

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM
GASTROENTEROLOGIA E HEPATOLOGIA**

LUÍS CARLOS MOREIRA ANTUNES

**PAPILOMAVÍRUS HUMANO NA LESÃO PRIMÁRIA E NA MUCOSA
ESOFÁGICA DE PACIENTES COM CARCINOMA DE CÉLULAS
ESCAMOSAS DO TRATO AERODIGESTIVO SUPERIOR**

Porto Alegre, RS, Brasil

2012

CIP - Catalogação na Publicação

Antunes, Luís Carlos Moreira

Papilomavírus humano na lesão primária e na mucosa esofágica de pacientes com carcinoma de células escamosas do trato aerodigestivo superior / Luís Carlos Moreira Antunes. -- 2012.

95 f.

Orientador: Renato Borges Fagundes.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Neoplasias Esofágicas . 2. Neoplasias de Células Escamosas. 3. Infecções por Papilomavirus. 4. Neoplasias de Cabeça e Pescoço. 5. Reação em Cadeia da Polimerase. I. Fagundes, Renato Borges , orient. II. Título.

LUÍS CARLOS MOREIRA ANTUNES

**PAPILOMAVÍRUS HUMANO NA LESÃO PRIMÁRIA E NA MUCOSA
ESOFÁGICA DE PACIENTES COM CARCINOMA DE CÉLULAS
ESCAMOSAS DO TRATO AERODIGESTIVO SUPERIOR**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
como requisito para obtenção do título de
Mestre em Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Renato Borges Fagundes

Porto Alegre, RS, Brasil

2012

DEDICATÓRIA

À minha esposa Cinara pelo incentivo e apoio em todos os momentos, e à Martina, minha filha, por me lembrar a leveza da vida.

AGRADECIMENTOS

O meu especial agradecimento ao Professor Renato Borges Fagundes que acreditou na minha capacidade, foi incansável em orientar este trabalho e compartilhar o seu conhecimento. Revelou-se para mim um exemplo a ser seguido de mestre e pesquisador.

Àqueles que contribuíram com o seu conhecimento em biologia molecular, em especial à Doutora Alice Odette Brule e à bióloga Patrícia Chaves Brites do laboratório de Biologia Molecular do Serviço de Hemato-Oncologia do HUSM, à Doutora Andréia Pires Souto Damini e à farmacêutica Grasiela Agnes do Laboratório de Genética Molecular da UFCSPA, ao Professor Mariano Gustavo Zalis e ao farmacêutico William Dias Correa do Laboratório Progenética no Rio de Janeiro.

Aos patologistas, Marta Pires da Rocha do Serviço de Patologia do HUSM, Monica Raposo do laboratório Progenética-RJ, e o Professor Carlos Renato Almeida Melo, que participaram com a análise histológica ou compartilhando o seu conhecimento na área.

Ao senhor Neri Alberto Balen, técnico do serviço de patologia do HUSM, eficiente e prestativo na seleção dos blocos de parafina.

Aos endoscopistas, que com habilidade, paciência e incondicional disponibilidade tornaram possível a realização deste trabalho: Eduardo Buzatti Souto, Daniela Costa, Stela Maria Motta e João Carlos Cantarelli Junior.

Ao professor Antônio Carlos Weston pelas sugestões no delineamento do trabalho.

À professora Sidia M. Callegari-Jacques pelas orientações quanto ao cálculo do tamanho da amostra e aos estatísticos do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo auxílio na análise dos resultados.

Ao Programa de Pós-Graduação em Gastroenterologia e Hepatologia, em especial ao Professor Sérgio Gabriel de Barros, pela oportunidade do aprendizado.

Aos colegas da pós-graduação Leandro Bizarro Muller e Antônio de Barros Lopes, pelas sugestões e pelo entusiasmo transmitido.

Aos Professores Dalnei Veiga Pereira e Waldir Veiga Pereira, e à Dra Virgínia Maria Cozer, fundamentais no meu crescimento intelectual e profissional.

À minha família, em especial aos meus pais Marli e Luíz (*in memoriam*), meus maiores exemplos de superação nos momentos de adversidade; à minha irmã Carmen Sílvia e ao meu cunhado, Professor Rudimar dos Santos Riesgo, que influenciaram a minha escolha profissional.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais
voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

RESUMO

As maiores taxas de câncer de esôfago no Brasil ocorrem no Rio Grande do Sul (18/100.000/ano para homens e 6/100.000/ano para mulheres em 2012), onde o carcinoma de células escamosas é o mais frequente. Além disso, a incidência de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP) também é significativa nesta região (11/100.000/ano para o câncer da cavidade oral e 10/100.000/ano para o câncer da laringe em homens em 2012). O tabagismo e o consumo de álcool são os principais fatores de risco tanto para o carcinoma de células escamosas do esôfago (CCEE), quanto para o CCECP. O papel do HPV no desenvolvimento de CCEE permanece controverso. Por outro lado, existem evidências de que o CCECP HPV+ é uma entidade distinta em comparação ao CCECP associado ao consumo de tabaco e de álcool.

Com o objetivo de investigar a associação da infecção pelo HPV com o CCEE e o CCECP no sul do Brasil, foram avaliados, prospectivamente, as amostras de três grupos. O grupo 1 foi formado por pacientes com CCEE, onde foram avaliadas amostras do tumor e de áreas de mucosa esofágica sem tumor. O grupo 2 foi formado por pacientes com CCECP, onde foram avaliadas biópsias do tumor primário e de áreas da mucosa esofágica, tanto iodo positivas quanto iodo negativas. O grupo 3 foi formado por pacientes dispépticos, não fumantes/não alcoolistas, com mucosa esofágica de aspecto normal pela endoscopia digestiva alta, onde foram realizadas biópsias do esôfago médio. Com extremo cuidado para evitar a contaminação do DNA, foi utilizada a técnica de nested-PCR com os primers gerais MY09/MY11 e GP5/GP6 para pesquisar a presença do HPV em amostras de tecido fixado em formalina e armazenados em parafina. Nós planejamos a realização de genotipagem do produto final da PCR para 73 tipos de HPV. O Grupo 1 incluiu 51 amostras de CCEE e 51 amostras de áreas esofágicas não tumorais. No Grupo 2, haviam 37 pacientes com 35 biópsias do tumor primário, 32 de áreas iodo positivas do esôfago (27 normais e 5 esofagites) e 17 de áreas não coradas do esôfago (15 normais e 2 esofagites). Neste grupo, um paciente apresentou tumores sincrônicos de CCECP e CCEE. O Grupo 3 incluiu 37 pacientes, 35 com mucosa esofágica normal e 2 com esofagite leve. Em um total de 224 amostras, apenas 6 apresentaram material inadequado para análise pela PCR. O DNA do HPV foi negativo em todas as 218 amostras pela técnica de nested-PCR.

Portanto, a análise de pacientes com CCEE e CCECP sugere que não há evidências de que o HPV esteja envolvido na carcinogênese do trato aerodigestivo superior no sul do Brasil.

ABSTRACT

The highest rates of esophageal cancer in Brazil occur in Rio Grande do Sul (18/100,000/year for men and 6/100,000/year for women in 2012), where squamous cell carcinoma is the most common. Furthermore, the incidence of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is significant in this region (11/100,000/year for cancer of the oral cavity and 10/100,000/year for laryngeal cancer in men in 2012). Tobacco smoking and alcohol consumption are the major risk factors for esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) and HNSCC. The role of HPV in the development of ESCC remains controversial. Otherwise, there are some evidences that HPV-related HNSCC is a distinct entity compared with HNSCC associated with smoking and alcohol consumption.

In order to investigate the association of HPV infection with ESCC and HNSCC in southern Brazil, we evaluated, prospectively, samples from three groups. Group 1 was formed by patients with ESCC where we evaluated esophageal samples from tumor and from non-tumoral areas. Group 2 was formed by HNSCC patients. We assessed biopsies from primary tumor and esophageal biopsies from either iodine negative or positive areas. Group 3 was formed by dyspeptic patients, no smokers/non alcoholics, with normal appearing esophageal mucosa in Upper GI Endoscopy, where biopsies were taken from middle esophagus. With extreme care to prevent DNA contamination, we used nested PCR with the general primer sets MY09/MY11 and GP5/GP6 for HPV L1 in formalin fixed paraffin-embedded tissue. We planned to genotype the final PCR product for 73 HPV types. Group 1 included 51 samples from ESCC and 51 samples of esophageal non-tumoral areas. In Group 2, there were 37 patients with 35 biopsies taken from primary tumor, 32 from iodine positive esophageal areas (27 normal and 5 esophagitis) and 17 from unstained esophageal areas (15 normal and 2 esophagitis). In this group, 1 patient had synchronous tumors of HNSCC and ESCC. Group 3 included 37 patients, 35 with normal esophageal mucosa and 2 with mild esophagitis. A total of 224 samples fixed in formalin and stored in paraffin, only 6 samples showed inappropriate material for PCR analysis. HPV DNA was negative in all 218 samples.

Therefore, we did not carry out the genotyping. In patients with ESCC and HNSCC from Southern Brazil, there is no evidence that HPV is involved in upper aerodigestive carcinogenesis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –Características clínicas e demográficas e fatores de risco dos pacientes.....	39
Tabela 2 –Localização e grau de diferenciação histológica observada em pacientes com carcinoma de células escamosas de esôfago e em pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço.....	41
Tabela 3 –Histologia das biópsias da mucosa esofágica por cromo-endoscopia de pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço.....	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Genoma do HPV 16.....	18
Figura 2 – Cladograma do HPV.....	20
Figura 3 – Infecção das células epiteliais pelo HPV.....	22
Figura 4 –Oncoproteínas do HPV e seus efeitos no maquinário do ciclo celular.....	23
Figura 5 –Eletroforese em gel de agarose da amplificação do gene L1 do HPV analisado por nested-PCR.....	43
Figura 6 –Papel da integração do HPV na progressão do epitélio normal para o carcinoma invasivo.....	49
Figura 7 – Localização dos <i>primers</i> de consenso MY09/MY11 e <i>primers</i> gerais GP5/GP6 na região L1 do genoma do HPV.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

Ac	Anticorpo
CCE	Carcinoma de Células Escamosas
CCECP	Carcinoma de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço
CCEE	Carcinoma de Células Escamosas de Esôfago
CCU	Câncer de Colo do Útero
CE	Câncer de Esôfago
CH-II	Captura Híbrida II
CID	Código Internacional de Doenças
CISCU	Carcinoma <i>in situ</i> de Colo do Útero
CP	Cabeça e Pescoço
CTADS	Câncer do Trato Aerodigestivo Superior
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
E	Gene ou proteína precoce (<u>early</u>)
EDA	Endoscopia Digestiva Alta
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FISH	<i>Fluorescent in situ hybridization</i>
GPPG	Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
HAP	Hidrocarboneto Aromático Policíclico
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HPV	Papilomavírus Humano
HPV-AR	Papilomavírus Humano de Alto Risco

HPV-BR	Papilomavírus Humano de Baixo Risco
HUSM	Hospital Universitário de Santa Maria
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IHQ	Imuno-histoquímica
L	Gene ou proteína tardia (late)
LCR	<i>Long Control Region</i>
ORF	<i>Open Reading Frames</i>
PCR	Reação em Cadeia da DNA-Polimerase
Pb	Par de base
TADS	Trato Aerodigestivo Superior
URR	<i>Upstream Regulatory Region</i>

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
1 REVISÃO DA LITERATURA	15
1.1 CÂNCER DE ESÔFAGO	15
1.2 CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO	16
1.3 PAPILOMAVÍRUS HUMANO	18
1.4 PAPILOMAVÍRUS HUMANO E CARCINOGENESE	21
1.4.1 Aspectos Históricos	21
1.4.2 Mecanismos de Carcinogênese	22
1.5 ASSOCIAÇÃO DO HPV COM O CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE ESÔFAGO	23
1.6 MÉTODOS UTILIZADO PARA DETECÇÃO DO HPV NO CCEE.....	25
2 JUSTIFICATIVA	27
3 OBJETIVOS	28
3.1 OBJETIVO GERAL.....	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4 PACIENTES E MÉTODOS	29
4.1 DELINEAMENTO.....	29
4.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	29
4.3 PROCESSO DE AMOSTRAGEM	29
4.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	30
4.5 MÉTODOS	30
4.5.1 Obtenção do termo de consentimento livre esclarecido	30
4.5.2 Procedimentos endoscópicos	31
4.5.3 Análise do material	31
4.5.3.1 Análise histológica	31
4.5.3.2 Diagnóstico molecular da infecção pelo HPV	32
4.5.3.2.1 Extração do DNA	32
4.5.3.2.2 Amplificação do DNA	33

4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
4.6.1	Cálculo do tamanho da amostra	34
4.6.2	Análise estatística dos resultados	35
4.7	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	35
4.8	LOGÍSTICA	36
5	RESULTADOS	38
5.1	PACIENTES - CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS E IDENTIFICAÇÃO DO GRUPO	38
5.2	ACHADOS ENDOSCÓPICOS E HISTOPATOLÓGICOS	39
5.3	DETECÇÃO DO HPV	42
6	DISCUSSÃO	44
	CONCLUSÕES	56
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
	ARTIGO EM INGLÊS	75
	APÊNDICES	91

INTRODUÇÃO

Mundialmente, o câncer esofágico é o oitavo câncer mais comum e é a sexta causa de morte por câncer. No Brasil, as maiores taxas de carcinoma de células escamosas do esôfago (CCEE) ocorrem no estado do Rio Grande do Sul, onde os fatores de risco reconhecidos como mais importantes nesta região são o tabagismo e o alcoolismo. Além disso, a incidência parece ser influenciada pelo consumo de uma bebida típica da região, o chimarrão. Curiosamente, no norte do Brasil a incidência é próxima a zero. Mundialmente, essa variação se repete entre as diferentes regiões, culturas e raças; e nem sempre é explicada pelos fatores de risco inicialmente citados. Com taxas de mortalidade e incidência próximas, o câncer de esôfago apresenta um prognóstico reservado, devido, principalmente ao diagnóstico tardio. Portanto, a identificação precisa dos fatores de risco presentes em regiões de maior incidência para essa neoplasia, possibilitando medidas de prevenção e programas de rastreamento mais eficientes, poderá mudar esse cenário.

Outro grupo de tumores que apresenta importantes taxas de incidência no sul do Brasil são os carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP), os quais compartilham alguns fatores de risco com o CCEE, como o consumo do tabaco e do álcool. Mais recentemente, nota-se, principalmente em países desenvolvidos, um aumento do número de casos de CCECP relacionados a outro fator de risco, a infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV).

Embora a infecção pelo HPV seja um fator de risco conhecido para os CCECP, com fortes evidências em vários estudos, o papel do HPV no desenvolvimento do CCEE é altamente controverso. No entanto, os cânceres causados por infecção viral oferecem uma oportunidade única para profilaxia, detecção precoce e tratamento. Merecendo, portanto, esforços na sua identificação. Com esse objetivo, nós procuramos investigar a associação entre a infecção pelo HPV e os tumores do trato aerodigestivo superior no sul do Brasil.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 CÂNCER DE ESÔFAGO

Com 326.600 casos novos por ano em homens e 155.000 em mulheres, o câncer de esôfago (CE) ocupa o oitavo lugar em incidência no mundo e o sexto em óbito por neoplasias malignas, e foi responsável pela morte de 276.100 homens e 130.700 mulheres em 2008.¹ O CE apresenta uma taxa de incidência global duas vezes maior em países menos desenvolvidos quando comparada às regiões de maior desenvolvimento.²

A maioria dos tumores de esôfago é constituída por carcinoma de células escamosas (CCE), cuja incidência tem diminuído nos países desenvolvidos, onde as taxas são de menos de 10/100.000 habitantes. Por outro lado, nos países menos desenvolvidos, a incidência permanece alta, e atinge mais de 100/100.000 habitantes em regiões de alto risco como China, Irã e África do Sul.²

Para o Brasil, a estimativa do INCA (Instituto Nacional do Câncer) é de 10.420 casos novos de CE para o ano de 2012, com 7.770 casos do sexo masculino (8/100.000 habitantes) e 2.650 do sexo feminino (3/100.000), e representa, respectivamente, a sexta e a décima quinta posições em incidência. Entre os estados brasileiros também é observada uma grande variação geográfica, onde o Rio Grande do Sul possui a maior incidência, com 18,01/100.000 habitantes do sexo masculino e 6,60/100.000 habitantes do sexo feminino, com um total estimado de 1.340 casos, enquanto os estados do Acre, Amapá e Roraima possuem incidências próximas de zero. Digno de nota é a estimativa para o estado de São Paulo para 2012, de 4.430 novos casos, representando o maior número de casos novos no país.³

No ocidente, e especialmente nos Estados Unidos onde o carcinoma de células escamosas de esôfago (CCEE) é mais comum em afro-americanos, mais de 90% dos casos estão associados ao consumo de tabaco e álcool. Em contraste, em áreas de alto risco como em Linxian na China e o nordeste do Irã, poucos casos são associados ao tabaco e ao álcool, sendo os principais fatores de risco, a ingestão reduzida de frutas e vegetais, deficiências de selênio, zinco e vitamina E, elevada exposição aos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) e higiene oral pobre. No Rio Grande do Sul, onde 80% dos casos de CE são do tipo histológico de células escamosas, a população está exposta a altos níveis de HAP, provenientes da fumaça produzida pelo tabaco e pelo preparo do churrasco, e do consumo de chimarrão. Este último, provavelmente está associado à ingestão de carcinógenos (HAP)

presentes na *erva mate*, naturalmente ou adicionados durante o seu processamento, e à lesão térmica da mucosa esofágica causada pelas altas temperaturas em que o chimarrão é consumido. Além disso, o consumo excessivo de álcool no sul do Brasil é maior do que em outras áreas de alto risco para CCEE no mundo.^{2, 4-9}

Entre outras possíveis condições associadas ou predisponentes estão: neoplasias de cabeça e pescoço, doença celíaca, Síndrome de Plummer-Vinson, Tilose ou Síndrome de Howel-Evans, acalásia, estenose cáustica, história de tratamento radioterápico para câncer de mama, e infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV).^{10, 11}

1.2 CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO

A expressão câncer de cabeça e pescoço define um grupo heterogêneo de neoplasias malignas envolvendo diferentes subsítios (cavidade oral, orofaringe, hipofaringe e laringe), com fatores de risco e características patológicas similares, sendo a maioria das neoplasias desta região do tipo carcinoma de células escamosas (CCE).

