; et al. Phylogenetic classification and clinical aspects of a new putative Delta papillomavirus associated with skin lesions in cattle. **Genet Mol Res**, v.13, p.2458-2469, 2014.

MOUGIN, C.; NICOLIER, M.; DECRION-BARTHOD, A.-Z. HPV et cancers: mécanismes de l'oncogenèse. **Revue Francophone des Laboratoires**, n. 405, p. 35-42, 2008.

NOBRE, R.J.; De ALMEIDA, L.P.; MARTINS, T.C. Complete genotyping of mucosal human papillomavirus using a restriction fragment length polymorphism analysis and an original typing algorithm. **J Clin Virol**, v.42, n.1, p.13-21, 2008.

O'NEIL, C.J.; MCCLUGGAGE, W.G. p16 expression in the female tract and its value in diagnosis. **Adv Anat Pathol.**, v. 13, p. 8-15, 2006.

OMS. **Global cancer rates could increase by 50% to 15 million by 2020**. 2013. Disponível em www.who.int/mediacentre/news/releases/2003/pr27/en.

PEDROSO, P.M.O. Padronização da técnica de imuno-histoquímica para raiva em amostras de tecido do sistema nervoso central de bovinos fixadas em formol e emblocadas em parafina. **Pesq. Vet. Bras.**, v.28, n.12, p.627-632, 2008.

PETERSEN, I.; KLEIN, F. HPV in non-gynecological tumors. **Pathologe**, n.29, p.118-122. 2008.

QIAAMP DNA FFPE **Tissue Handbook** 10/2007. Disponível em <www.qiagen.com> Acesso em: 30 jun 2013.

ROMANOS, M.T.V.; CAVALCANTI, J.F.; SANTOS, N.S.O.; SILVA, R.C.; ROBAINA, T.F.; PENA, G.P.A. **Víroses oncogênicas**. In: SANTOS, N.S.O.; ROMANOS, M.T.V.; WIGG, M.D. *Virologia Humana*. 3Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

ROSA, M.I.; MEDEIROS, L.R.; ROSA, D.D.; BOZZETI, M.C.; SILVA, F.R.; SILVA, B.R. Papilomavírus humano e neoplasia cervical. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.25, n.5, p.953-964, mai, 2009.

SAFATLE-RIBEIRO, A.V.; FRANCO, K.A.T.; CORBETT, C.E.P.; IRIYA, K.; ZILBERSTEIN, B.; Ribeiro Jr, U. Molecular markers of mucosa harboring gastric adenomas. **Arq. Gastroenterol**, v.50 n.2 abr./June 2013.

SAIKI, R. K.; D. H. GELFAND, S.; STOFFEL, S. J.; SCHARF, R.; HIGUCHI, G. T.; HORN, K. B.; MULLIS, E. H. A. ERLICH. Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. **Science**, v.239, p.487-491, 1988.

SANO, T.; OYAMA, T.; KASHIWABARA, K.; FUKUDA, T.; NAKAJIMA, T. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. **Am J Pathol**, v. 153, n.6, p.1741-8. 1998.

SEGAL, F.; LOURO, I. D. Adenocarcinoma Gástrico. In: Louro et al. **Genética Molecular do Câncer**. São Paulo: MSG Produção Editorial. 2002.

SILVA, E.D.C.; SMANIOTO, R.; CAMPOS, S.F.; HASS, P. Papilomavírus Humano. **Rev Bras de Anál Clínic**, n. 36, p. 137-142, 2004.

SOHEILI, F.; HEIDARY, N.; RAHBAR, M.; NIKKHO, B.; FOTOUHI, O.; AFKHAMZADEH, A. Papilomavírus humano e sua relevância clínica no carcinoma escamoso esofágico em uma população curda no oeste do Irã. **Doenças infecciosas**, p.1-4. 2015.

SOUTO, R.; FALHARI, J.P.B.; CRUZ, A.D. O Papilomavírus Humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 2, p. 155-160, 2005.