A incidência mundial do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP) tem aumentado gradualmente nas últimas três décadas, ocupando a sétima posição em incidência e causa de morte por câncer. Em 2008, somando-se as estimativas dos diferentes subsítios - lábio e cavidade oral (CID: C00-08), nasofaringe (CID:C11), laringe (CID: C32) e outros sítios na faringe (CID: C09-10, C12-14) - foram relatados aproximadamente 633.000 casos e 355.000 mortes no mundo.^{1, 12, 13}

A incidência de CCECP é também significativa no sul do Brasil, com taxas de 11,57/100.000 homens e 3/100.000 mulheres para o câncer da cavidade oral, e 9,46/100.000 homens para o câncer de laringe, enquanto que, em mulheres a magnitude deste último é muito pequena.³

Os fatores de risco mais importantes, e que parecem ter um efeito sinérgico sobre a mucosa do trato aero-digestivo superior (TADS), são o tabaco e o álcool, podendo aumentar o risco para CCE de cavidade oral e faringe em até 50 vezes. Além desses, outros fatores frequentes são o baixo consumo de fibras e de vitaminas na forma de frutas e vegetais, a precariedade da higiene oral e da dentição, e a infecção por HPV.¹² Este último fator de risco foi inicialmente sugerido por Syrjänen em 1983, o qual notou que 40% dos cânceres de seu estudo continham similaridades histológicas e morfológicas com lesões associadas ao HPV.¹⁴ Desde então, vários estudos epidemiológicos apresentam fortes evidências da associação do

HPV com CCECP, reforçados pelo aumento de alguns subtipos (CCE de língua e tonsilas), a despeito da redução do tabagismo, como descrito nos EUA, Suécia e Finlândia.¹⁵⁻¹⁸ A associação do HPV com CCECP é particularmente mais evidente justamente naqueles pacientes não expostos aos fatores de risco clássicos, como o tabaco e o álcool.¹⁹⁻²¹

A epidemiologia dos CCECP mudou dramaticamente nas últimas duas décadas, com uma redução do número de casos de CCECP associados ao tabaco e um aumento dos tumores de orofaringe associados ao HPV. Existem fortes e consistentes evidências moleculares demonstrando que o HPV é causa etiológica destes tumores, sendo detectado no tecido tumoral, onde é encontrado no núcleo das células, com atividade de transcrição, clonalidade, e não é encontrado no tecido benigno adjacente.²⁰ Além disso, estudos de caso-controle revelaram que pacientes com câncer de orofaringe possuem um maior número de parceiros sexuais durante a vida e costumam ter mais infecções orais por HPV do que os controles pareados.^{19, 22-24} A prevalência do HPV oral parece aumentar no início da vida sexual, aumentando de 1,5% na faixa etária entre 12 e 15 anos para 3,3% dos 16 aos 20 anos, e em torno de 4,5% nos adultos saudáveis. Prevalências ainda maiores são encontradas entre mulheres com infecção do colo do útero por HPV e pessoas infectadas com HIV.²⁴

Em 2005, Kreimer et al. realizaram uma metanálise onde foram avaliados 60 estudos, com amostras de 26 países, incluindo 5.046 casos de CCECP analisados pela técnica de PCR e identificaram associação com HPV em 26% (35,6% na orofaringe, 23,5% na cavidade oral e 24,0% na laringe). O tipo de HPV mais frequente foi HPV 16 (86,7% na orofaringe, 68,2% na cavidade oral e 69,2% na laringe), seguido pelo HPV 18 (1,0% na orofaringe, 8,0% na cavidade oral e 3,9% na laringe).²⁵

Um acúmulo de evidências sugerem que o CCECP HPV positivo é um importante fator prognóstico associado à evolução favorável.^{20, 26-29} Quando se compara a progressão entre os casos HPV positivos e HPV negativos, observa-se melhores taxas de resposta ao tratamento (quimioterapia de indução: 82% vs 55%, quimio-radioterapia: 84% vs 57%), maior sobrevida e redução no risco de progressão.³⁰ Além disso, no que se refere especificamente ao CCE de orofaringe HPV positivo, dados recentes sugerem que o status do tumor em relação ao HPV é fator prognóstico independente para sobrevida.³¹

1.3 PAPILOMAVÍRUS HUMANO

Os HPVs são vírus de DNA que se replicam na pele e nas mucosas, e habitualmente dão origem a lesões benignas como verrugas ou papilomas. Até o momento, são descritos mais de 100 tipos de HPVs, classificados quanto a oncogenicidade em baixo ou alto risco. Os primeiros, como o HPV-6 e o HPV-11, são inicialmente associados às lesões benignas, que raramente evoluem para neoplasias. Já os de alto risco, como o HPV-16 e o HPV-18, estão associados às lesões que podem progredir para neoplasia intra-epitelial de alto grau e carcinoma.^{32,33} Ocasionalmente o termo risco intermediário pode ser usado para os HPVs cuja a oncogenicidade ainda está sendo investigada.³⁴

O genoma dos HPVs é constituído por aproximadamente 8.000 pares de bases, cujo DNA assume duas formas, epissomal (circular) e integrada (linear). Na primeira forma, o DNA viral encontra-se dentro do núcleo da célula do hospedeiro, mas não ligado ao DNA desta célula. Na forma linear, o DNA viral incorpora-se ao DNA da célula do hospedeiro. A primeira forma é a observada nas lesões benignas e pré-malignas, enquanto que a segunda está relacionada à progressão para displasia e carcinoma *in situ* (Figura 1).^{32,35}

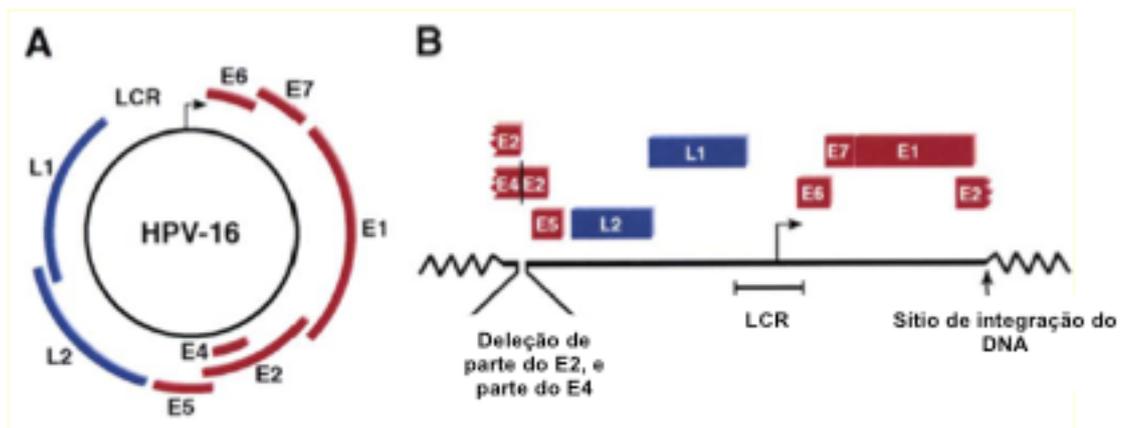


Figura 1: Genoma do HPV16. (A) Genoma circular epissomal presente em lesões pré-malignas. (B) Organização linear do genoma mostrando o sítio de integração em E2.³⁵

Todos os genomas de HPV são formados por três regiões gerais: (1) *upstream regulatory region* (URR) ou região regulatória (LCR de *long control region*), que contém as sequências que controlam a transcrição e a replicação viral; (2) região precoce (ou E de *early*) que codifica as proteínas E1, E2, E4, E5, E6 e E7 envolvidas em múltiplas funções incluindo replicação, transcrição e transformação celular; e (3) região tardia (ou L de *late*) que codifica

as proteínas L1 e L2 do capsídio. As sequências que codificam E e L encontram-se reagrupadas em um único filamento de DNA em fases abertas de leitura (ou ORFs de *open reading frames*); enquanto a LCR encontra-se em uma região sem ORF detectável, que é uma região não codificante localizada entre os genes L1 e E6.³⁶

A classificação do HPV é baseada na heterogenicidade da sequência do seu DNA. O “tipo” do DNA é definido como uma diferença de pelo menos 10% na sequência completa de nucleotídeos do gene L1, enquanto “subtipos” apresentam uma variação de 2 a 10%. E, finalmente, são denominados de “variantes” quando a sequência de nucleotídeos dos genes de L1 diferem menos de 2% (Fig. 2).³⁷

Dos 189 tipos de papilomavirus (PV) classificados, 120 são HPVs, 64 são isolados em outros mamíferos, 3 em aves e 2 em répteis. Eles são agrupados em 39 gêneros dentro da família Papillomaviridae, sendo que os HPVs estão reunidos em apenas 5 gêneros (Alpha-, Beta-, Gamma-, Mu- e Nu-PVs).³⁸

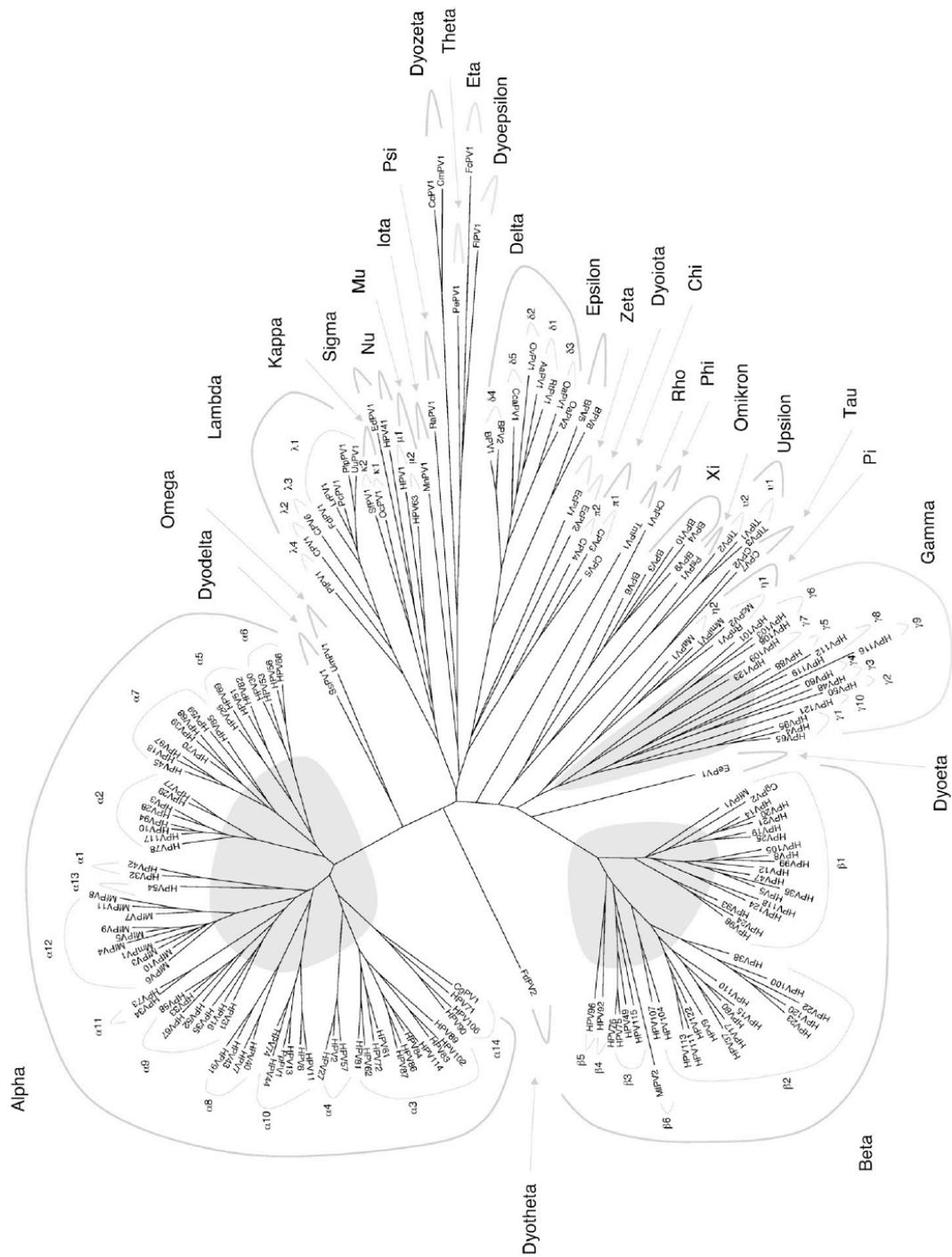


Figura 2: Cladograma do HPV.³⁸

1.4 PAPILOMAVÍRUS HUMANO E CARCINOGENESE

1.4.1 Aspectos Históricos

As verrugas cutâneas ou genitais já eram conhecidas dos antigos gregos e romanos, sendo que as últimas eram consideradas como sinal de promiscuidade sexual.³⁹ Em 1842, o médico italiano Rigoni-Stern, após revisar as causas de óbito de mulheres da cidade de Verona durante o período de 1760 a 1839, publicou um artigo em que ele identificava uma alta frequência de câncer de colo de útero em mulheres casadas, viúvas e prostitutas. Curiosamente, entre virgens e freiras essa ocorrência fora rara, levando-o a concluir que o câncer de colo de útero deveria estar associado ao contato sexual.⁴⁰

Relatos do final do século 19 e início do século 20, sugeriam a natureza infecciosa das verrugas.^{41, 42} Posteriormente, na década de 20 do século passado, também foram identificadas como de origem infecciosa as verrugas genitais e a papilomatose laríngea.⁴³

Ainda no início do século 20, o potencial carcinogênico de um vírus foi descrito em coelhos, causando-lhes papilomas que, em raras ocasiões, progrediam para carcinomas de células escamosas de pele.⁴⁴⁻⁴⁶ Em 1949, Strauss et al. demonstraram a presença de partículas virais em papilomas através de microscopia eletrônica, e as primeiras publicações com a descrição da fita dupla de DNA circular do HPV ocorreram na década de 60.^{47, 48} No final da década de 70 e início dos anos 80, Harold zur Hausen sugeriu um possível papel do HPV no câncer de colo de útero (CCU) e identificou partículas do vírus em amostras de lesões displásicas do colo uterino, além de isolar o primeiro HPV associado ao CCU (HPV 16), sendo agraciado com o prêmio Nobel em 2008 pela descoberta da associação entre o HPV e o CCU.⁴⁹⁻⁵⁸

Walboomers et al publicaram na década de 90 um dos principais estudos epidemiológicos comprovando a presença de HPV em 99,7% das amostras de CCU, sendo essa relação causal identificada também por outros autores.⁵⁹⁻⁶²

Além do CCU, outras associações do HPV com neoplasias estão bem estabelecidas como em aproximadamente 50% dos carcinomas de células escamosas de vulva, 30-50% dos carcinomas de pênis, 60-90% dos carcinomas de vagina, 80-90% dos cânceres da região anal, 25-30% dos cânceres de orofaringe e em aproximadamente 5% dos cânceres de laringe.^{19, 26, 58, 63-72} Até a presente data, nenhum tipo de HPV foi identificado como carcinogênico exclusivamente de um destes determinados sítios.⁷³

Outras associações do HPV como com câncer de pele, de mama, de cólon, de próstata, de bexiga, de pulmão e de esôfago, necessitam de dados mais consistentes.^{58, 74-114}

1.4.2 Mecanismos de Carcinogênese

Na maioria dos tumores induzidos pelo HPV, foi observado que a expressão das proteínas virais E6 e E7 foi seletivamente mantida, implicando-as diretamente no processo de carcinogênese. Além disso, nota-se que após a integração do vírus, há um aumento de expressão dos genes virais E6 e E7, e perda da expressão de genes como E1, E2, L1 e L2 (envolvidos na replicação e formação do capsídeo) (Figura 3).^{32, 33, 35}

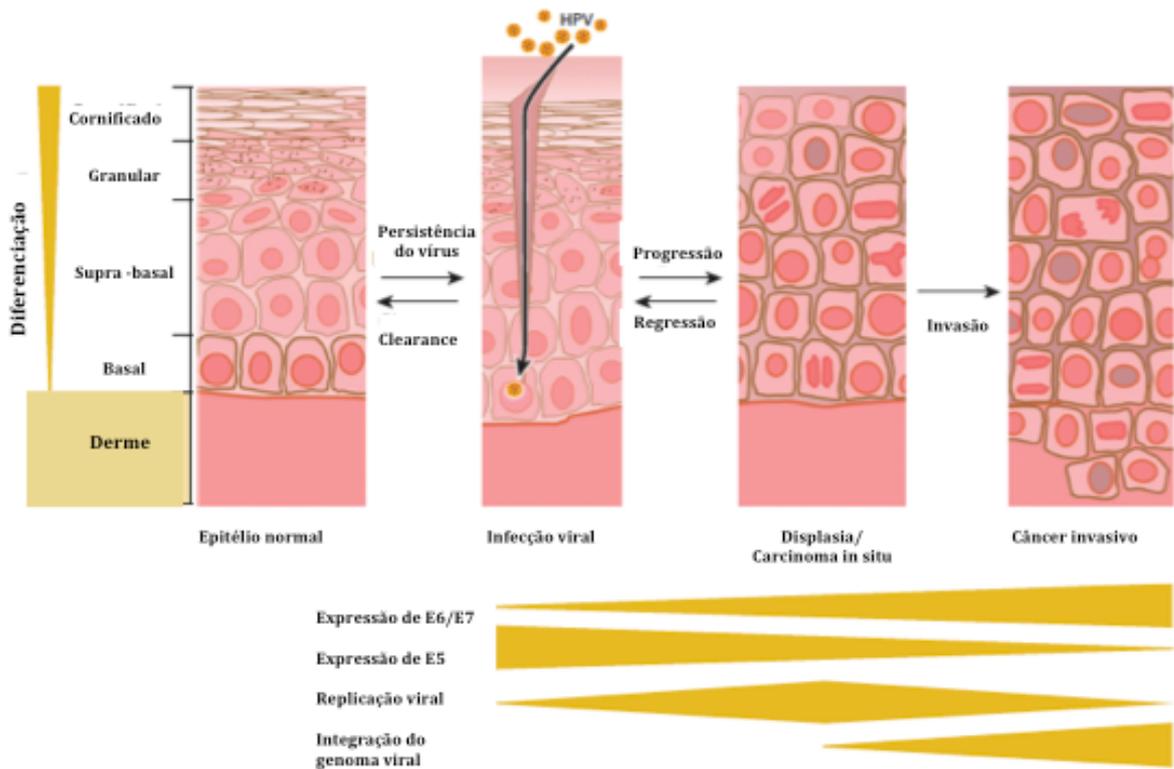


Figura 3: Infecção das células epiteliais pelo HPV.¹¹⁵

A mais importante interação da oncoproteína viral E6, envolve a inativação da proteína supressora tumoral p53, inibindo a apoptose. Enquanto a oncoproteína E7 do HPV, inativa o produto do gene supressor tumoral do retinoblastoma (pRb), liberando os fatores de transcrição E2F que participam da síntese de DNA na célula do hospedeiro; além de interagir

com vários fatores que regulam a proliferação celular (p21, p27, p107, p130, p600, ciclinas e quinases dependentes de ciclinas) (Figura 4).^{32, 35}

Embora, apenas essas alterações na expressão das oncoproteínas virais (E6 e E7) não sejam suficientes para formação do fenótipo maligno, elas parecem contribuir com a instabilidade genômica, facilitando o acúmulo de mutações adicionais.³⁵

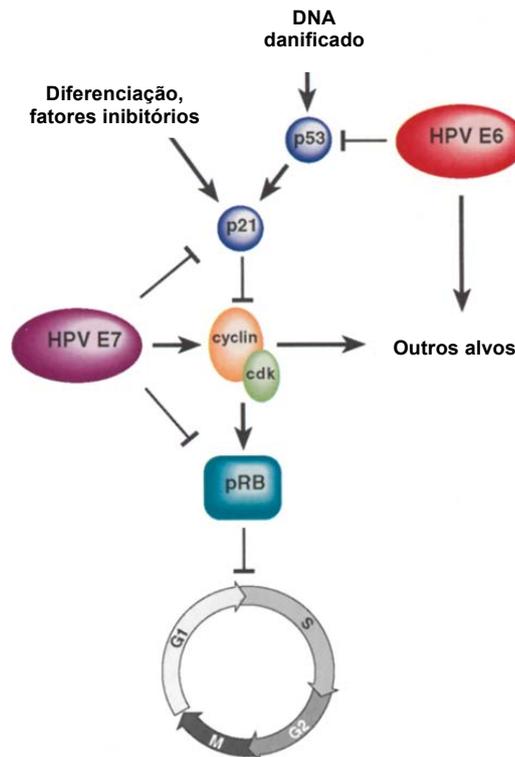


Figura 4: Oncoproteínas do HPV e seus efeitos no maquinário do ciclo celular.³⁵

Considerado o mais importante fator de risco para o CCU, apenas a presença do HPV não é suficiente, sendo necessário outros co-fatores como: tempo prolongado de infecção, variante de alto risco, carga viral alta, imunossupressão, deficiências imunológicas, tabagismo e doenças sexualmente transmissíveis associadas.¹¹⁶

1.5 ASSOCIAÇÃO DO HPV COM O CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE ESÔFAGO

Sugerido inicialmente em 1982 por Syrjänen et al., só nas últimas duas décadas tem-se discutido o papel do HPV no desenvolvimento do CCEE.^{117, 118} Acevedo-Nuno et al.

relataram taxas superiores de infecção por HPV em amostras de esôfago de Barret quando comparadas à esofagite (96% versus 26%), e taxas inferiores em amostras de neoplasias avançadas (88%). De acordo com esses dados, o HPV participaria na carcinogênese quando as células apresentassem diferenciação próxima do normal, possibilitando a replicação viral. Entretanto, quando essas células adquirissem um fenótipo maligno, o micro-ambiente tornava-se hostil para a replicação do HPV.¹¹⁹

Como citado anteriormente, outras neoplasias, além do CCU, tiveram a associação com infecção por HPV estabelecida, como cânceres do ânus, do pênis, da vagina, da vulva e da orofaringe.¹²⁰ Freddy Sitas et al. estudaram a relação da soro-positividade para Anti-HPV 16 IgG (Ac) e câncer de colo de útero, anogenital, orofaringe, próstata e esôfago em pacientes negros da África do Sul, encontrando uma significativa associação com CCEE (OR para níveis médios de Ac= 1,3; e para altos níveis de Ac=1,6; p=0,002).¹²¹ No entanto, apesar do epitélio do esôfago ser identificado como um dos sítios susceptíveis à infecção por esse vírus, o seu envolvimento na carcinogênese do CCEE ainda não está totalmente esclarecido. A incidência de infecção por HPV em pacientes com CCEE varia entre áreas de baixa e alta incidência para esta neoplasia, havendo uma grande variabilidade entre os métodos empregados nos diferentes estudos que procuraram identificar a infecção pelo HPV relacionada com o câncer esofágico.^{10, 122}

Em 2002, Syrjänen publicou uma revisão dos estudos realizados de 1982 a 2001, investigando a associação do HPV com tumores de células escamosas benignos e malignos no esôfago. A associação com lesões benignas foi de 21,3% em 29 estudos que utilizaram diferentes técnicas de detecção do HPV, em um total de 239 papilomas de células escamosas de esôfago. Em relação a associação com CCEE, 1.485 casos haviam sido analisados por hibridização *in situ*, onde 22,9% foram positivos para HPV, e 2.020 casos por reação em cadeia da DNA-polimerase (PCR), com 15,2% de positividade.¹²³

No estado do Rio Grande do Sul, foram realizados dois estudos relacionados à associação do HPV com CCEE, com resultados distintos, provavelmente atribuídos às diferentes técnicas utilizadas para detecção do HPV. O primeiro foi publicado em 2003 por Weston e Prolla, que utilizaram a técnica de Captura Híbrida II (CHII) em 40 pacientes com CCEE, e identificaram uma frequência de 2,5% de HPV nos indivíduos com CCEE, e 10% no grupo controle, constituído de indivíduos com mucosa esofágica normal ao exame endoscópico do trato digestivo superior.¹²⁴ O segundo estudo, realizado por Damin et al. em 2006, utilizou *auto-nested* PCR e encontrou 15,75% de DNA HPV em 165 biópsias de

CCEE, e ocorrência nula nas amostras do grupo controle que foi constituído por 26 pacientes com sintomas dispépticos que apresentaram mucosa normal ao exame endoscópico.¹²⁵

1.6 MÉTODOS UTILIZADO PARA DETECÇÃO DO HPV NO CCEE

Em 1982, Syrjänen encontrou alterações epiteliais, similares àquelas encontradas em lesões condilomatosas, no estudo histológico de biópsias de CCEE, sugerindo o envolvimento do HPV. Posteriormente outros métodos foram utilizados para investigar essa associação tais como: a imuno-histoquímica (IHQ), a hibridização *in situ* com filtro (FISH), a hibridização “*Dot blot*”, a hibridização “*Southern blot*”; que apresentam menor acurácia e foram substituídos por técnicas de PCR.^{123, 126-133}

Foram revisados estudos publicados até fevereiro de 2012, que utilizaram PCR para identificação do DNA do HPV em pacientes com CCEE em diferentes regiões geográficas. No total, estes estudos abordaram 5.457 pacientes com CCEE, dos quais 1.391 foram positivos (25,49%) para o DNA do HPV. Os resultados entre os estudos mostraram uma variação da prevalência do DNA do HPV de 0 a 80%, e foi observada, na maioria das publicações, relação paralela da prevalência do HPV com a variação encontrada de CCEE em áreas de alto e baixo risco.^{122, 123, 125, 134-161}

Soderlund-Strand et al. compararam o teste de Captura Híbrida II com a PCR para detecção de HPV no câncer de colo de útero, encontrando sensibilidades semelhantes nesta neoplasia. Enquanto o teste da Captura Híbrida II é uma técnica biomolecular com capacidade de detectar 5.000 cópias/mL; as técnicas com PCR permitem a amplificação de pequenas porções do DNA do HPV, possibilitando, deste modo, testar amostras com menor número de células, poucas cópias virais ou DNA de qualidade inferior. Estas características tornam a técnica de PCR, embora mais cara, indicada para estudos epidemiológicos, especialmente em situações como aquelas relacionadas à associação do HPV e carcinoma de células escamosas do trato aerodigestivo superior (CTADS), onde a carga viral é comparativamente menor do que a observada no CCU.^{125, 162}

Em função do grande polimorfismo genético do HPV, opta-se por utilizar as técnicas de PCR com *primers* de consenso (MY09/MY11, GP5/GP6 ou SPF 10) que permitem a detecção da maioria dos genótipos conhecidos do vírus, e na sequência são utilizados *primers* específicos ou sequenciamento genético para detectar os tipos de HPV de alto risco que

interessam na pesquisa.¹⁶² Variações de técnicas de PCR como *nested* ou *auto-nested*, permitem a detecção de 50 cópias/uL, enquanto técnicas convencionais detectam 1.700 cópias/uL, elevando a sensibilidade de 2,8% para 65,1%, na dependência dos *primers* utilizados, e mais recentemente foi introduzida a técnica do PCR em tempo real que permite identificar cargas virais inferiores a 50 cópias.^{125, 146, 163, 164}

2 JUSTIFICATIVA

Diversos estudos epidemiológicos sobre a associação de HPV e CCEE têm sido realizados em regiões de alta incidência para esta neoplasia, como China, Irã, Colômbia e Chile. No Rio Grande do Sul, onde encontram-se taxas elevadas de CCEE, foram realizados somente dois estudos com o objetivo de investigar a associação desta neoplasia com o HPV, cujos resultados foram conflitantes, além disso, esses estudos utilizaram técnicas distintas, PCR e CHII, havendo a possibilidade dos resultados negativos obtidos com o emprego da última serem explicados por sua menor acurácia.

Como a associação do HPV com o CCEE apresenta dados contraditórios, este estudo se propõe não só a estudar a prevalência do HPV nos indivíduos com CCEE mas também na mucosa esofágica daqueles indivíduos sob alto risco para CCEE devido ao campo carcinogênico alterado - indivíduos com CCECP. Adicionalmente, como a infecção pelo HPV é fator de risco para o desenvolvimento de CCECP, nós analisamos a presença do vírus também no tumor primário destes pacientes, considerando a possibilidade do HPV comportar-se como a causa de um tumor multicêntrico ou uma variável confundidora.

Portanto, além da meta de estudar a possível associação do HPV com CCEE e caracterizar mais um fator de risco para essa neoplasia, este estudo permitirá uma investigação da associação do HPV com as lesões precursoras do CCEE o que poderá abrir mais uma possibilidade de prevenção desta neoplasia e entendimento da sua carcinogênese.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a prevalência da infecção por HPV na lesão primária e na mucosa esofágica de pacientes com CTADS e comparar esta prevalência com a infecção em indivíduos sem fatores de risco para CTADS.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- (1) Investigar a presença do HPV na lesão tumoral e na mucosa esofágica distante do tumor em pacientes com CCEE.
- (2) Investigar a presença do HPV na lesão tumoral de pacientes com CCECP.
- (3) Investigar a presença de HPV na mucosa esofágica de indivíduos com CCECP.
- (4) Investigar a infecção por HPV nas lesões precursoras do CCEE.
- (5) Investigar a presença de HPV na mucosa esofágica de indivíduos sem fatores de risco para CCEE (não tabagistas e não alcoolistas) e com esôfago normal à EDA.
- (6) Comparar a prevalência de HPV nos indivíduos com CCEE, com a prevalência em indivíduos com CCECP, e com a prevalência em indivíduos com mucosa esofágica normal e sem fatores de risco para CCEE.

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO

Para este estudo foi planejado um delineamento transversal, onde o fator de estudo foi o diagnóstico histológico e o desfecho, a presença ou a ausência da infecção pelo HPV.

Questão da Pesquisa: Existe associação do HPV com o CCEE e suas lesões precursoras?

Hipótese: O HPV está presente na mucosa esofágica dos pacientes com CCEE e nas lesões precursoras do CCEE nos pacientes com CCECP.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra foi constituída por biópsias de pacientes maiores de 18 anos, com diagnóstico histológico de CCEE e CCECP e pacientes com mucosa esofágica normal e sem fatores de risco (não tabagistas e não alcoolistas) para CTADS submetidos à EDA no Serviço de Gastroenterologia do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), durante o período de 2008 a 2011. Além de amostras de mucosa esofágica de pacientes submetidos à esofagectomia para CCEE no HUSM, neste mesmo período.

4.3 PROCESSO DE AMOSTRAGEM

Foram incluídas biópsias dos pacientes que preencheram os critérios de inclusão e concordaram em participar do estudo, e amostras de pacientes com diagnóstico de CCEE, provenientes de esofagectomias; divididos em três grupos:

GRUPO 1 - Pacientes com CCEE

Pacientes com diagnóstico endoscópico de neoplasia esofágica com confirmação histológica de carcinoma de células escamosas, e peças de esofagectomias armazenadas no Serviço de Patologia do HUSM.

GRUPO 2 - Pacientes com CCECP

Pacientes com diagnóstico prévio de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço provenientes do Serviço de Hemato-Oncologia e submetidos à EDA no Serviço de Gastroenterologia do HUSM.

GRUPO 3 - Pacientes sem fatores de risco para CCEE

Adultos sem fatores de risco para CCEE submetidos à EDA para esclarecimento de queixas dispépticas e que apresentaram mucosa esofágica normal ao exame endoscópico. Estes pacientes foram oriundos dos Serviços de Gastroenterologia de Santa Maria.

- a) Idade superior a 18 anos.
- b) Indivíduos sem história de tabagismo ou que tenham deixado de fumar há mais de 10 anos.
- c) Indivíduos sem história de consumo regular de álcool ou em abstinência há mais de 10 anos, e com consumo estimado menor que 20g álcool/semana.
- d) Ausência de neoplasias malignas de qualquer sítio (exceto câncer de pele do tipo não-melanoma) atuais ou com término do tratamento há menos de 1 ano.

4.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- 1) Pacientes com diagnóstico recente de neoplasia de qualquer natureza (exceto câncer de pele do tipo não-melanoma), em tratamento ou com término do tratamento há menos de 1 ano.
- 2) Pacientes com imunossupressão primária ou adquirida, incluindo aqueles em uso de imunossupressores.
- 3) Pacientes com alergia a iodo.
- 4) Biópsias com material insuficiente ou inadequado para o estudo histológico ou para realização de PCR.

4.5 MÉTODOS

4.5.1 Obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Quando identificados pacientes elegíveis para a pesquisa no ambulatório do Serviço de Gastroenterologia, após esclarecimentos sobre os objetivos da pesquisa e obtenção do TCLE por escrito, os mesmos responderam ao questionário (Apêndice 1) para obtenção de dados demográficos e clínicos para identificação de possíveis fatores de risco. Nos casos em que foram utilizadas amostras de peças de esofagectomia, esses dados foram obtidos a partir dos registros no prontuário do paciente (Grupo 1).

4.5.2 Procedimentos Endoscópicos

A endoscopia foi realizada com o paciente em jejum de 10-12h, em ambiente hospitalar, após anestesia local da faringe com lidocaína spray 10% e sedação com midazolam endovenoso associado ou não à petidina.

Sempre que possível foi realizado estudo endoscópico completo do esôfago, estômago e duodeno, com as biópsias convencionais dentro do protocolo assistencial das lesões identificadas. Após a conclusão do exame endoscópico, no GRUPO 2, foi aplicado aproximadamente 20 ml de solução de Lugol a 2% na mucosa esofágica de todos os pacientes e realizadas as biópsias referentes ao protocolo de pesquisa.

No GRUPO 1 (CCEE), foram analisadas também, amostras de esofagectomias emblocadas em parafina, da neoplasia e da margem proximal do esôfago.

No GRUPO 2 (CCECP), foram realizadas biópsias esofágicas de áreas não coradas pela solução de Lugol, com diâmetro maior que 5 mm, e de outra área corada no esôfago médio. Pacientes com coloração uniforme do esôfago ou que apresentaram áreas não coradas menores que 5 mm, foram submetidos à biópsia do esôfago médio entre 25 e 30 cm da arcada dentária superior. Destes pacientes foram também obtidas biópsias do tumor primário.

Nos pacientes do GRUPO 3, foram biopsiadas áreas do esôfago médio entre 25 e 30 cm da arcada dentária superior.

Todos os fragmentos foram fixados em formalina e armazenados em blocos de parafina.

4.5.3 Análise do material:

4.5.3.1 Análise histológica:

As lâminas foram coradas pelo método da Hematoxilina/Eosina e analisadas por dois patologistas independentes. Os resultados finais foram classificados nas seguintes categorias:

- a) Mucosa normal.
- b) Esofagite - presença de infiltrado linfoplasmocitário no epitélio e/ou na lâmina própria da mucosa, associado com elevação na altura das papilas (>67%) e espessamento da camada basal do epitélio (>15%). As esofagites são classificadas como leves, moderadas e acentuadas, de acordo com o grau de infiltrado linfoplasmocitário encontrado no epitélio e/ou na lâmina própria.
- c) Displasia - presença de células com núcleos hiper cromáticos e aumentados em volume em relação ao restante da célula. As displasias em grau mais leve estariam restritas à camada basal do epitélio e as mais acentuadas estender-se-iam por toda a espessura do epitélio, com presença freqüente de mitoses, havendo preservação da lâmina própria. Procurando minimizar a variabilidade inter e intra-observadores, as displasias são graduadas em baixo e alto grau. As displasias leves são classificadas como displasias de baixo grau e as displasias moderadas e acentuadas, como displasias de alto grau.
- d) Carcinoma - presença de células com acentuado pleomorfismo, com núcleos volumosos, ocupando a maior parte da célula com contornos irregulares e hiper cromasia. Presença freqüente de mitoses e invasão através da lâmina própria. Quando limitados à camada epitelial, sem ultrapassar a camada basal serão classificados como carcinoma *in situ*. Serão categorizados em relação ao grau histológico em: bem-diferenciado, moderadamente diferenciado, pobremente diferenciado, indiferenciado e não-definido.

4.5.3.2 Diagnóstico molecular da infecção por HPV

4.5.3.2.1 *Extração do DNA*

O material encaminhado para avaliação por PCR foram amostras de esofagectomias, biópsias esofágicas e biópsias dos CCECPs, emblocadas em parafina. Do tecido fixado em formalina e parafinado foram obtidos, com o emprego de micrótomo histológico, cortes de 5 µm de espessura, respeitando-se o protocolo para controle de contaminação cruzada. Os

cortes passaram pelo processo de desparafinação antes da extração do DNA. Foi realizada extração de DNA usando o QIAamp DNA Mini Kit (50) Cat # 51304 (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação do DNA e a análise de sua pureza foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (ThermoScientific).

A integridade do DNA das amostras foi verificada pela amplificação dos genes conservados humanos GAPDH, β -globina e G3PDH.

Em função do risco de contaminação cruzada entre as amostras e, conseqüentemente, resultados falso positivos, foram respeitadas rigorosamente recomendações como:

- a) áreas físicas de pré-PCR e pós-PCR separadas e com fluxo único de material;
- b) material utilizado no processamento da amostra armazenada em bloco de parafina é totalmente descartável e de uso único por amostra;
- c) todas as reações de PCR incluíam uma reação em branco que continha todos os reagentes, exceto o DNA;
- d) todos os exames de PCR continham um controle negativo e um controle positivo;
- e) todo acesso entre salas é feito por ante-câmaras;
- f) na sala de pós-PCR todas as reações foram preparadas em uma cabine de fluxo laminar com luz ultra-violeta;
- g) semanalmente, amostras foram selecionadas e re-testadas para avaliar a qualidade do processo.

4.5.3.2.2 *Amplificação do DNA*

Foram utilizados os *primers* de consenso, MY09/MY11 e GP5/GP6, em uma *nested* PCR, para a amplificação do gene L1, com intenção de examinar a presença de DNA de HPV *sp* nas amostras parafinadas. O sistema MY09/MY11 amplifica 450 pb e apresenta maior sensibilidade para alguns tipos específicos de HPV.^{165, 166} Já o par de *primers* GP5/GP6 amplifica em torno de 150 pb, ou seja, fragmentos mais curtos de DNA do HPV, aumentando a sensibilidade da PCR em amostras de DNA degradado pelo processo de fixação com formol e pelo armazenamento em parafina. A técnica de *nested* PCR consiste na realização da PCR em duas etapas, onde o produto da amplificação da primeira etapa é usado na segunda. Assim, os oligonucleotídeos utilizados na segunda etapa apresentam menor chance de anelamento com sequências inespecíficas em função da redução do tamanho do molde. As sequências utilizadas para os *primers* foram: MY09/11 – CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC / GCM

CAG GGW CAT AAY AAT GG e GP5/6 – TTT GTT ACT GTG GTA GAT AC / ACT AAA TGT CAA ATA AAA AG.¹⁶⁷

A mistura prévia da primeira etapa da PCR foi composta por 32,9 uL de H₂O Milli-Q, 5,0 uL de 10 x PCR Rxn Buffer, 5,0 uL de dNTP (2,5 mM), 1,2 uL de MgCl₂ (50 mM), 0,2 uL do primer MY09 (500 pmol/uL) e 0,2uL do primer MY11 (500 pmol/uL), com um volume final de 44,5 uL. A mistura para a segunda reação foi composta por 31,3 uL de H₂O de injeção, 5,0 uL de 10 x PCR Rxn Buffer, 5,0 uL de dNTP (2,5mM), 1,2 uL de MgCl₂ (50 mM), 1,0 uL do *primer* GP5 (500 pmol/uL) e 1,0 uL do *primer* GP6 (500 pmol/uL), com um volume final de 46,1 uL. Todas as amostras, de todos os pacientes, foram usadas em duplicata. O volume de mistura prévia foi calculado de acordo com o número de amostras que seriam testadas, com quatro reações a mais, uma para o controle positivo (amostra positiva para HPV), duas para os controles negativos (amostra negativa para HPV- Human Genomic DNA, Cat. no. G304A, Promega, Madison, WI, USA - e mistura contendo todos os reagentes da PCR com exceção do DNA), além de outra reação como sobra. À mistura prévia da primeira etapa foi adicionado 0,5 uL de Taq DNA Polymerase e 5,0 uL de DNA, sendo que a concentração do DNA usada variou de 25 a 80 ng/uL.

A mistura da PCR foi submetida, na primeira etapa da *nested* PCR, a 40 ciclos de amplificação, que consistiram em uma fase inicial de desnaturação à 94C° por 30 segundos, anelamento à 56C° por 1 minuto e prolongamento por 1 minuto à 72C°. Após a transferência de 5uL do produto da primeira etapa de amplificação, procedeu-se a segunda etapa com o mesmo perfil de temperaturas no termociclador. Os produtos da PCR foram detectados por eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio e visualizados por transiluminador ultravioleta (UV), onde seria verificada a amplificação do DNA pela existência de banda única de 452 pb na primeira etapa e 150 pb na segunda etapa da PCR. Com capacidade de detectar em torno de, no mínimo, 1 a 10 cópias de DNA de genoma do HPV-16.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

4.6.1 Cálculo do tamanho da amostra

Considerando a metanálise realizada por Syrjänen et al. em 2002¹²³, e o estudo realizado por Kreimer et al. em 2005²⁵, que encontraram respectivamente, prevalências de

HPV em 15,2% das amostras de CCEE, e 25,9% em CCECP analisadas por PCR; estimamos o tamanho da amostra para os três grupos, com um α de 0,05 e um poder de 80% para identificar 15% de diferença mínima entre prevalências nos grupos 1 e 3, e de 25,9% nos grupos 2 e 3, em:

- a) Biópsias de CCEE (GRUPO 1): 51
- b) Biópsias de CCECP (GRUPO 2): 26
- c) Biópsias esofágicas de pacientes sem fatores de risco para CTADS (GRUPO 3): 51

Para este cálculo foi utilizado o programa Compare2 versão 1.80.

4.6.2 Análise estatística dos resultados

A análise estatística dos dados obtidos foi efetuada através do software SPSS 11 (*Statistical Package for the Social Sciences*). As variáveis quantitativas (idade e concentração de DNA) foram descritas através de média e DP; e as qualitativas (sexo, condição tabágica e alcoólica, diagnóstico histológico, grau histológico, localização do CCEE e do CCECP) em percentuais. A unidade de pesquisa considerada foi a amostra de tecido obtida de biópsia endoscópica ou de peça de esofagectomia dos pacientes. As variáveis em estudo foram: o diagnóstico histológico - mucosa normal, esofagite, displasia de baixo grau, displasia de alto grau/carcinoma *in situ*, carcinoma - e a identificação do HPV na PCR. Foi planejada a utilização dos testes do qui-quadrado ou exato de Fisher, quando adequado, para analisar a associação entre a infecção por HPV e os achados histológicos. Projetou-se calcular a razão de chances para estimar o risco da ocorrência da infecção pelo HPV em relação ao diagnóstico histológico. Foi estabelecido $p \leq 0,05$ para considerar os resultados significativos.