SYRJÄNEN, K.J. Histological changes identical to those of condylomatous lesions found in esophageal squamous cell carcinomas. **Arch Geschwulstforsch**, n.52, p.283–92, 1982.

SYRJÄNEN, K.J.; PYRHÖNEN, S.; AUKEE, S.; KOSKELA, E. Squamous cell papilloma of the oesophagus: a tumour probably caused by Human papilloma virus (HPV). **Diagn Histopathol**, n. 5, p. 291–296, 1982.

TAGHAVI, N.; BIRAMIJAMAL, F.; SOTOUDEH, M.; KHADEMI, H.; MALEKZADEH, R.; MOAVEN, O.; MEMAR, B.; A'RABI, A. e ABBASZADEGAN, M.R. p16^{INK4a} hipermetilação e p53, p16 e MDM2 expressão da proteína no esôfago Carcinoma de células escamosas. **BMC Cancer**, v.10, n.138, 2010.

TERMINI, L.; VILLA, L.L. Biomarcadores na Triagem do Câncer do Colo do Útero. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v.20, nº 2, p. 125-131, 2008.

TEZAL, M.; Interaction between Chronic Inflammation and Oral HPV Infection in the Etiology of Head and Neck Cancers. **International Journal of Otolaryngology**. Volume 2012, Article ID 575242, 9 pages doi:10.1155/2012/575242. 2012.

TOKUGAWA, T., SUGIHARA, H.; TANI, T.; HATTORI, T. Modes of silencing of p16 in development of esophageal squamous cell carcinoma. **Cancer Res**, v.62, p.4938-4944.2002.

TRINGLER, B.; GUP, C.J.; SINGH, M.; GROSHONG, S.; SHROYER, A.L.; HEINZ, D.E.; SHROYER, K.R. Evaluation of p16InK4a and pRb expression in cervical squamous and glandular neoplasia. **Hum. Pathol.**, v. 35, p.689-696, 2004.

TURNER, J.R. Trato Gastrointestinal. In.: Kumar, et al. Robbins e Cotran. **Patologia: Bases patológicas das doenças**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

VARGA, J.; OLIVEIRA, T.; GRETEN, F. The architect who never sleeps: Tumor-induced plasticity. **FEBS Lett.**, v. 588, p. 2422–2427, 2014.

WANG, J.; ZHAO, L.; YAN, H.; CHE, J.; HUIHUI, L.; JUN, W.; et al.A Meta-Analysis and Systematic Review on the Association between Human Papillomavirus (Types 16 and 18) **Infection and Esophageal Cancer Worldwide**. PLoS ONE, v.11, n.7, p.140-159, 2016.

WANG, S.S.; TRUNK, M.; SCHIFFMAN, M.; HERRERO, R.; SHERMAN, M. E.; BURK, R.D.; HILDESHEIN, A. BRATTI, M. C.; WRIGHT, T.; RODRIGUEZ, A.C.; CHEIN, S.; REICHERT, A.; VON KNEBEL DOEBERITZ, C.; RIDDER, R.; VON KNEBEL DOEBERITZ, M. Validation of p16^{INK4a} as marker of oncogenic human Papillomavirus infection in cervical biopsies from a population-based cohort in Costa Rica. **Cancer Epid Bio Preven.**, v.13, n.8, p.1355-1360., 2004.

WENTZENSEN, N.; BERGERON, C.; CAS, F.; ESCHENBACH, D.; VINOKUROVA, S.; VON KNEBEL DOEBERITZ, M. Evaluation of a nuclear score for p16^{INK4a}-stained

cervical squamous cells in liquid-based cytology samples. **Cancer**; v.105, n.6, p.461-7. 2005.

YONG, F.; XUDONG, N.; LIJIE, T. Human papillomavirus types 16 and 18 in esophagus squamous cell carcinoma: a meta-analysis. **Annals of Epidemiology**, v. 23, p.726-734, 2013.

ZENG, Z.; LUO, F.; ZOU, L.; HE, R.; PAN, D.; CHEN, X.; XIE, T.; LI, Y.; PENG, Z.; CHEN, G. Human papillomavirus as a potential risk factor for gastric cancer: a meta-analysis of 1,917 cases. **Onco Targets and Therapy**, n. 9, p.7105–7114, 2016.