4.7 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os pacientes com suspeita de CCEE foram submetidos à EDA e à biópsia da lesão esofágica como rotina de sua investigação. Os pacientes com CCECP apresentavam indicação formal de endoscopia devido ao maior risco de desenvolverem CE sincrônico, e a EDA com cromoendoscopia com Lugol é procedimento indicado para a identificação de lesões precursoras ou carcinoma precoce multifocal. Portanto para os pacientes dos GRUPOS 1 e 2 não existiu acréscimo de risco com a pesquisa proposta e no GRUPO 2 houve benefício com a probabilidade de diagnóstico precoce de lesões assintomáticas, o que ocorreu em um caso.

Os pacientes do GRUPO 3 foram submetidos à EDA para esclarecimento de seus sintomas dispépticos. Para estes pacientes foi solicitado consentimento para realização de biópsias esofágicas.

De acordo com as normas para pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Pesquisa, os procedimentos, endoscopia digestiva alta e biópsia de mucosa esofágica, são consideradas como sendo de risco mínimo para o paciente, e estes procedimentos foram realizados em ambiente cirúrgico ambulatorial com as devidas condições de sedação, recuperação e atendimento de possíveis intercorrências. Os exames endoscópicos foram realizados por médicos endoscopistas do HUSM com comprovada experiência no método.

Os pacientes foram informados dos objetivos da pesquisa, e dos procedimentos a que seriam submetidos e foi obtido o consentimento livre esclarecido. Foi respeitada a recusa do paciente, não sendo omitido para o mesmo, no âmbito assistencial, qualquer procedimento diagnóstico ou terapêutico necessário.

Os dados foram analisados de forma agregada, com informações pessoais mantidas em sigilo, e os pesquisadores se comprometeram através do Termo de Confidencialidade.

4.8 LOGÍSTICA

Após a revisão da literatura, cálculo do tamanho da amostra e aprovação do projeto pelos comitês de ética da UFSM e da UFRGS, foi realizado o treinamento das pessoas envolvidas nesta pesquisa.

Entre os pacientes previamente agendados para realização de EDA no ambulatório de gastroenterologia, foram identificados indivíduos que poderiam preencher os critérios de inclusão no estudo (Apêndice C). Após os pacientes receberem as informações e esclarecimentos referentes à pesquisa, foram aplicados o TCLE e o questionário (dados demográficos, hábitos e história patológica pregressa). Mediante o aceite do paciente em participar do estudo, e não havendo nenhum critério de exclusão, o endoscopista, identificava durante a EDA o grupo a que o paciente seria incluído. Foram então realizadas a aplicação de Lugol quando indicado (grupo 2) e as biópsias necessárias para cada grupo de pacientes. As biópsias foram encaminhadas para o serviço de patologia do HUSM para realização do exame histopatológico pelo patologista.

No grupo 1 foram também incluídas amostras de esofagectomia de pacientes com diagnóstico de CCEE, identificados através do registro do Serviço de Patologia do HUSM.

Após a revisão dos registros médicos de cada um destes pacientes, foram selecionados apenas aqueles com as informações necessárias para a posterior análise e cujas amostras do tumor e da mucosa esofágica normal foram localizadas no arquivo do Serviço de Patologia.

Todas as amostras armazenadas em blocos de parafina foram encaminhadas para o Laboratório Progenética no Rio de Janeiro, onde acompanhamos todas as etapas da análise com PCR. Inicialmente cada amostra foi revisada por um segundo patologista que, após confirmação do diagnóstico, localizou áreas de tecido não-necrótico para extração do DNA. Então, um novo corte foi realizado no bloco e encaminhado para a área de extração do DNA, onde foi também realizada a sua quantificação. Desta área, a amostra foi encaminhada para área própria para a realização da PCR, por biólogo experiente. O produto da PCR foi então submetido à leitura da amplificação através de eletroforese em gel de agarose, em área física específica no laboratório.

Foi realizada a análise estatística dos dados obtidos através dos questionários ou registros médicos de cada paciente, dos resultados dos exames histopatológicos e das PCRs.

5 RESULTADOS

5.1 PACIENTES – CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS E IDENTIFICAÇÃO DO GRUPO

Foram incluídos neste estudo 125 indivíduos distribuídos nos três grupos da seguinte forma: 51 pacientes no grupo 1 (CCEE), 37 pacientes no grupo 2 (CCECP) e 37 pacientes no grupo 3 (não tabagistas e não alcoolistas). Apenas 2 indivíduos não foram incluídos, um paciente HIV positivo no grupo 1, e um indivíduo que se recusou a participar e que seria alocado no grupo 3.

As médias das idades nos três grupos foram semelhantes: $60,06 \pm 10,29$ anos para o grupo 1, $57,76 \pm 8,36$ anos no grupo 2 e $56,76 \pm 17,72$ anos no grupo 3.

Em relação ao sexo, os pacientes com CCEE e CCECP foram predominantemente homens (84,3% e 91,9%, respectivamente). Enquanto que no grupo 3, houve uma predominância de mulheres (67,6% mulheres e 32,4% de homens).

No grupo do CCEE, 33 pacientes eram tabagistas ativos, 9 haviam parado de fumar há menos de 10 anos, 5 há mais de 10 anos e 4 nunca haviam fumado. Entre os pacientes com CCECP todos fumaram em alguma época da vida, 25 eram tabagistas ativos, 10 pararam de fumar há menos de 10 anos, 2 pararam há mais de 10 anos (Tabela 1).

Alcoolismo ativo, definido como consumo diário de 40 gramas de etanol por mais de 5 anos, foi observado em 19 pacientes com CCEE, enquanto 8 pacientes estavam em abstinência há menos de 10 anos, 8 há mais de 10 anos e 16 não consumiam bebidas alcoólicas regularmente. No grupo do CCECP, 21 pacientes eram alcoolistas, 10 estavam em abstinência há menos de 10 anos, 2 há mais de 10 anos e 4 não consumiam álcool ou o faziam esporadicamente.

No grupo do CCEE, 3 pacientes apenas não foram nem tabagistas e nem alcoolistas durante a vida, por outro lado, 48 pacientes foram expostos a pelo menos um destes fatores de risco em algum momento. Tabagismo e etilismo ativos e concomitantes foram observados em 18 pacientes deste grupo.

No grupo do CCECP, tabagismo e etilismo ativo concomitante foi observado em 18 pacientes, e todos os 37 pacientes foram expostos a pelo menos um destes fatores de risco durante a vida.

De acordo com os critérios de inclusão do estudo, nenhum dos pacientes do grupo 3

eram tabagistas ou consumiam bebidas alcoólicas de forma regular.

Tabela 1. Características clínicas e demográficas e fatores de risco dos pacientes

	CCEE n=51 (%)	CCECP n= 37(%)	Não expostos n=37(%)
Idade			
Variação	42-79	41-78	19-87
Média	60,06	57,76	56,76
Sexo			
Masculino	43 (84,31)	34 (91,89)	12 (32,43)
Feminino	8 (15,68)	3 (8,10)	25 (67,56)
Tabagismo			
Corrente	33 (64,70)	25 (67,56)	-
Ex-tabagistas			
Tempo desde término (anos)			
<10	9 (17,64)	10 (27,02)	-
>10	5 (9,80)	2 (5,40)	10 (27,02)
Nunca fumaram	4 (7,84)	0 (0)	27 (72,97)
Alcoolismo			
Corrente	19 (37,25)	21 (56,75)	-
Alcoolistas em abstinência			
Tempo de abstinência (anos)			
<10	8 (15,68)	10 (27,02)	-
>10	8 (15,68)	2 (5,40)	2 (5,40)
Nunca foram alcoolistas	16 (31,37)	4 (10,81)	35 (94,59)
Tabagistas e alcoolistas ativos	18 (35,29)	18 (48,64)	-
Nunca fumaram e beberam	3 (5,88)	0 (0)	26 (70,27)

CCEE: carcinoma de células escamosas de esôfago; CCECP: carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço

5.2 ACHADOS ENDOSCÓPICOS E HISTOPATOLÓGICOS

No grupo 1, foram analisadas 51 amostras de CCEE e 51 amostras de mucosa esofágica normal e distante do tumor. No grupo 2, dos 37 pacientes foram analisadas 35 amostras do tumor primário armazenadas em parafina, com duas perdas por material insuficiente. Foram estudadas 37 biópsias de áreas coradas do esôfago médio, porém 5 foram excluídas por apresentarem material insuficiente para análise histológica, resultando em 32 amostras. Dos 37 pacientes deste grupo, 17 apresentavam áreas descoradas pela Solução de Lugol, resultando em mais 17 biópsias. Um paciente com CCECP apresentava CCEE

sincrônico, sendo que neste, além da amostra do tumor primário de cabeça e pescoço e das áreas corada e descorada, havia mais a amostra do CCEE. E finalmente, no grupo 3, foram realizadas 37 biópsias do esôfago médio. Portanto, foram realizados 224 exames histopatológicos com as lâminas analisadas por dois patologistas independentes.

No grupo 1, os 51 pacientes apresentavam CCEE na amostra tumoral, sendo 4 do tipo basalóide, 1 caso de carcinoma superficial restrito a submucosa e 1 caso de carcinoma *in situ*. Quanto ao grau de diferenciação dos CCEE (51 casos do grupo 1 e 1 caso do grupo 2), 12 eram bem diferenciados (23,07%), 27 eram moderadamente diferenciados (51,92%), 7 eram pobremente diferenciados (13,46%), 4 eram basalóides (7,69%) e 2 não foram classificados (3,84%). Todas as amostras de mucosa esofágica distante do tumor não apresentavam neoplasia. Quanto a localização do tumor, 35 eram no esôfago inferior (67,30%), 15 no esôfago médio (28,84 %) e apenas 2 no esôfago superior (3,84%).

No grupo 2, os 37 pacientes apresentavam diagnóstico de CCECP, distribuído nos seguintes subsítios: 15 de orofaringe (40,54%), 10 de laringe (27,02%), 9 de cavidade oral (24,32%) e 3 com sítio primário indeterminado (8,10%). Os 37 pacientes foram submetidos a EDA e aplicação de Solução de Lugol. Na tabela 2 estão apresentados a localização e a diferenciação histológica observada nos grupos de pacientes com neoplasia. Foram realizadas 55 biópsias da mucosa esofágica no Grupo 2, 20 pacientes apresentaram mucosa esofágica uniformemente corada pelo lugol, e 17 pacientes apresentaram pelo menos 1 área descorada maior que 5 mm. Destes últimos foram biopsiadas além de uma área descorada, outra área corada, sendo possível análise histológica da área corada em apenas 13 destes pacientes, pois 4 biópsias apresentaram material insuficiente. Vinte e sete amostras de áreas coradas apresentaram mucosa sem alterações patológicas, 5 foram conclusivas de esofagite e 5 tinham material insuficiente para análise histológica (incluindo as 4 descritas anteriormente). Entre as amostras de áreas descoradas, 15 apresentavam mucosa sem alterações patológicas e 2 com esofagite. Um paciente apresentou lesão localizada no esôfago superior que foi conclusiva de CCEE pobremente diferenciado, além de outra área com mucosa esofágica descorada. Este mesmo paciente, apresentava esofagite na área corada e mucosa sem alterações patológicas na área descorada (Tabela 3).

Tabela 2. Localização e grau diferenciação histológica observada em pacientes com carcinoma de células escamosas de esôfago e em pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço

	CCEE n=52* (%)	CCECP n= 37(%)
Grau de diferenciação histológica		
Bem diferenciado	12 (23,07)	12 (32,43)
Moderadamente diferenciado	27 (51,92)	7 (18,91)
Pobremente diferenciado	7 (13,46)	4 (10,81)
Basalóide	4 (7,69)	0 (0,00)
Não definido	2 (3,84)	14 (37,83)
Localização do CCEE		
Inferior	35 (67,30)	-
Médio	15 (28,84)	-
Superior	2 (3,84)	-
Localização do CCECP		
Orofaringe	-	15 (40,54)
Laringe	-	10 (27,02)
Cavidade oral	-	9 (24,32)
Sítio primário indeterminado	-	3 (8,10)

CCEE: carcinoma de células escamosas de esôfago; CCECP: carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço

* 52 CCEE: 51 do Grupo 1 e 1 do Grupo 2.

Tabela 3. Histologia das biópsias da mucosa esofágica por cromo-endoscopia em pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço

Histologia	Mucosa uniformemente corada n= 20 pacientes	Mucosa com áreas descoradas n=17 pacientes		Tumoração n=1 paciente
		Corada	Descorada	
Normal	16	11	15	0
Esofagite	3	2	2	0
CCEE	0	0	0	1
Material insuficiente	1	4	0	0

CCEE: carcinoma de células escamosas de esôfago

No grupo 3, das 37 biópsias, 35 apresentaram mucosa sem alterações patológicas e 2 apresentaram esofagite.

5.3 DETECÇÃO DO HPV

Foram encaminhadas 224 amostras para extração de DNA de bloco de parafina, sendo que apenas 6 blocos (2,67%) não apresentaram DNA viável para realização da PCR (1 bloco com mucosa esofágica distante do tumor no grupo 1, 1 bloco com mucosa esofágica corada e 2 com mucosa descorada no grupo 2, e 2 blocos com mucosa esofágica normal no grupo 3). Nos 218 blocos a integridade do DNA foi comprovada pela detecção das bandas correspondentes aos genes conservados humanos: GAPDH, β -Globina e G3PDH. O DNA purificado não apresentou fatores inibitórios para análise por PCR.

A concentração de DNA obtido nas amostras apresentou uma média de 214,68 ng/uL (variação: 8 a 1.313), com uma média das razões entre as leituras das absorvâncias 260/280 de 2,12 (variação; 1,15 a 5,95).

Em nenhuma destas amostras foi detectada banda de aproximadamente 450 pb e 150 pb correspondente ao DNA do HPV com a utilização da técnica de *nested* PCR utilizando os primers MY09/11 e GP5/6 (Figura 5). Portanto, em função da ausência de DNA do HPV nas amostras, não foi realizado o sequenciamento direto para definição do tipo específico como previsto.

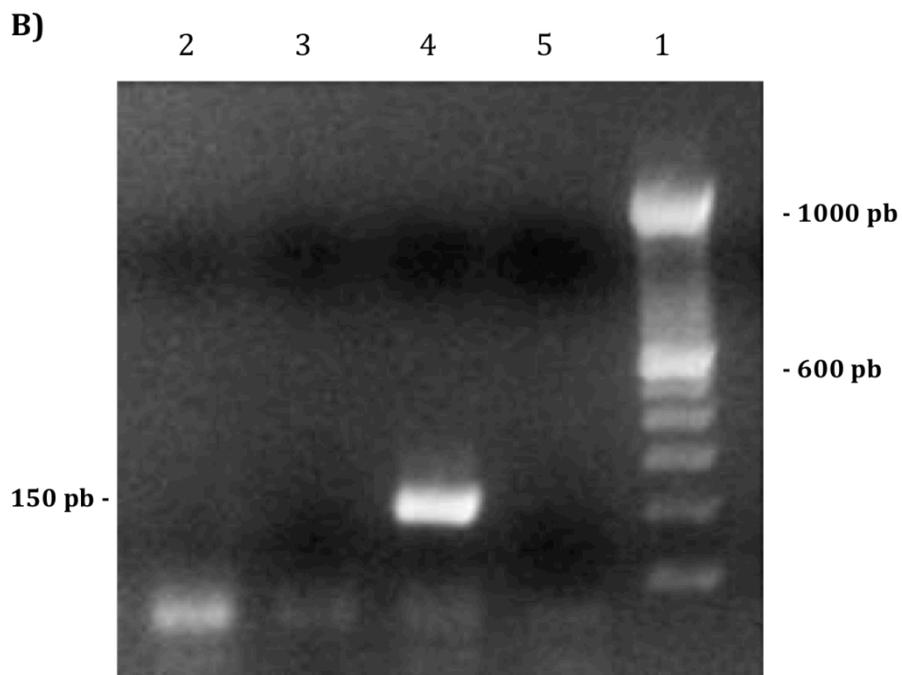
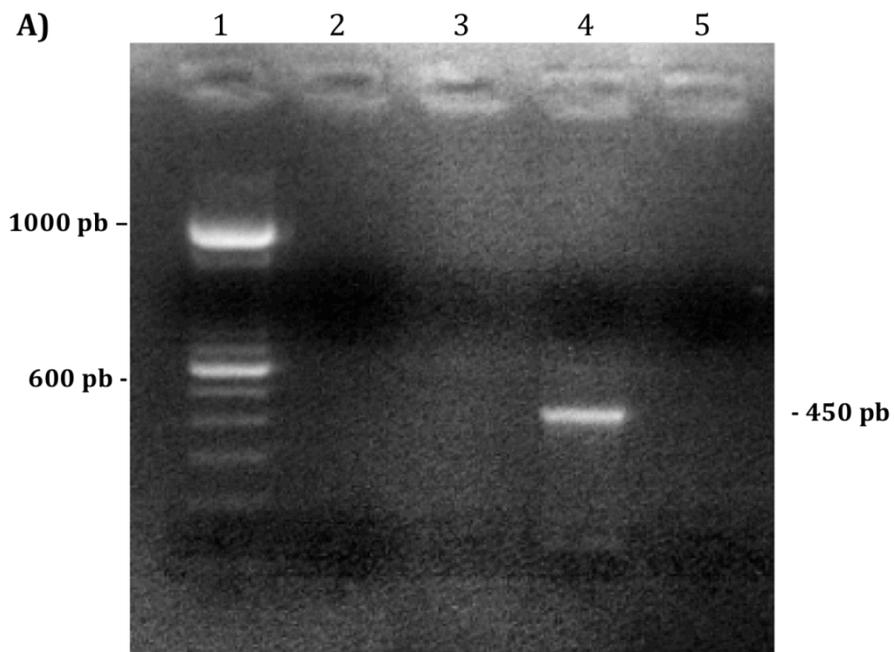


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose da amplificação do gene L1 do HPV analisado por nested-PCR, com os primers MY09/11 na primeira etapa (A) e GP05/06 na segunda etapa (B). (1) Padrão de peso molecular – 100pb; (2) DNA do paciente; (3) DNA do controle negativo; (4) DNA do controle positivo; e (5) controle negativo da reação.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo utilizou a técnica da PCR para investigar a presença de DNA do HPV em amostras de CCEE e CCECP em uma das regiões de maior risco para câncer do trato aero-digestivo superior no Brasil. Os nossos resultados não mostraram nenhuma evidência da presença do DNA do HPV em qualquer uma das amostras de CCEE e da mucosa distante do tumor, de CCECP e da mucosa esofágica do mesmo paciente, ou na mucosa esofágica de pacientes não tabagistas e não alcoolistas.

As altas taxas de incidência do CE, situa-o entre as 10 neoplasias mais frequentes no mundo. Com uma grande variação de incidência mesmo entre populações diferentes oriundas de uma mesma região, as altas taxas são reduzidas para praticamente zero em alguns locais. Como exemplo dessa variação podemos citar a região de Anyang na China, onde a taxa de mortalidade é de 132/100.000, significativamente superior a taxa de 52/100.000 encontrada nas áreas vizinhas.¹⁶⁸ A variação mundial da incidência é próxima a 16 vezes, e em áreas de alto risco, como o “cinturão asiático do câncer de esôfago”, aproximadamente 90% dos casos são de CCEE.^{1, 169, 170} Em função deste cenário, é constante e crescente o número de pesquisas com o objetivo de melhor identificar os fatores envolvidos na carcinogênese do CCEE, nem sempre explicados por fatores de risco bem definidos como tabagismo, etilismo, pobre status nutricional, baixo consumo de frutas e verduras, e ingestão de bebidas quentes.

Em áreas de baixo risco, como os EUA e vários países ocidentais, o tabaco e o consumo excessivo de álcool são responsáveis por cerca de 90% dos casos de CCEE. Nessas áreas as taxas de adenocarcinoma de esôfago tem aumentado em função da elevada prevalência de fatores de risco como obesidade e esôfago de Barrett, e a baixa prevalência de infecção por *Helicobacter pylori*.^{5, 171-175} Por outro lado, as taxas de CCEE nessas regiões têm diminuído por causa da redução do consumo de álcool e do tabaco.¹⁷⁶ No Brasil, as taxas de CCEE tem permanecido estáveis, em torno de 80%, com a região Sul do país apresentando a maior incidência.^{3, 4}

Entre as várias pesquisas que buscam explicar essa variação na taxa de incidência mundial do CCEE, dezenas de trabalhos publicados, apresentam dados conflitantes no que se refere ao papel do HPV. Conforme citado por Jill Koshiol et al., os argumentos a favor desta associação incluem: (I) a estreita proximidade e similaridade do esôfago e o epitélio escamoso da cavidade oral, onde o HPV é reconhecido como causa de cânceres de tonsila e orofaringe; (II) a existência do papiloma escamoso benigno de esôfago, potencialmente associado ao

HPV; (III) evidência para clonalidade de células tumorais esofágicas; (IV) a associação entre HPV e câncer de esôfago em bovinos; (V) a detecção de HPV em amostras de câncer esofágico e lesões precursoras; (VI) as evidências *in vitro* de transformação, induzida pelo HPV, das células esofágicas. Os argumentos contra essa relação causal incluem: (I) a ampla variação na prevalência do HPV em séries de casos de CCEE (0 a 100%); (II) a inconsistência na associação entre a exposição ao HPV (medido por sorologia) e CCEE, com estimativas de estudos de grande porte tendendo para a hipótese nula; (III) a falta de evidências da associação entre CCEE e hábitos sexuais, imunossupressão ou neoplasias prévias associada ao HPV.^{114, 123, 153, 177-179}

No estado do Rio Grande do Sul, onde a incidência de CCEE é a maior do Brasil, dois estudos apresentaram resultados discordantes. O primeiro estudo, publicado por Weston e Prolla em 2003, utilizou Captura Híbrida II, uma técnica de menor sensibilidade (≥ 100.000 cópias do vírus/célula) quando comparada com a PCR, e que talvez pudesse ser insuficiente para analisar amostras com baixa carga viral. Este estudo detectou a presença de DNA do HPV em 1 amostra (2,5%) dos 40 pacientes com CCEE e em 1 amostra (10%) de 10 indivíduos do grupo controle, não encontrando associação entre o vírus e o tumor.¹²⁴ O segundo estudo publicado por Damin et al. em 2006, utilizou a técnica de auto-nested PCR com os *primers* de consenso GP5+/GP6+ e *primers* tipo-específico para HPV-16 e -18, seguido por seqüenciamento das amostras positivas. Com um número maior de pacientes, os autores detectaram o DNA do HPV em 15,75% das 165 amostras de CCEE, e em nenhuma das amostras do grupo controle constituído por 26 indivíduos submetidos à EDA por queixas dispépticas. Dos 26 pacientes com CCEE e positivos para HPV, 24 pacientes continham DNA do HPV-16, 1 do HPV-18 e 1 de ambos.¹²⁵

Com o emprego de uma técnica com grande sensibilidade, o nosso estudo não detectou a presença de DNA do HPV em nenhum dos 51 pacientes com CCEE (Grupo 1), tanto no tumor quanto na área de mucosa esofágica normal e distante do tumor. Nós optamos pela técnica de *nested* PCR com MY09/11 e GP5/6 que proporciona um aumento na sensibilidade em relação ao uso isolado deles (100 cópias/genoma usando apenas MY11/09, 10 cópias/genoma usando apenas GP5/GP6, e 1 a 10 cópias/genoma para *nested* PCR com os dois pares de *primers*).¹⁸⁰ Além disso, os *primers* MY09/11 aumentam a sensibilidade em amostras com múltiplos tipos de HPV (90% para MY09/11 e 47% para GP5+/6+).^{181, 182}

Além do extremo cuidado para evitar contaminação na realização das PCRs, incluímos um grupo de pacientes com diagnóstico de CCECP, expostos aos mesmos fatores

de risco que os pacientes com CCEE na região sul do Brasil, na tentativa de avaliar a mucosa esofágica com um ambiente carcinogênico semelhante ao encontrado antes do desenvolvimento do tumor de esôfago. Considerando a possibilidade de que a presença do HPV no esôfago fosse um achado meramente incidental, nós avaliamos um grupo composto por pacientes não expostos ao tabagismo ou alcoolismo (Grupo 3), e submetidos à EDA por queixas dispépticas, no qual também não houve detecção do HPV com a mesma técnica de PCR.

Em relação ao tipo histológico, apesar de também existirem trabalhos identificando associação de HPV e adenocarcinoma de esôfago, nós optamos por investigar apenas em CCE devido a baixa prevalência de adenocarcinoma de esôfago em nossa região. A associação do HPV com adenocarcinoma do trato digestivo superior foi descrita por Xu et al. em 2003, mas não foi confirmada em estudos posteriores, tanto por sorologia quanto por PCR.^{179, 183, 184} No nosso estudo, entretanto, havia um caso com componentes de adenocarcinoma e de CCE, e que apresentou PCR negativo para HPV. Considerado como uma variante rara dos CCE, o carcinoma adenoescamoso é descrito em uma variedade de sítios, incluindo colo de útero, pulmão, pâncreas, e cabeça e pescoço (CP). Apresenta maior agressividade e a sua associação com HPV não é definida na literatura. Conforme os resultados de Masand et al., a presença de HPV nos carcinomas adenoescamosos de CP e a sua agressividade, parece estar mais relacionada com o subsítio (orofaringe) do que com o tipo histológico, o que já é reconhecido para as outras variantes histológicas de CCE.^{185, 186}

Entre os 51 pacientes com CCEE, havia 4 do tipo basalóide, descrito como apresentando uma maior associação com o HPV em relato publicado por Zoltán et al.¹⁴⁷ Este tipo histológico foi primeiramente descrito por Wain em 1986 e ocorre predominantemente no TADS.¹⁸⁷ No entanto, no esôfago é um tumor raro, responsável por apenas 0,068 a 4% de todos os CE.¹⁸⁸ Por outro lado, a morfologia basalóide é descrita como significativamente mais frequente nos CCECP associados ao HPV (OR=19,8; 95% IC= 5,3-7,4), sendo essa associação evidenciada, também, em modelo animal.^{20, 189-191} O mesmo é visto em outros sítios de tumores associados ao HPV como, câncer de canal anal, pênis, vulva e vagina.¹⁹²⁻¹⁹⁶ Entretanto, todos os 4 casos de CCEE do tipo basalóide que analisamos foram negativos para DNA de HPV, corroborando com o resultado apresentado por Bellizzi et al. que avaliaram 9 casos que foram negativos para HPV por imuno-histoquímica.¹⁹⁷

Quanto a localização dos CCEE, em um estudo recentemente publicado por Gupta et al. utilizando PCR com os *primers* MY09/11, foi detectado DNA de HPV em 17 de 44 casos

de CCEE (38,6%), sendo todos esses casos positivos localizados no esôfago inferior.¹⁵⁷ É bem conhecido que o HPV infecta a camada basal do epitélio escamoso estratificado que é comumente exposto à junção escamo-colunar, como a zona de transformação do colo do útero e a região tonsilar na orofaringe. A extremidade inferior do esôfago também tem uma área de junção escamo-colunar, e em função da presença de dois epitélios distintos, torna-se uma área propensa à inflamação, à formação de um microambiente favorável à expansão de células tronco e à transformação celular, como sugerido por modelos com animais. Dessa forma, essa região representaria um local chave para a formação de tumor por acúmulo de mutações genéticas ou transformação viral.^{157, 198} Dos 51 pacientes com CCEE analisados no nosso estudo, a grande maioria situava-se no esôfago inferior (68,62%), porém todos foram negativos para HPV.

Também consideramos a possibilidade de resultados falsos negativos devido à presença de carga viral inferior a detectável pelo nosso conjunto de *primers*. Entretanto, o papel na carcinogênese e o significado clínico de quantidades de vírus inferiores a detecção pela PCR é duvidoso.¹⁹⁹ Ha et al. sugerem que sem ao menos 1 cópia viral por genoma, uma relação clonal não pode ser estabelecida, necessitando, portanto, um número suficiente de cópias de HPV afetando a maioria das células em uma lesão.²⁰⁰ Dessa forma, a técnica de nested PCR com MY/GP, por nós utilizada, é capaz de detectar 1 a 10 cópias de genoma do HPV-16 como descrito por Evander et al.¹⁸⁰ Si et al. utilizaram a técnica de PCR em tempo real para quantificar o número de cópias de HPV-16 e HPV-18 em CCEE de 5 diferentes regiões da China que apresentavam diferentes taxas de incidência desta neoplasia. A presença de DNA de HPV nas amostras variou de 2 a 22,2%. O número de cópias de HPV-16 variou de ≤ 1 até 157 cópias/genoma equivalente, sendo que 65% das amostras possuíam menos de 10 cópias/genoma equivalente. As médias nas amostras em tecido fresco congelado foram de 1,14 em Hong Kong, 11,7 em Sichuan e 21,4 em Linxian. As amostras armazenadas em parafina de Xi'an e Shantou, tiveram médias de 0,004 e 14,6, respectivamente. Para o HPV-18, a média do número de cópias foi de 4,9/genoma equivalente. E os autores então sugerem que o número de cópias de HPV relativamente baixo, assim como as baixas taxas de infecção do HPV nas amostras de CCEE, tornam improvável que o vírus tenha um papel essencial na carcinogênese do CCEE.¹⁴⁶

Em 2010 foi publicado, por Zhang et al., um estudo de caso-controle que incluiu 70 casos de CCEE com 60 controles, e 39 casos de CCEU com 54 controles provenientes da região de Shantou na China. A distribuição nestes grupos das taxas de HPV (tipos -16, -18 e -

58), carga e integração viral, foram comparadas utilizando PCR em tempo real. As taxas de detecção do DNA do HPV nas amostras de CCEE e CCU foram significativamente maior do que nos seus controles: 50% vs 33,33% para CCEE, $p=0,045$; e 79,48% vs 18,52% para CCEU, $p<0,001$. A carga viral média do HPV-16 no CCEU foi aproximadamente 141,68 vezes maior do que nos CCEE (468,39 +/- 473,36 vs 2,55 +/- 3,19 cópias/célula, $p=0,002$). E para avaliar o grau de integração do DNA viral foi calculada a média da razão de E2 para E6/7 para cada grupo, onde, os CCEU apresentaram uma significativa menor razão média de E2 para E6/7 em relação ao grupo controle (0,09+/- 0,14 vs 0,55+/- 0,40, $p<0,001$), indicando uma alta prevalência de DNA do HPV na forma integrada em pacientes com CCEU. O mesmo não ocorreu no grupo do CCEE, onde as taxas foram semelhantes ao grupo controle (0,20+/-0,32 vs 0,53+/-0,33, $p=0,06$). Os autores então sugerem que apesar da baixa carga viral nos CCEE, a integração do genoma viral e a alta expressão de sua oncoproteína, poderiam ser suficientes para promover a carcinogênese. No entanto, eles concluem que em função dos relativamente baixos números de cópias de HPV e baixas taxas de infecção em CCEE, parece improvável que exerçam um papel fundamental na carcinogênese do esôfago como ocorre no colo do útero.¹⁵² Gillison e Shah, ao discorrer sobre as características do HPV em uma revisão sobre o papel do vírus em cânceres não-genitais publicada em 2003, sugerem que o DNA viral de alto risco ocorre na célula tumoral com um mínimo de 1 cópia viral/genoma, é transcricionalmente ativo, e é frequentemente, embora nem sempre, integrado.¹¹⁴

O uso de *primers* de consenso como o que usamos, cujo alvo é o gene L1 do HPV, é questionado por alguns autores uma vez que este gene não é necessariamente retido após a integração do DNA do HPV com o DNA humano. Embora estes *primers* possam detectar possivelmente todos os tipos de HPV.¹⁶⁷ Por outro lado, *primers* específicos cujo alvo são os genes E6 e E7, são retidos após a integração do DNA do HPV, no entanto, eles detectariam apenas determinados tipos de HPV. E, além disso, análises do status viral utilizando RT-PCR demonstrou que, em geral, genomas de HPV-16 exclusivamente integrados são um fenômeno infrequente tanto em lesões de carcinoma *in situ* no colo do útero (8,7%), quanto em CCU (15,2%). Sendo as formas episossomal (61,9% em CISCU e 39,1% em CCU) ou mista - episossomal e integrada (29,4% em CISCU e 45,7% em CCU) - comumente detectadas.²⁰¹ E em amostras de CCEE, Zhang et al. em 2010, não encontraram diferenças nas taxas de detecção de ambas as formas quando foram analisadas amostras dos casos de câncer e dos controles (91,43% vs 85%).¹⁵²

Poljak et al. usaram tanto *primers* de consenso quanto *primers* específicos em 121 amostras de CCEE, e concluíram que a combinação não aumentou as taxas de detecção do DNA do HPV.¹⁹⁹ O mesmo já havia sido demonstrado em outros estudos.²⁰²⁻²⁰⁶ Além disso, a possível conexão entre a integração, a transcrição e a expressão do DNA do HPV, assim como o seu valor clínico, ainda necessita ser confirmada.¹⁵² Pois, como citado por Briolat et al., a integração viral do HPV-AR não parece ser um pré-requisito crítico no desenvolvimento do CCU.^{207, 208} Em uma revisão sistemática sobre sítios de integração genômica do HPV, publicada em 2004 por Wentzensen et al., os autores concluem que a causa para a ocorrência de agrupamentos de HPV integrados, parece estar mais relacionada à acessibilidade dessas áreas genômicas frágeis do que devido a seleção de clones que abrigam HPV integrado em regiões com genes tumorais (Figura 6). Ou seja, a integração talvez seria uma consequência desse ambiente carcinogênico, e não a causa.²⁰⁸

Portanto, mesmo estudos que encontraram forte associação entre a infecção por HPV e CCEE, sugerem apenas uma relação entre exposição e desfecho, e um estudo prospectivo de coorte seria necessário para uma melhor definição.¹⁵⁶

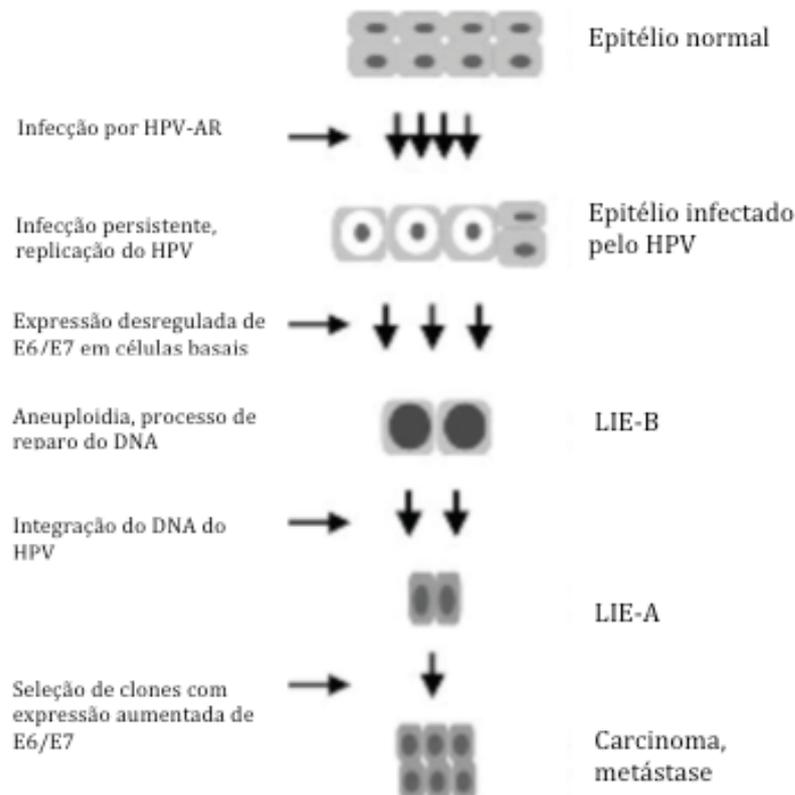


Figura 6: Papel da integração do HPV na progressão do epitélio normal para o carcinoma invasivo. HPV-AR, papilomavírus de alto risco; LIE-B, lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau; LIE-A, lesão intra-epitelial escamosa de alto grau.²⁰⁸

Remmerbach et al. analisaram amostras da cavidade oral e do colo de útero usando PCR com somente MY09/11, somente GP5+/6+ ou nested PCR com GP5+/6+ naqueles inicialmente negativos com MY09/11. A sensibilidade do PCR para HPV 18 em células HeLa com MY09/11 é de 1700 cópias/ul, porém quando utilizado em conjunto com o Gp5+/6+, sendo o primeiro como *primer* externo e o último como interno (Figura 4), a sensibilidade aumenta para 17 cópias/ul. Outra técnica avaliada pelo autor foi o *auto-nested* PCR, na qual o uso do GP5+/6+ e sua posterior re-amplificação com o mesmo *primer*, aumentou a sensibilidade de 170 cópias/ul para 51 cópias/ul. Esta técnica de *auto-nested* PCR com os *primers* GP5+/GP6+ foi a utilizada por Damin et al. para investigar a associação do HPV com câncer de esôfago no Rio Grande do Sul, e com a qual identificaram DNA de HPV em 15,75% dos CCEE.¹²⁵ Posteriormente, Chaiwongkot et al. avaliaram essa mesma técnica de *auto-nested* PCR com GP5+/GP6+ como rastreamento para colo de útero, e encontraram um aumento da sensibilidade de 20,7% para 38,5% nas amostras com citologia normal, em relação a PCR com GP5+/6+ convencional ($p < 0,05$). Enquanto que nas amostras com leve displasia a taxa de detecção aumentou de 50% para 51,4%, não havendo diferença significativa, mas concordância dos resultados ($\kappa = 0,97$).¹⁸¹ Embora os autores sugiram que o *auto-nested* PCR deva ser necessário no rastreamento do CCU, houve diferença significativa apenas nas amostras com citologia normal, tornando-se questionável a necessidade de um aumento da sensibilidade na detecção de HPV tanto no *screening* de neoplasias onde já está definido o papel carcinogênico do HPV, quanto na investigação do seu envolvimento como potencial fator de risco em outros tumores. Existem outros *primers* (PGMY, SPF10) e outras técnicas (como PCR em tempo real) com maior sensibilidade para detecção do DNA do HPV em tecidos com baixa carga viral, extraído de material fixado com formol e armazenados em parafina. Entretanto, estudos em amostras de colo de útero normal ou displásicos tem demonstrado que uma sensibilidade muito alta do teste, resulta em uma marcante redução na especificidade clínica. Vários estudos em colo de útero tem demonstrado que não apenas a presença do HPV-AR é necessário para o desenvolvimento da carcinogênese, mas também o volume da carga viral. Há uma relação direta entre este último e o risco de desenvolvimento de NIC II/III ou carcinoma.²⁰⁹⁻²¹⁴ Dessa forma, a *American Society for Colposcopy and Cervical Pathology* recomenda que testes para rastreamento com sensibilidade de pelo menos 92%+/-3% parecem satisfatórios somente quando a especificidade clínica for superior a 85%.²¹⁵

Vários autores relataram dificuldade em reproduzir resultados de PCR com tecidos fixados em formol.²¹⁶⁻²¹⁸ Karlsen descreveu o efeito antagonista da fixação com formaldeído devido à modificação do DNA, causando a inibição da amplificação pelo PCR de amplicons longos (>200pb).²¹⁹ Considerando que os resultados do PCR poderiam ser afetados pela fixação do tecido com formol, ou pela idade do material emblocado em parafina, nós usamos GP5/6 como *primers* internos na reação de *nested* PCR, que amplificam fragmentos de 140-150 pb (Figura 6). Assim, reduzimos a possibilidade de falsos negativos decorrentes da menor acurácia dos *primers* MY09/11, em amplificar fragmentos curtos de DNA em amostras de tecido fixadas com formol e embebidas em parafina. Além disso, os controles internos com β -globina, GAPDH e G3PDH, confirmaram a qualidade do DNA em quase todas as amostras (97,33%) deste estudo.