ZHANG, Q.Y.; ZHANG, D.H.; SHEN, Z.Y.; XU, L.Y.; LI, E.M.; AU, W.W. Infection and integration of human papillomavirus in esophageal carcinoma. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v.214, p.156–161, 2011.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses in human cancers. **Proc Assoc Am Physicians.**, v. 111, n.6, p.581-587, 1999.

ZUR HAUSEN, H. The search for infectious causes of human cancers: Where and why. **Virology**, v.392, p.1–10, 2009.

Anexo A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa/CCS/UFPE

Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Serres Humanos		UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-	
--	---	---	---

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: TUMORES ESOFÁGICOS E GÁSTRICOS E SUA ASSOCIAÇÃO COM O PAPILOMAVÍRUS HUMANO

Pesquisador: Francisco Luís Almeida Paes

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 45268415.9.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.134.809

Data da Relatoria: 01/07/2015

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de mestrado apresentado pelo aluno Francisco Luís Almeida Paes ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFPE, sob a orientação do prof Dr Jacinto da Costa Silva Neto.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Verificar a presença do vírus HPV em amostras de tumores esofágicos e gástricos, com realização da genotipagem do vírus e expressão das proteínas p16INK4a, E6 e E7 nas referidas amostras.

Objetivo Secundário: Avaliar a taxa de infecção pelo HPV em amostras de biópsias esofágicas e gástricas;

Constatar quais são os tipos de HPV infectantes mais prevalentes;

Traçar o perfil do polimorfismo viral das amostras positivas para HPV;

Determinar nas amostras positivas para HPV a expressão das oncoproteínas E6 e E7; Associar a expressão de p16, E6 e E7 nas lesões positivas para HPV como método de avaliação do desenvolvimento tumoral;

Descrever o comportamento viral na progressão dos tumores esofágicos e gástricos.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS	
Bairro: Cidade Universitária	CEP: 50.740-600
UF: PE	Município: RECIFE
Telefone: (81)2126-8588	E-mail: cepccs@ufpe.br

**Comitê de Ética
em Pesquisa
Envolvendo
Serres Humanos**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-**



Continuação do Parecer: 1.134.809

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: poderá ocorrer um possível desgaste dos blocos de parafina bem como a retirada de partes importantes da lesão patológica, porém o material será processado por técnicos experientes colaborando para preservar a integridade do material analisado.

Os benefícios são indiretos uma vez que esta pesquisa pretende verificar a presença do vírus HPV em amostras de tumores esofágicos e gástricos e verificar se existe uma associação entre o HPV e os referidos tumores, onde a expressão das oncoproteínas virais E6 e E7 e da proteína p16 estaria relacionada ao grau histológico destes tumores.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Será um estudo do tipo observacional, analítico e transversal. É relevante porque a expressão das proteínas estudadas pode ser utilizada como um biomarcador preditivo para os referidos tumores.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória foram anexados e devidamente assinados e carimbados: folha de rosto, carta de anuência do Serviço de Patologia, autorização para uso dos blocos de parafina e dados dos prontuários do HC; Termo de confidencialidade, curriculum lattes e projetos anexados. A pesquisa dispensa TCLE uma vez que não será feita nenhuma abordagem a qualquer indivíduo e apenas serão utilizados os blocos de parafina do arquivo do laboratório de anatomia patológica do HC.

Recomendações:

Citar como benefício direto a informação ao clínico do subtipo de HPV para melhor adequação do tratamento.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Protocolo foi avaliado na reunião do CEP e está APROVADO para iniciar a coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final",

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br

Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Serres Humanos		UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-	
--	---	---	---

Continuação do Parecer: 1.134.809

disponível no site do CEP/CCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). O CEP/CCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

RECIFE, 02 de Julho de 2015

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS	
Bairro: Cidade Universitária	CEP: 50.740-600
UF: PE	Município: RECIFE
Telefone: (81)2126-8588	E-mail: cepccs@ufpe.br