Outro fator que poderia influenciar na detecção do HPV no esôfago, seria a possibilidade de o vírus desempenhar o seu papel na carcinogênese apenas na fase inicial.³³ Em um estudo publicado por Acevedo-Nuno et al. em 2004, comparando com a esofagite, as lesões pré-cancerosas mostraram maiores taxas de infecção por HPV (96% vs 26%), enquanto que em amostras de CCEE, as taxas foram um pouco menores (88%).¹¹⁹ Em função dessa possível variável nós incluímos o grupo dos pacientes com CCECP, os quais foram submetidos à cromoendoscopia, na tentativa de se identificar lesões pré-malignas. No entanto, as únicas alterações histológicas encontradas foram esofagite e CCEE sendo todas negativas para HPV pela PCR.

Em relação ao grupo com CCECP (Grupo 2) avaliado neste trabalho, todas as amostras de tumor primário foram negativas para HPV. Uma vez que as taxas descritas por trabalhos anteriores variam conforme o subsítio do CCECP, os pacientes foram agrupados em 4 grupos composto por 9 pacientes com CCECP de cavidade oral, 16 de orofaringe, 10 de laringe e 2 de sitio primário indeterminado na região da cabeça e pescoço. Em um estudo de screening para neoplasia de esôfago em 148 pacientes com CCECP, Scherübl et al. detectaram, através de EDA, CCEE assintomático em 11 pacientes (7,4%), e displasia de baixo e alto grau em 10 pacientes (6,8%).²²⁰ Outros estudos prospectivos realizados no Japão e no Brasil detectaram CCEE em 5,1-11,8% dos pacientes com CCECP.²²¹⁻²²⁴ Portanto, no Grupo 2, nós realizamos EDA para rastreamento de CCEE, e aplicação de Lugol para identificação de áreas de lesão pré-maligna. Dos 37 pacientes, 17 apresentaram áreas não coradas pelo Lugol. Trinta e seis pacientes foram avaliados com exame histológico do esôfago, e nenhuma amostra apresentava displasia. Da mesma forma que no sitio primário

destes pacientes com CCECP, as amostras do esôfago foram negativas para HPV pela PCR, independente da presença de áreas descoradas, de esofagite ou de CCEE. Nosso resultado foi concordante àquele publicado por De Villiers et al. em 2004. Estes autores avaliaram a presença de DNA do HPV por PCR em dois grupos de pacientes com CCECP. O primeiro grupo foi constituído por 60 pacientes com CCECP submetidos à EDA para rastreamento de CCEE assintomático, sendo positivo para HPV em 6 dos nove casos de CCEE detectados. O segundo grupo foi composto por 21 pacientes com CCECP e CCEE, sendo positivo para HPV em 13 das amostras de CCECP e 14 das amostras de CCEE. Entretanto, o mesmo tipo de HPV estava presente em apenas 3 dos 21 pacientes com CCECP e CCEE, sugerindo que uma expansão clonal do CCECP para um subsequente CCEE, ou vice-versa, seria improvável.¹³⁸

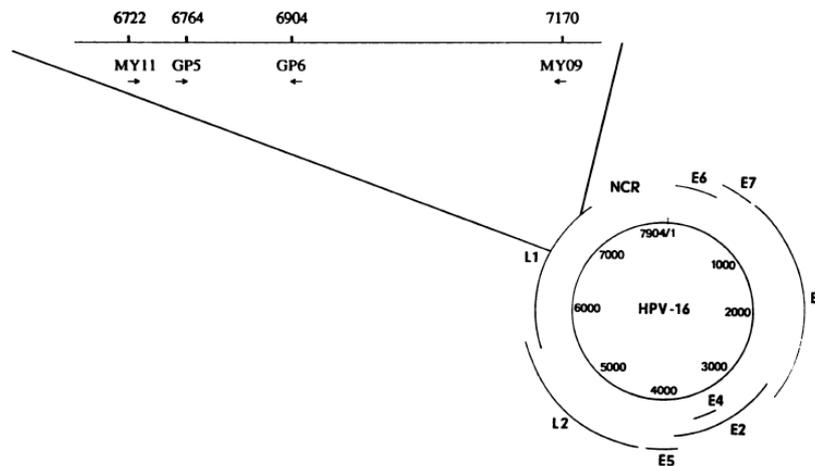


Figura 7: Localização dos *primers* de consenso MY11-MY09 e *primers* gerais GP5-GP6 na região L1 do genoma do HPV.¹⁸⁰

A possibilidade de que as taxas de detecção do HPV possam acompanhar as diferentes taxas de incidência do CCEE, ou seja, de que o HPV teria um maior envolvimento na carcinogênese esofágica em áreas de alto risco, não é corroborada por vários estudos. Embora não detectado em áreas de baixa prevalência de CCEE, como relatado em estudos conduzidos na Coreia (0% de prevalência de HPV), Eslovênia (0%), Itália (0%) e EUA (2%); estimativas ligeiramente maiores foram encontradas em outras regiões também de baixo risco de CCEE, como Austrália (3,6%), Shandong (6%), Suécia (16%) e Alemanha (17%).^{137, 142, 148, 150, 151, 154, 199, 206, 225} Outro estudo realizado em uma região considerada de baixa prevalência para CCEE foi conduzido por Herrera-Goepfert no México, onde foi encontrada uma associação mais significativa (25%).¹⁵⁸ Em populações com altas taxas de incidência de CCEE, a variação encontrada na detecção do HPV nas amostras de tumor de esôfago é maior ainda, com

prevalências variando de 0% no Quênia e na província chinesa de Linxian, para 36,8% no Irã, 54% no Egito, 65% em Gansu (China) e 72% em Anyang (China).^{141, 143, 149, 151, 168, 226}

Em função da grande variação de taxas de detecção de HPV encontrados em uma mesma região de alto risco para CCEE, como é o caso de Lixian e Anyang (de 0 a 94%), situadas na província de Henan, na China, Koshiol et al. realizaram um estudo que incluiu 272 pacientes com CCEE, submetidos a esofagectomia no Yaocun Commune Hospital em Linxian. O estudo incluiu pacientes de Linxian, uma das áreas com maiores taxas de CCEE no mundo, além de outras regiões, totalizando 13 das 31 províncias, condados e regiões da China. Adicionalmente, os casos eram também provenientes de regiões com baixas (<2/100.000) e altas (>32/100.000) taxas de mortalidade por CCU. Além do número considerável de pacientes analisados, os autores tiveram o extremo cuidado para prevenir contaminação na coleta das amostras, processamento e realização dos testes. Dessa forma, utilizando PCR com *primers* altamente sensíveis (PGMY para amostras emblocadas em parafina e SPF10 para amostras a fresco) somente 3 (1,1%) dos 267 casos mostraram resultados fracamente positivos para PCR, ou seja, com baixo número de cópias. Além disso, nenhum desses três casos (1 HPV-89, 1 HPV-16 e 1 HPV-31) mostrou evidências da atividade oncogênica do HPV, tanto pela avaliação da expressão da proteína p16 ausente em todos eles, quanto pela soro-positividade negativa para HPV E6/E7 no caso positivo para HPV-16 pela PCR. Soma-se a essas evidências, o fato de que o HPV-89 não é detectado no câncer em humanos, e é relativamente prevalente em amostras de colo de útero da população geral. Os autores sugerem que esses três casos foram resultado de contaminação, e que a prevalência de HPV em CCEE é próxima de 0%, não havendo, portanto, o envolvimento do vírus na carcinogênese do esôfago.¹⁵³ Embora o trabalho de Koshiol tenha usado *primers* mais sensíveis, e em um número maior de pacientes com CCEE, em comparação com o nosso estudo, os resultados foram concordantes. Esses achados, provavelmente, devem-se ao rigoroso cuidado para evitar falsos positivos em ambos os estudos. A hipótese de que a grande variação de taxas de detecção de DNA do HPV em amostras de CCCE seja explicada por contaminação das amostras baseia-se na grande sensibilidade dos métodos de PCR, na possibilidade de transmissão por outras vias além do intercuro sexual, e na resistência do HPV à limpeza com detergentes. Este último fator foi descrito em relatos de detecção de DNA de HPV genital nas mãos, roupas íntimas, luvas, superfícies de clínicas especializadas em tratamento geniturinário e instrumentos médicos, além da persistência do DNA até mesmo após limpeza com etanol.²²⁷⁻²³⁰ A técnica de PCR possui o poder de amplificar quantidades

muito pequenas de ácidos nucleicos, podendo provocar contaminação com o seu próprio produto. Em um laboratório que realiza PCR as atividades incluem preparação da amostra, preparação da PCR, execução da PCR, e a análise pós-PCR. Tanto o material a ser pesquisado na amostra pode ser fonte de contaminação, quanto os aerossóis de amplicons PCR gerados pelo método.

Uma outra explicação para a ausência de detecção de HPV no nosso estudo, inclusive nos tumores primários dos pacientes com CCECP, seriam as características dos pacientes incluídos. Como sugerido por Gillison et al., os CCECP são um grupo heterogêneo de cânceres agrupados em HPV+ e HPV-, com ao menos duas vias etiologicamente distintas para sua patogênese, uma mediada pelo tabaco e álcool, e a outra pelo HPV. Além do que os pacientes com CCECP HPV+ são mais jovens (idade média: 54 vs 58 anos, $p=0,002$), brancos ($p=0,006$), casados ($p<0,001$), com educação universitária ($p=0,003$), com uma renda anual de 50.000 dólares ou mais ($p<0,001$) e com a localização do tumor primário na orofaringe ou de sítio primário desconhecido ($p<0,001$).^{19, 231} Entretanto, os pacientes com CCEE e CCECP incluídos no nosso estudo, apresentavam idade média (60,06 e 57,76 anos, respectivamente) semelhante a do grupo HPV-negativo descrito por Gillison.¹⁹ Além disso, eram tabagistas e/ou etilistas (94,11% dos CCEE e 100% dos CCECP), e embora não tenham sido avaliadas as características sócio-econômicas, eles representam a população de pacientes oncológicos atendidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) no Rio Grande do Sul, em geral com baixa renda familiar e baixo nível de escolaridade.²³² Conforme revisão publicada por Kreimer et al. em 2005, as prevalências de HPV em CCECP foram de 35% para CCE de orofaringe (IC 95%, 32,6-38,7), 23,5% para CCE de cavidade oral (IC 95%, 21,9-25,1) e 24% para CCE de laringe (IC 95%, 21,8-26,3).²⁵ Utilizando a menor dessas taxas para calcular o tamanho da amostra, o nosso estudo tem um poder próximo a 90%, com nível de significância de 5%, para detectar uma diferença de 23,5% de prevalência entre os pacientes do grupo 2 e o grupo 3. No entanto, como demonstrado por Gillison, em pacientes com CCECP tabagistas e etilistas pesados, a prevalência de HPV+ foi de 17%. Dessa forma, mesmo utilizando a taxa de incidência do sítio com maior prevalência para HPV, ou seja, orofaringe (35% de prevalência), e levando em consideração que apenas 17% desses pacientes poderiam ser positivos para o HPV, a prevalência de HPV em CCECP de orofaringe, cairia para 5,95%. E, portanto, seriam necessários 128 pacientes com CCE somente de orofaringe para encontrar uma diferença de 5,95%, com um poder de 80% e um nível de significância de 5%. Ou seja, o número de pacientes incluído no Grupo 2 do nosso estudo (37 pacientes), não seria suficiente

para detectar o HPV na lesão primária dos CCECPs nesta população composta por etilistas e tabagistas. Talvez, o mesmo raciocínio quanto às vias diferentes de carcinogênese, associadas aos diferentes fatores de risco, aplique-se à carcinogênese do CCEE, e o seu melhor entendimento, poderá trazer mudanças de conduta não só quanto aos métodos diagnósticos, como terapêuticos. O que os nossos resultados sugerem é que o HPV não parece ter um papel fundamental na carcinogênese dos CCEEs e dos CCECPs, pelo menos, no sul do Brasil.

Estudos recentes têm empregado outras técnicas associadas a PCR, como imuno-histoquímica para p16 e sorologia para E6/E7; e conforme sugerido por Koshiol e Kreimer, embora úteis na investigação do papel do HPV na carcinogênese do esôfago, ambos apresentam limitações. A imuno-histoquímica para p16 pode ser sub-expressada devido a hipermetilação ou mutação, ou ainda, pode estar super-expressada em função de alterações na via da pRb não relacionadas ao HPV. Já a sorologia para E6/E7 apresenta uma sensibilidade de apenas 50% em tumores de colo de útero, onde a carga viral do HPV é comprovadamente superior.²³³

Algumas características no nosso estudo que podem diferenciá-lo dos outros dois previamente conduzidos no sul do Brasil são: (1) o extremo cuidado para evitar contaminação com DNA durante o processamento e a PCR; (2) o uso de uma técnica de PCR altamente sensível; e (3) a preocupação em avaliar lesões precursoras ou áreas de mucosa esofágica com o mesmo ambiente carcinogênico.

Possíveis fatores limitantes do nosso estudo seriam o número de pacientes incluídos e a ausência de informações relacionadas aos hábitos sexuais, às características sócio-econômicas e ao consumo de erva mate.

O nosso trabalho não identificou a presença do HPV não só nos CCEE, assim como nos CCECP, e na mucosa esofágica normal desses pacientes com CTADS submetidos aos mesmos fatores de risco para CCE do TADS em uma mesma área. Além de comparar com a mucosa esofágica de indivíduos sem CTADS e não expostos ao tabagismo e ao alcoolismo. Portanto, os nossos resultados confirmam observações anteriores, em outras regiões, relatando a ausência de associação entre a infecção pelo HPV e o CCEE; e sugerem que, no sul do Brasil, este vírus não é um importante fator de risco para os carcinomas de células escamosas de esôfago e de cabeça e pescoço.

CONCLUSÕES

1. Não foi detectado DNA do HPV na lesão tumoral ou na mucosa esofágica, com aspecto íntegro, distante do tumor em pacientes com carcinoma de células escamosas do esôfago.
2. Não foi detectado DNA do HPV na lesão tumoral de pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço.
3. Não foi detectado DNA do HPV na mucosa esofágica de pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço.
4. Não foi detectado DNA do HPV nas áreas de mucosa esofágica sem neoplasia.
5. Não foi detectado DNA do HPV na mucosa esofágica íntegra de indivíduos não expostos ao tabagismo e ao alcoolismo..

Considerando as possíveis limitações metodológicas, como número de pacientes incluídos e ausência de informações referentes a hábitos sexuais, é possível que este resultado colabore com as evidências de que o HPV não participe da carcinogênese no câncer de esôfago.

Portanto, com utilização de um método com grande acurácia para detecção do HPV, com rigoroso controle em relação aos resultados falso-positivos e quanto à integridade das amostras, nossos resultados apontam para a evidência de que o HPV não esteve envolvido na oncogênese dos carcinomas de células escamosas do trato aerodigestivo no grupo estudado.

REFERENCES

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. **Global cancer statistics.** CA Cancer J Clin 2011;61:69-90.
2. Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. **Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world.** J Clin Oncol 2006;24:2137-50.
3. INCA. **Estimativa 2012: Incidência de câncer no Brasil.** In. Rio de Janeiro; 2011:118.
4. de Barros SG, Vidal RM, Luz LP, et al. **[Prevalence of adenocarcinoma of the esophagus and esophagogastric junction in a 10 year period at a cancer referral center in southern Brazil].** Arq Gastroenterol 1999;36:32-6.
5. Kamangar F, Chow WH, Abnet CC, Dawsey SM. **Environmental causes of esophageal cancer.** Gastroenterol Clin North Am 2009;38:27-57, vii.
6. Fagundes RB, Abnet CC, Strickland PT, et al. **Higher urine 1-hydroxy pyrene glucuronide (1-OHPG) is associated with tobacco smoke exposure and drinking mate in healthy subjects from Rio Grande do Sul, Brazil.** BMC Cancer 2006;6:139-45.
7. Kamangar F, Schantz MM, Abnet CC, Fagundes RB, Dawsey SM. **High levels of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in mate drinks.** Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2008;17:1262-8.
8. Yang CS. **Research on esophageal cancer in China: a review.** Cancer Res 1980;40:2633-44.
9. Department of Epidemiology of CICAMS, Department of Statistics of the Information Research Institute of CAMS, and First Department of the Research Institute of Microbiology of the Chinese Academy of Sciences. **Preliminary investigation of the epidemiological factors of esophageal cancer in China.** Res Cancer Prev Treat 1977;2:1-8.
10. Enzinger PC, Mayer RJ. **Esophageal cancer.** N Engl J Med 2003;349:2241-52.
11. Ribeiro U, Jr., Posner MC, Safatle-Ribeiro AV, Reynolds JC. **Risk factors for squamous cell carcinoma of the oesophagus.** Br J Surg 1996;83:1174-85.
12. Goon PK, Stanley MA, Ebmeyer J, et al. **HPV & head and neck cancer: a descriptive update.** Head Neck Oncol 2009;1:36-43.
13. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. **Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008.** Int J Cancer 2010;127:2893-917.

14. Syrjanen K, Syrjanen S, Lamberg M, Pyrhonen S, Nuutinen J. **Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis.** *Int J Oral Surg* 1983;12:418-24.
15. Frisch M, Hjalgrim H, Jaeger AB, Biggar RJ. **Changing patterns of tonsillar squamous cell carcinoma in the United States.** *Cancer Causes Control* 2000;11:489-95.
16. Syrjanen S. **HPV infections and tonsillar carcinoma.** *J Clin Pathol* 2004;57:449-55.
17. Shiboski CH, Schmidt BL, Jordan RC. Tongue and tonsil carcinoma: increasing trends in the U.S. population ages 20-44 years. *Cancer* 2005;103:1843-9.
18. Hammarstedt L, Lindquist D, Dahlstrand H, et al. **Human papillomavirus as a risk factor for the increase in incidence of tonsillar cancer.** *Int J Cancer* 2006;119:2620-3.
19. Gillison ML, D'Souza G, Westra W, et al. **Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers.** *J Natl Cancer Inst* 2008;100:407-20.
20. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, et al. **Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers.** *J Natl Cancer Inst* 2000;92:709-20.
21. Gillison ML. **Human papillomavirus-associated head and neck cancer is a distinct epidemiologic, clinical, and molecular entity.** *Semin Oncol* 2004;31:744-54.
22. Heck JE, Berthiller J, Vaccarella S, et al. **Sexual behaviours and the risk of head and neck cancers: a pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) consortium.** *Int J Epidemiol* 2010;39:166-81.
23. Schwartz SM, Daling JR, Doody DR, et al. **Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection.** *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1626-36.
24. D'Souza G, Dempsey A. **The role of HPV in head and neck cancer and review of the HPV vaccine.** *Prev Med* 2011;53 Suppl 1:S5-S11.
25. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. **Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:467-75.
26. Weinberger PM, Yu Z, Haffty BG, et al. **Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus--associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis.** *J Clin Oncol* 2006;24:736-47.
27. Mellin H, Dahlgren L, Munck-Wikland E, et al. **Human papillomavirus type 16 is episomal and a high viral load may be correlated to better prognosis in tonsillar cancer.** *Int J Cancer* 2002;102:152-8.

28. Schwartz SR, Yueh B, McDougall JK, Daling JR, Schwartz SM. **Human papillomavirus infection and survival in oral squamous cell cancer: a population-based study.** Otolaryngol Head Neck Surg 2001;125:1-9.
29. Licitra L, Perrone F, Bossi P, et al. **High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma.** J Clin Oncol 2006;24:5630-6.
30. Fakhry C, Westra WH, Li S, et al. **Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial.** J Natl Cancer Inst 2008;100:261-9.
31. Ang KK, Harris J, Wheeler R, et al. **Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer.** N Engl J Med 2010;363:24-35.
32. Howley PM. **Warts, cancer and ubiquitylation: lessons from the papillomaviruses.** Trans Am Clin Climatol Assoc 2006;117:113-27.
33. Li TT, Zhao LN, Liu ZG, Han Y, Fan DM. **Regulation of apoptosis by the papillomavirus E6 oncogene.** World J Gastroenterol 2005;11:931-7.
34. Krueger H. **HPV and other infectious agents in cancer : opportunities for prevention and public health.** Oxford: Oxford University Press; 2010.
35. Alani RM, Munger K. **Human papillomaviruses and associated malignancies.** J Clin Oncol 1998;16:330-7.
36. Coelho FRG SF, Focchi J, Fregnani JHTG, Zeferino LC, Villa LL, Federico MH, Novaes PERS, Costa RLR, ed. **Câncer do Colo do Útero.** 1.ed. São Paulo: Tecmed; 2008.
37. Burk RD, Chen Z, Van Doorslaer K. **Human papillomaviruses: genetic basis of carcinogenicity.** Public Health Genomics 2009;12:281-90.
38. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers EM. **Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments.** Virology 2010;401:70-9.
39. Bafverstedt B. **Condylomata acuminata--past and present.** Acta Derm Venereol 1967;47:376-81.
40. Rigoni-Stern D. **Fatti statistici relative alle malattie cancerose che servirono de base alla poche cose dette dal dott.** Giornale service propr pathol terap ser 1842;2:507-17.
41. Payne J. **On the contagious rise of common warts.** Br J Dermatol 1891;3:185-9.
42. Ciuffo G. **Innesto positive con filtrato di verruca volgare.** Giornale Ital Mal Ven Pelle 1907;48:12-7.

43. Syrjanen S, Syrjanen K. **The history of papillomavirus research.** Cent Eur J Public Health 2008;16 Suppl:S7-13.
44. Rous P, Beard JW. **Carcinomatous changes in virus-induced papillomas of the skin of the rabbit.** Proc Soc Exp Biol Med 1934;32:578-80.
45. Rous P, Kidd JG. **The Carcinogenic Effect of a Papilloma Virus on the Tared Skin of Rabbits : I. Description of the Phenomenon.** J Exp Med 1938;67:399-428.
46. Rous P, Friedewald WF. **The Effect of Chemical Carcinogens on Virus-Induced Rabbit Papillomas.** J Exp Med 1944;79:511-38.
47. Crawford LV. **A study of human papilloma virus DNA.** J Mol Biol 1965;13:362-72.
48. Klug A, Finch JT. **Structure of Viruses of the Papilloma-Polyoma Type. I. Human Wart Virus.** J Mol Biol 1965;11:403-23.
49. zur Hausen H, Rosl F. **Pathogenesis of cancer of the cervix.** Cold Spring Harb Symp Quant Biol 1994;59:623-8.
50. zur Hausen H. **Papillomavirus infections--a major cause of human cancers.** Biochim Biophys Acta 1996;1288:F55-78.
51. zur Hausen H. **Novel human polyomaviruses--re-emergence of a well known virus family as possible human carcinogens.** Int J Cancer 2008;123:247-50.
52. zur Hausen H. **Condylomata acuminata and human genital cancer.** Cancer Res 1976;36:794.
53. zur Hausen H. **Oncogenic Herpes viruses.** Biochim Biophys Acta 1975;417:25-53.
54. zur Hausen H, Gissmann L, Steiner W, Dippold W, Dreger I. **Human papilloma viruses and cancer.** Bibl Haematol 1975:569-71.
55. zur Hausen H, Meinhof W, Scheiber W, Bornkamm GW. **Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus.** Int J Cancer 1974;13:650-6.
56. Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H. **A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions.** Proc Natl Acad Sci U S A 1983;80:3812-5.
57. zur Hausen H. **Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas.** Curr Top Microbiol Immunol 1977;78:1-30.
58. zur Hausen H. **Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account.** Virology 2009;384:260-5.

59. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. **Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide.** J Pathol 1999;189:12-9.
60. Bosch FX, Munoz N, de Sanjose S, et al. **Risk factors for cervical cancer in Colombia and Spain.** Int J Cancer 1992;52:750-8.
61. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, et al. **The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: a population-based case-control study in Colombia and Spain.** Int J Cancer 1992;52:743-9.
62. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. **The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer.** J Clin Pathol 2002;55:244-65.
63. IARC. **Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Human Papillomaviruses.** 2007;Vol.90.
64. Madsen BS, Jensen HL, van den Brule AJ, Wohlfahrt J, Frisch M. **Risk factors for invasive squamous cell carcinoma of the vulva and vagina--population-based case-control study in Denmark.** Int J Cancer 2008;122:2827-34.
65. Rubin MA, Kleter B, Zhou M, et al. **Detection and typing of human papillomavirus DNA in penile carcinoma: evidence for multiple independent pathways of penile carcinogenesis.** Am J Pathol 2001;159:1211-8.
66. Bezerra AL, Lopes A, Santiago GH, Ribeiro KC, Latorre MR, Villa LL. **Human papillomavirus as a prognostic factor in carcinoma of the penis: analysis of 82 patients treated with amputation and bilateral lymphadenectomy.** Cancer 2001;91:2315-21.
67. Lont AP, Kroon BK, Horenblas S, et al. **Presence of high-risk human papillomavirus DNA in penile carcinoma predicts favorable outcome in survival.** Int J Cancer 2006;119:1078-81.
68. Frisch M, Glimelius B, van den Brule AJ, et al. **Sexually transmitted infection as a cause of anal cancer.** N Engl J Med 1997;337:1350-8.
69. Daling JR, Madeleine MM, Johnson LG, et al. **Human papillomavirus, smoking, and sexual practices in the etiology of anal cancer.** Cancer 2004;101:270-80.
70. Varnai AD, Bollmann M, Griefingholt H, et al. **HPV in anal squamous cell carcinoma and anal intraepithelial neoplasia (AIN). Impact of HPV analysis of anal lesions on diagnosis and prognosis.** Int J Colorectal Dis 2006;21:135-42.
71. Tachezy R, Jirasek T, Salakova M, et al. **Human papillomavirus infection and tumours of the anal canal: correlation of histology, PCR detection in paraffin sections and serology.** APMIS 2007;115:195-203.
72. Psyrri A, DiMaio D. **Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer.** Nat Clin Pract Oncol 2008;5:24-31.

73. Schiffman M, Clifford G, Buonaguro FM. **Classification of weakly carcinogenic human papillomavirus types: addressing the limits of epidemiology at the borderline.** Infect Agent Cancer 2009;4:8.
74. Rüter M, van Mullem PJ. **Behavior of virus in malignant degeneration of skin lesion in epidermodysplasia verruciformis.** J Invest Dermatol 1970;54:324-31.
75. Yabe Y, Okamoto T, Omori S, Tanioku K. **Virus particles in epidermodysplasia verruciformis with carcinoma.** Dermatologica 1969;139:161-4.
76. Lutz W. **A propos de l'epidermodysplasie verruciforme.** Dermatologica 1946;92:30-43.
77. Jablonska S, Milewski B. **[Information on epidermodysplasia verruciformis Lewandowsky-Lutz; positive results of auto- and heteroinoculation].** Dermatologica 1957;115:1-22.
78. Orth G. **Epidermodysplasia verruciformis: a model for understanding the oncogenicity of human papillomaviruses.** Ciba Found Symp 1986;120:157-74.
79. Schaper ID, Marcuzzi GP, Weissenborn SJ, et al. **Development of skin tumors in mice transgenic for early genes of human papillomavirus type 8.** Cancer Res 2005;65:1394-400.
80. Michel A, Kopp-Schneider A, Zentgraf H, Gruber AD, de Villiers EM. **E6/E7 expression of human papillomavirus type 20 (HPV-20) and HPV-27 influences proliferation and differentiation of the skin in UV-irradiated SKH-hr1 transgenic mice.** J Virol 2006;80:11153-64.
81. Ruhland A, de Villiers EM. **Opposite regulation of the HPV 20-URR and HPV 27-URR promoters by ultraviolet irradiation and cytokines.** Int J Cancer 2001;91:828-34.
82. Bouwes Bavinck JN, Feltkamp M, Struijk L, ter Schegget J. **Human papillomavirus infection and skin cancer risk in organ transplant recipients.** J Invest Dermatol Symp Proc 2001;6:207-11.
83. Lutzner MA, Orth G, Dutronquay V, Ducasse MF, Kreis H, Crosnier J. **Detection of human papillomavirus type 5 DNA in skin cancers of an immunosuppressed renal allograft recipient.** Lancet 1983;2:422-4.
84. Stark LA, Arends MJ, McLaren KM, et al. **Prevalence of human papillomavirus DNA in cutaneous neoplasms from renal allograft recipients supports a possible viral role in tumour promotion.** Br J Cancer 1994;69:222-9.
85. Shamanin V, Glover M, Rausch C, et al. **Specific types of human papillomavirus found in benign proliferations and carcinomas of the skin in immunosuppressed patients.** Cancer Res 1994;54:4610-3.

86. Jackson S, Harwood C, Thomas M, Banks L, Storey A. **Role of Bak in UV-induced apoptosis in skin cancer and abrogation by HPV E6 proteins.** *Genes Dev* 2000;14:3065-73.
87. Fei JW, de Villiers EM. **Degradation of HPV20E6 by p53: Delta Np63 alpha and mutant p53R248W protect the wild type p53 mediated caspase-degradation.** *Int J Cancer* 2008;123:108-16.
88. Damin AP, Karam R, Zettler CG, Caleffi M, Alexandre CO. **Evidence for an association of human papillomavirus and breast carcinomas.** *Breast Cancer Res Treat* 2004;84:131-7.
89. de Villiers EM, Sandstrom RE, zur Hausen H, Buck CE. **Presence of papillomavirus sequences in condylomatous lesions of the mamillae and in invasive carcinoma of the breast.** *Breast Cancer Res* 2005;7:R1-11.
90. Di Lonardo A, Venuti A, Marcante ML. **Human papillomavirus in breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat* 1992;21:95-100.
91. Yu Y, Morimoto T, Sasa M, et al. **Human papillomavirus type 33 DNA in breast cancer in Chinese.** *Breast Cancer* 2000;7:33-6.
92. Bratthauer GL, Tavassoli FA, O'Leary TJ. **Etiology of breast carcinoma: no apparent role for papillomavirus types 6/11/16/18.** *Pathol Res Pract* 1992;188:384-6.
93. Wrede D, Luqmani YA, Coombes RC, Vousden KH. **Absence of HPV 16 and 18 DNA in breast cancer.** *Br J Cancer* 1992;65:891-4.
94. Gopalkrishna V, Singh UR, Sodhani P, et al. **Absence of human papillomavirus DNA in breast cancer as revealed by polymerase chain reaction.** *Breast Cancer Res Treat* 1996;39:197-202.
95. Bodaghi S, Yamanegi K, Xiao SY, Da Costa M, Palefsky JM, Zheng ZM. **Colorectal papillomavirus infection in patients with colorectal cancer.** *Clin Cancer Res* 2005;11:2862-7.
96. McGregor B, Byrne P, Kirgan D, Albright J, Manalo P, Hall M. **Confirmation of the association of human papillomavirus with human colon cancer.** *Am J Surg* 1993;166:738-40; discussion 41-2.
97. Cheng JY, Sheu LF, Meng CL, Lee WH, Lin JC. **Detection of human papillomavirus DNA in colorectal carcinomas by polymerase chain reaction.** *Gut* 1995;37:87-90.
98. Lee YM, Leu SY, Chiang H, Fung CP, Liu WT. **Human papillomavirus type 18 in colorectal cancer.** *J Microbiol Immunol Infect* 2001;34:87-91.

99. Perez LO, Abba MC, Laguens RM, Golijow CD. **Analysis of adenocarcinoma of the colon and rectum: detection of human papillomavirus (HPV) DNA by polymerase chain reaction.** *Colorectal Dis* 2005;7:492-5.
100. Shah KV, Daniel RW, Simons JW, Vogelstein B. **Investigation of colon cancers for human papillomavirus genomic sequences by polymerase chain reaction.** *J Surg Oncol* 1992;51:5-7.
101. Shroyer KR, Kim JG, Manos MM, Greer CE, Pearlman NW, Franklin WA. **Papillomavirus found in anorectal squamous carcinoma, not in colon adenocarcinoma.** *Arch Surg* 1992;127:741-4.
102. Lopez-Beltran A, Escudero AL, Carrasco-Aznar JC, Vicioso-Recio L. **Human papillomavirus infection and transitional cell carcinoma of the bladder. Immunohistochemistry and in situ hybridization.** *Pathol Res Pract* 1996;192:154-9.
103. Gopalkrishna V, Srivastava AN, Hedau S, Sharma JK, Das BC. **Detection of human papillomavirus DNA sequences in cancer of the urinary bladder by in situ hybridisation and polymerase chain reaction.** *Genitourin Med* 1995;71:231-3.
104. Aynaud O, Tranbaloc P, Orth G. **Lack of evidence for a role of human papillomaviruses in transitional cell carcinoma of the bladder.** *J Urol* 1998;159:86-9; discussion 90.
105. Westenend PJ, Stoop JA, Hendriks JG. **Human papillomaviruses 6/11, 16/18 and 31/33/51 are not associated with squamous cell carcinoma of the urinary bladder.** *BJU Int* 2001;88:198-201.
106. Syrjanen KJ. **HPV infections and lung cancer.** *J Clin Pathol* 2002;55:885-91.
107. Jain N, Singh V, Hedau S, et al. **Infection of human papillomavirus type 18 and p53 codon 72 polymorphism in lung cancer patients from India.** *Chest* 2005;128:3999-4007.
108. Tshako K, Nakazato I, Hirayasu T, Sunakawa H, Iwamasa T. **Human papillomavirus DNA in adenosquamous carcinoma of the lung.** *J Clin Pathol* 1998;51:741-9.
109. Kaya H, Kotiloglu E, Inanli S, et al. **Prevalence of human papillomavirus (HPV) DNA in larynx and lung carcinomas.** *Pathologica* 2001;93:531-4.
110. Bohlmeier T, Le TN, Shroyer AL, Markham N, Shroyer KR. **Detection of human papillomavirus in squamous cell carcinomas of the lung by polymerase chain reaction.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;18:265-9.
111. Clavel CE, Nawrocki B, Bosseaux B, et al. **Detection of human papillomavirus DNA in bronchopulmonary carcinomas by hybrid capture II: a study of 185 tumors.** *Cancer* 2000;88:1347-52.

112. Klein F, Amin Kotb WF, Petersen I. **Incidence of human papilloma virus in lung cancer.** Lung Cancer 2009;65:13-8.
113. Iwamasa T, Miyagi J, Tshako K, et al. **Prognostic implication of human papillomavirus infection in squamous cell carcinoma of the lung.** Pathol Res Pract 2000;196:209-18.
114. Gillison ML, Shah KV. **Chapter 9: Role of mucosal human papillomavirus in nongenital cancers.** J Natl Cancer Inst Monogr 2003:57-65.
115. Hellner K, Munger K. **Human papillomaviruses as therapeutic targets in human cancer.** J Clin Oncol 2011;29:1785-94.
116. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. **Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women.** N Engl J Med 1998;338:423-8.
117. Syrjanen K, Pyrhonen S, Aukee S, Koskela E. **Squamous cell papilloma of the esophagus: a tumour probably caused by human papilloma virus (HPV).** Diagn Histopathol 1982;5:291-6.
118. Syrjanen KJ. **Histological changes identical to those of condylomatous lesions found in esophageal squamous cell carcinomas.** Arch Geschwulstforsch 1982;52:283-92.
119. Acevedo-Nuno E, Gonzalez-Ojeda A, Vazquez-Camacho G, Balderas-Pena Luz Ma A, Moreno-Villa H, Montoya-Fuentes H. **Human papillomavirus DNA and protein in tissue samples of oesophageal cancer, Barrett's oesophagus and oesophagitis.** Anticancer Res 2004;24:1319-23.
120. Monk BJ, Tewari KS. **The spectrum and clinical sequelae of human papillomavirus infection.** Gynecol Oncol 2007;107:S6-13.
121. Sitas F, Urban M, Stein L, et al. **The relationship between anti-HPV-16 IgG seropositivity and cancer of the cervix, anogenital organs, oral cavity and pharynx, oesophagus and prostate in a black South African population.** Infect Agent Cancer 2007;2:6.
122. Lu XM, Monnier-Benoit S, Mo LZ, et al. **Human papillomavirus in esophageal squamous cell carcinoma of the high-risk Kazakh ethnic group in Xinjiang, China.** Eur J Surg Oncol 2008;34:765-70.
123. Syrjanen KJ. **HPV infections and oesophageal cancer.** J Clin Pathol 2002;55:721-8.
124. Weston AC, Prolla JC. **Association between esophageal squamous cell carcinoma and human papillomavirus detected by Hybrid Capture II assay.** Dis Esophagus 2003;16:224-8.

125. Souto Damin AP, Guedes Frazzon AP, de Carvalho Damin D, et al. **Detection of human papillomavirus DNA in squamous cell carcinoma of the esophagus by auto-nested PCR.** Dis Esophagus 2006;19:64-8.
126. Kulski J, Demeter T, Sterrett GF, Shilkin KB. **Human papilloma virus DNA in oesophageal carcinoma.** Lancet 1986;2:683-4.
127. Hille JJ, Margolius KA, Markowitz S, Isaacson C. **Human papillomavirus infection related to oesophageal carcinoma in black South Africans. A preliminary study.** S Afr Med J 1986;69:417-20.
128. Chang F, Shen Q, Zhou J, et al. **Detection of human papillomavirus DNA in cytologic specimens derived from esophageal precancer lesions and cancer.** Scand J Gastroenterol 1990;25:383-8.
129. Kulski JK, Demeter T, Mutavdzic S, Sterrett GF, Mitchell KM, Pixley EC. **Survey of histologic specimens of human cancer for human papillomavirus types 6/11/16/18 by filter in situ hybridization.** Am J Clin Pathol 1990;94:566-70.
130. Benamouzig R, Pigot F, Quiroga G, et al. **Human papillomavirus infection in esophageal squamous-cell carcinoma in western countries.** Int J Cancer 1992;50:549-52.
131. Loke SL, Ma L, Wong M, Srivastava G, Lo I, Bird CC. **Human papillomavirus in oesophageal squamous cell carcinoma.** J Clin Pathol 1990;43:909-12.
132. Chang F, Syrjanen S, Shen Q, Wang L, Wang D, Syrjanen K. **Human papillomavirus involvement in esophageal precancerous lesions and squamous cell carcinomas as evidenced by microscopy and different DNA techniques.** Scand J Gastroenterol 1992;27:553-63.
133. Li Y, Huang G, Xiao H, Huang Y, Mao T, Deng W. **The status of human papillomavirus 16 DNA in the tissues of human esophagus carcinoma.** Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao 1991;22:157-60.
134. Wang X, Tian X, Liu F, et al. **Detection of HPV DNA in esophageal cancer specimens from different regions and ethnic groups: a descriptive study.** BMC Cancer 2010;10:19.
135. Tornesello ML, Monaco R, Nappi O, Buonaguro L, Buonaguro FM. **Detection of mucosal and cutaneous human papillomaviruses in oesophagitis, squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the oesophagus.** J Clin Virol 2009;45:28-33.
136. Lyronis ID, Baritaki S, Bizakis I, Krambovitis E, Spandidos DA. **K-ras mutation, HPV infection and smoking or alcohol abuse positively correlate with esophageal squamous carcinoma.** Pathol Oncol Res 2008;14:267-73.

137. Dreilich M, Bergqvist M, Moberg M, et al. **High-risk human papilloma virus (HPV) and survival in patients with esophageal carcinoma: a pilot study.** BMC Cancer 2006;6:94.
138. de Villiers EM, Gunst K, Stein H, Scherubl H. **Esophageal squamous cell cancer in patients with head and neck cancer: Prevalence of human papillomavirus DNA sequences.** Int J Cancer 2004;109:253-8.
139. Castillo A, Aguayo F, Koriyama C, et al. **Human papillomavirus in esophageal squamous cell carcinoma in Colombia and Chile.** World J Gastroenterol 2006;12:6188-92.
140. Zhou XB, Guo M, Quan LP, et al. **Detection of human papillomavirus in Chinese esophageal squamous cell carcinoma and its adjacent normal epithelium.** World J Gastroenterol 2003;9:1170-3.
141. Farhadi M, Tahmasebi Z, Merat S, Kamangar F, Nasrollahzadeh D, Malekzadeh R. **Human papillomavirus in squamous cell carcinoma of esophagus in a high-risk population.** World J Gastroenterol 2005;11:1200-3.
142. Koh JS, Lee SS, Baek HJ, Kim YI. **No association of high-risk human papillomavirus with esophageal squamous cell carcinomas among Koreans, as determined by polymerase chain reaction.** Dis Esophagus 2008;21:114-7.
143. White RE, Mungatana C, Mutuma G, et al. **Absence of human papillomavirus in esophageal carcinomas from southwestern Kenya.** Dis Esophagus 2005;18:28-30.
144. Cao B, Tian X, Li Y, et al. **LMP7/TAP2 gene polymorphisms and HPV infection in esophageal carcinoma patients from a high incidence area in China.** Carcinogenesis 2005;26:1280-4.
145. Matsha T, Erasmus R, Kafuko AB, Mugwanya D, Stepien A, Parker MI. **Human papillomavirus associated with oesophageal cancer.** J Clin Pathol 2002;55:587-90.
146. Si HX, Tsao SW, Poon CS, Wang LD, Wong YC, Cheung AL. **Viral load of HPV in esophageal squamous cell carcinoma.** Int J Cancer 2003;103:496-500.
147. Szentirmay Z, Szanto I, Balint I, et al. **[Causal association between human papilloma virus infection and head and neck and esophageal squamous cell carcinoma].** Magy Onkol 2002;46:35-41.
148. Kamath AM, Wu TT, Heitmiller R, Daniel R, Shah KV. **Investigation of the association of esophageal carcinoma with human papillomaviruses.** Dis Esophagus 2000;13:122-4.
149. Bahnassy AA, Zekri AR, Abdallah S, El-Shehaby AM, Sherif GM. **Human papillomavirus infection in Egyptian esophageal carcinoma: correlation with p53, p21, mdm2, C-erbB2 and impact on survival.** Pathol Int 2005;55:53-62.

150. Pantelis A, Pantelis D, Ruemmele P, et al. **p53 Codon 72 polymorphism, loss of heterozygosity and high-risk human papillomavirus infection in a low-incidence German esophageal squamous cell carcinoma patient cohort.** *Oncol Rep* 2007;17:1243-8.
151. Shuyama K, Castillo A, Aguayo F, et al. **Human papillomavirus in high- and low-risk areas of oesophageal squamous cell carcinoma in China.** *Br J Cancer* 2007;96:1554-9.
152. Zhang D, Zhang Q, Zhou L, et al. **Comparison of prevalence, viral load, physical status and expression of human papillomavirus-16, -18 and -58 in esophageal and cervical cancer: a case-control study.** *BMC Cancer* 2010;10:650.
153. Koshiol J, Wei WQ, Kreimer AR, et al. **No role for human papillomavirus in esophageal squamous cell carcinoma in China.** *Int J Cancer* 2010;127:93-100.
154. Antonsson A, Nancarrow DJ, Brown IS, et al. **High-risk human papillomavirus in esophageal squamous cell carcinoma.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;19:2080-7.
155. Castillo A, Koriyama C, Higashi M, et al. **Human papillomavirus in upper digestive tract tumors from three countries.** *World J Gastroenterol* 2011;17:5295-304.
156. Guo F, Liu Y, Wang X, et al. **Human Papillomavirus Infection and Esophageal Squamous Cell Carcinoma: A Case-Control Study.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2012;21:780-5.
157. Gupta N, Barwad A, Rajwanshi A, Kochhar R. **Prevalence of human papilloma virus in esophageal carcinomas: a polymerase chain reaction-based study.** *Acta Cytol* 2012;56:80-4.
158. Herrera-Goepfert R, Lizano M, Akiba S, Carrillo-Garcia A, Becker-D'Acosta M. **Human papilloma virus and esophageal carcinoma in a Latin-American region.** *World J Gastroenterol* 2009;15:3142-7.
159. Erol D, Bulut Y, Yuce H, Ozercan IH. **[Investigation of the presence of human papillomavirus DNA in various gastrointestinal carcinoma samples].** *Mikrobiyol Bul* 2009;43:259-68.
160. Ding GC, Ren JL, Chang FB, et al. **Human papillomavirus DNA and P16(INK4A) expression in concurrent esophageal and gastric cardia cancers.** *World J Gastroenterol* 2010;16:5901-6.
161. Zhang QY, Zhang DH, Shen ZY, Xu LY, Li EM, Au WW. **Infection and integration of human papillomavirus in esophageal carcinoma.** *Int J Hyg Environ Health* 2011;214:156-61.
162. Kornegay JR, Roger M, Davies PO, et al. **International proficiency study of a consensus L1 PCR assay for the detection and typing of human papillomavirus DNA: evaluation of accuracy and intralaboratory and interlaboratory agreement.** *J Clin Microbiol* 2003;41:1080-6.

163. Remmerbach TW, Brinckmann UG, Hemprich A, Chekol M, Kuhndel K, Liebert UG. **PCR detection of human papillomavirus of the mucosa: comparison between MY09/11 and GP5+/6+ primer sets.** J Clin Virol 2004;30:302-8.
164. Ruutu MP, Kulmala SM, Peitsaro P, Syrjanen SM. **The performance of the HPV16 real-time PCR integration assay.** Clin Biochem 2008;41:423-8.
165. Kleter B, van Doorn LJ, ter Schegget J, et al. **Novel short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of anogenital human papillomaviruses.** Am J Pathol 1998;153:1731-9.
166. Kleter B, van Doorn LJ, Schrauwen L, et al. **Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus.** J Clin Microbiol 1999;37:2508-17.
167. Baay MF, Quint WG, Koudstaal J, et al. **Comprehensive study of several general and type-specific primer pairs for detection of human papillomavirus DNA by PCR in paraffin-embedded cervical carcinomas.** J Clin Microbiol 1996;34:745-7.
168. Li T, Lu ZM, Chen KN, et al. **Human papillomavirus type 16 is an important infectious factor in the high incidence of esophageal cancer in Anyang area of China.** Carcinogenesis 2001;22:929-34.
169. Gholipour C, Shalchi RA, Abbasi M. **A histopathological study of esophageal cancer on the western side of the Caspian littoral from 1994 to 2003.** Dis Esophagus 2008;21:322-7.
170. Tran GD, Sun XD, Abnet CC, et al. **Prospective study of risk factors for esophageal and gastric cancers in the Linxian general population trial cohort in China.** Int J Cancer 2005;113:456-63.
171. Engel LS, Chow WH, Vaughan TL, et al. **Population attributable risks of esophageal and gastric cancers.** J Natl Cancer Inst 2003;95:1404-13.
172. Bosetti C, Levi F, Ferlay J, et al. **Trends in oesophageal cancer incidence and mortality in Europe.** Int J Cancer 2008;122:1118-29.
173. Lepage C, Rachet B, Jooste V, Faivre J, Coleman MP. **Continuing rapid increase in esophageal adenocarcinoma in England and Wales.** Am J Gastroenterol 2008;103:2694-9.
174. Islami F, Kamangar F. **Helicobacter pylori and esophageal cancer risk: a meta-analysis.** Cancer Prev Res (Phila) 2008;1:329-38.
175. Simard EP, Ward EM, Siegel R, Jemal A. **Cancers with increasing incidence trends in the United States: 1999 through 2008.** CA Cancer J Clin 2012.
176. Cook MB, Chow WH, Devesa SS. **Oesophageal cancer incidence in the United States by race, sex, and histologic type, 1977-2005.** Br J Cancer 2009;101:855-9.

177. Dahlstrand H, Nasman A, Romanitan M, Lindquist D, Ramqvist T, Dalianis T. **Human papillomavirus accounts both for increased incidence and better prognosis in tonsillar cancer.** *Anticancer Res* 2008;28:1133-8.
178. Kreimer AR, Alberg AJ, Daniel R, et al. **Oral human papillomavirus infection in adults is associated with sexual behavior and HIV serostatus.** *J Infect Dis* 2004;189:686-98.
179. Kamangar F, Qiao YL, Schiller JT, et al. **Human papillomavirus serology and the risk of esophageal and gastric cancers: results from a cohort in a high-risk region in China.** *Int J Cancer* 2006;119:579-84.
180. Evander M, Edlund K, Boden E, et al. **Comparison of a one-step and a two-step polymerase chain reaction with degenerate general primers in a population-based study of human papillomavirus infection in young Swedish women.** *J Clin Microbiol* 1992;30:987-92.
181. Chaiwongkot A, Pientong C, Ekalaksananan T, et al. **Evaluation of primers and PCR performance on HPV DNA screening in normal and low grade abnormal cervical cells.** *Asian Pac J Cancer Prev* 2007;8:279-82.
182. Qu W, Jiang G, Cruz Y, et al. **PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems.** *J Clin Microbiol* 1997;35:1304-10.
183. Xu WG, Zhang LJ, Lu ZM, Li JY, Ke Y, Xu GW. **[Detection of human papillomavirus type 16 E6 mRNA in carcinomas of upper digestive tract].** *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2003;83:1910-4.
184. Koshiol J, Wei WQ, Kreimer AR, et al. **The gastric cardia is not a target for human papillomavirus-induced carcinogenesis.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;19:1137-9.
185. Yoshida T, Sano T, Oyama T, Kanuma T, Fukuda T. **Prevalence, viral load, and physical status of HPV 16 and 18 in cervical adenosquamous carcinoma.** *Virchows Arch* 2009;455:253-9.
186. Masand RP, El-Mofty SK, Ma XJ, Luo Y, Flanagan JJ, Lewis JS, Jr. **Adenosquamous carcinoma of the head and neck: relationship to human papillomavirus and review of the literature.** *Head Neck Pathol* 2011;5:108-16.
187. Wain SL, Kier R, Vollmer RT, Bossen EH. **Basaloid-squamous carcinoma of the tongue, hypopharynx, and larynx: report of 10 cases.** *Hum Pathol* 1986;17:1158-66.
188. Akagi I, Miyashita M, Makino H, Nomura T, Ohkawa K, Tajiri T. **Basaloid squamous cell carcinoma of the esophagus: report of two cases.** *J Nihon Med Sch* 2008;75:354-60.

189. Poetsch M, Lorenz G, Bankau A, Kleist B. **Basaloid in contrast to nonbasaloid head and neck squamous cell carcinomas display aberrations especially in cell cycle control genes.** *Head Neck* 2003;25:904-10.
190. Wilczynski SP, Lin BT, Xie Y, Paz IB. **Detection of human papillomavirus DNA and oncoprotein overexpression are associated with distinct morphological patterns of tonsillar squamous cell carcinoma.** *Am J Pathol* 1998;152:145-56.
191. Strati K, Pitot HC, Lambert PF. **Identification of biomarkers that distinguish human papillomavirus (HPV)-positive versus HPV-negative head and neck cancers in a mouse model.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:14152-7.
192. Williams GR, Lu QL, Love SB, Talbot IC, Northover JM. **Properties of HPV-positive and HPV-negative anal carcinomas.** *J Pathol* 1996;180:378-82.
193. Cubilla AL, Reuter VE, Gregoire L, et al. **Basaloid squamous cell carcinoma: a distinctive human papilloma virus-related penile neoplasm: a report of 20 cases.** *Am J Surg Pathol* 1998;22:755-61.
194. Gregoire L, Cubilla AL, Reuter VE, Haas GP, Lancaster WD. **Preferential association of human papillomavirus with high-grade histologic variants of penile-invasive squamous cell carcinoma.** *J Natl Cancer Inst* 1995;87:1705-9.
195. Trimble CL, Hildesheim A, Brinton LA, Shah KV, Kurman RJ. **Heterogeneous etiology of squamous carcinoma of the vulva.** *Obstet Gynecol* 1996;87:59-64.
196. Kurman RJ, Toki T, Schiffman MH. **Basaloid and warty carcinomas of the vulva. Distinctive types of squamous cell carcinoma frequently associated with human papillomaviruses.** *Am J Surg Pathol* 1993;17:133-45.
197. Bellizzi AM, Woodford RL, Moskaluk CA, Jones DR, Kozower BD, Stelow EB. **Basaloid squamous cell carcinoma of the esophagus: assessment for high-risk human papillomavirus and related molecular markers.** *Am J Surg Pathol* 2009;33:1608-14.
198. McNairn AJ, Guasch G. **Epithelial transition zones: merging microenvironments, niches, and cellular transformation.** *Eur J Dermatol* 2011;21 Suppl 2:21-8.
199. Poljak M, Cerar A, Seme K. **Human papillomavirus infection in esophageal carcinomas: a study of 121 lesions using multiple broad-spectrum polymerase chain reactions and literature review.** *Hum Pathol* 1998;29:266-71.
200. Ha PK, Pai SI, Westra WH, et al. **Real-time quantitative PCR demonstrates low prevalence of human papillomavirus type 16 in premalignant and malignant lesions of the oral cavity.** *Clin Cancer Res* 2002;8:1203-9.
201. Arias-Pulido H, Peyton CL, Joste NE, Vargas H, Wheeler CM. **Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer.** *J Clin Microbiol* 2006;44:1755-62.

202. Akutsu N, Shirasawa H, Nakano K, et al. **Rare association of human papillomavirus DNA with esophageal cancer in Japan.** J Infect Dis 1995;171:425-8.
203. Smits HL, Tjong AHSP, ter Schegget J, Nooter K, Kok T. **Absence of human papillomavirus DNA from esophageal carcinoma as determined by multiple broad spectrum polymerase chain reactions.** J Med Virol 1995;46:213-5.
204. Benamouzig R, Jullian E, Chang F, et al. **Absence of human papillomavirus DNA detected by polymerase chain reaction in French patients with esophageal carcinoma.** Gastroenterology 1995;109:1876-81.
205. Suzuk L, Noffsinger AE, Hui YZ, Fenoglio-Preiser CM. **Detection of human papillomavirus in esophageal squamous cell carcinoma.** Cancer 1996;78:704-10.
206. Turner JR, Shen LH, Crum CP, Dean PJ, Odze RD. **Low prevalence of human papillomavirus infection in esophageal squamous cell carcinomas from North America: analysis by a highly sensitive and specific polymerase chain reaction-based approach.** Hum Pathol 1997;28:174-8.
207. Briolat J, Dalstein V, Saunier M, et al. **HPV prevalence, viral load and physical state of HPV-16 in cervical smears of patients with different grades of CIN.** Int J Cancer 2007;121:2198-204.
208. Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. **Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract.** Cancer Res 2004;64:3878-84.
209. Hesselink AT, van Ham MA, Heideman DA, et al. **Comparison of GP5+/6+-PCR and SPF10-line blot assays for detection of high-risk human papillomavirus in samples from women with normal cytology results who develop grade 3 cervical intraepithelial neoplasia.** J Clin Microbiol 2008;46:3215-21.
210. Ylitalo N, Sorensen P, Josefsson AM, et al. **Consistent high viral load of human papillomavirus 16 and risk of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study.** Lancet 2000;355:2194-8.
211. van Duin M, Snijders PJ, Schrijnemakers HF, et al. **Human papillomavirus 16 load in normal and abnormal cervical scrapes: an indicator of CIN II/III and viral clearance.** Int J Cancer 2002;98:590-5.
212. Snijders PJ, van den Brule AJ, Meijer CJ. **The clinical relevance of human papillomavirus testing: relationship between analytical and clinical sensitivity.** J Pathol 2003;201:1-6.
213. Moberg M, Gustavsson I, Gyllensten U. **Type-specific associations of human papillomavirus load with risk of developing cervical carcinoma in situ.** Int J Cancer 2004;112:854-9.

214. Snijders PJ, Hogewoning CJ, Hesselink AT, et al. **Determination of viral load thresholds in cervical scrapings to rule out CIN 3 in HPV 16, 18, 31 and 33-positive women with normal cytology.** *Int J Cancer* 2006;119:1102-7.
215. Stoler MH, Castle PE, Solomon D, Schiffman M. **The expanded use of HPV testing in gynecologic practice per ASCCP-guided management requires the use of well-validated assays.** *Am J Clin Pathol* 2007;127:335-7.
216. Ben-Ezra J, Johnson DA, Rossi J, Cook N, Wu A. **Effect of fixation on the amplification of nucleic acids from paraffin-embedded material by the polymerase chain reaction.** *J Histochem Cytochem* 1991;39:351-4.
217. Goodrow TL, Prahalada SR, Storer RD, et al. **Polymerase chain reaction/sequencing analysis of ras mutations in paraffin-embedded tissues as compared with 3T3 transfection and polymerase chain reaction/sequencing of frozen tumor deoxyribonucleic acids.** *Lab Invest* 1992;66:504-11.
218. Thompson CH, Rose BR. **Deleterious effects of formalin/acetic acid/alcohol (FAA) fixation on the detection of HPV DNA by in situ hybridization and the polymerase chain reaction.** *Pathology* 1991;23:327-30.
219. Karlsen F, Kalantari M, Chitemerere M, Johansson B, Hagmar B. **Modifications of human and viral deoxyribonucleic acid by formaldehyde fixation.** *Lab Invest* 1994;71:604-11.
220. Scherubl H, von Lampe B, Faiss S, et al. **Screening for oesophageal neoplasia in patients with head and neck cancer.** *Br J Cancer* 2002;86:239-43.
221. Shiozaki H, Tahara H, Kobayashi K, et al. **Endoscopic screening of early esophageal cancer with the Lugol dye method in patients with head and neck cancers.** *Cancer* 1990;66:2068-71.
222. Makuuchi H, Machimura T, Shimada H, et al. **Endoscopic screening for esophageal cancer in 788 patients with head and neck cancers.** *Tokai J Exp Clin Med* 1996;21:139-45.
223. Tincani AJ, Brandalise N, Altemani A, et al. **Diagnosis of superficial esophageal cancer and dysplasia using endoscopic screening with a 2% lugol dye solution in patients with head and neck cancer.** *Head Neck* 2000;22:170-4.
224. Tincani AJ, Brandalise N, Andreollo NA, et al. **[Importance of upper digestive endoscopy using lugol dye solution for the diagnosis of superficial esophageal cancer and dysplasia in patients with head and neck neoplasms].** *Arq Gastroenterol* 2000;37:107-13.
225. Ruge M, Bovo D, Busatto G, et al. **p53 alterations but no human papillomavirus infection in preinvasive and advanced squamous esophageal cancer in Italy.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997;6:171-6.

226. Gao GF, Roth MJ, Wei WQ, et al. **No association between HPV infection and the neoplastic progression of esophageal squamous cell carcinoma: result from a cross-sectional study in a high-risk region of China.** *Int J Cancer* 2006;119:1354-9.
227. Sonnex C, Strauss S, Gray JJ. **Detection of human papillomavirus DNA on the fingers of patients with genital warts.** *Sex Transm Infect* 1999;75:317-9.
228. Strauss S, Sastry P, Sonnex C, Edwards S, Gray J. **Contamination of environmental surfaces by genital human papillomaviruses.** *Sex Transm Infect* 2002;78:135-8.
229. Ferenczy A, Bergeron C, Richart RM. **Human papillomavirus DNA in fomites on objects used for the management of patients with genital human papillomavirus infections.** *Obstet Gynecol* 1989;74:950-4.
230. Roden RB, Lowy DR, Schiller JT. **Papillomavirus is resistant to desiccation.** *J Infect Dis* 1997;176:1076-9.
231. Chung CH, Gillison ML. **Human papillomavirus in head and neck cancer: its role in pathogenesis and clinical implications.** *Clin Cancer Res* 2009;15:6758-62.
232. Rodrigues AC. **Variáveis socioeconômicas em pacientes oncológicos adultos em tratamento quimioterápico no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.** 2007. 117f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre; 2007.
233. Koshiol J, Kreimer AR. **Lessons from Australia: human papillomavirus is not a major risk factor for esophageal squamous cell carcinoma.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;19:1889-92.

ARTIGO EM INGLÊS

Name of journal: *World Journal of Gastroenterology*

No Evidence of HPV-DNA in Esophageal Squamous Cell Carcinoma in a population of Southern Brazil

Antunes LCM et al. HPV and Esophageal Squamous Cell Carcinoma

Luís Carlos Moreira Antunes, João Carlos Prolla, Antonio de Barros Lopes, Marta Pires da Rocha, Renato Borges Fagundes

Luís Carlos Moreira Antunes, João Carlos Prolla, Antonio de Barros Lopes, Renato Borges Fagundes, Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul 90035-003, Brasil

Renato Borges Fagundes, Departamento de Clínica Médica – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul 97119-900, Brasil

Luís Carlos Moreira Antunes, Marta Pires da Rocha, Hospital Universitário de Santa Maria – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul 97119-900, Brasil

Author contributions: Antunes LCM and Fagundes RB designed the research and wrote the manuscript; Antunes LCM performed the research; Rocha MP was the pathologist responsible for diagnosis of cases; Prolla JC and Lopes AB reviewed the manuscript draft and made substantial contribution for the final version.

Correspondence to: Renato Borges Fagundes, MD, PhD, Professor of Medicine, Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Ramiro Barcelos, 2400 – 2º andar, Bairro Santana, Porto Alegre 90035-003, Rio Grande do Sul, Brasil. fagundesrb@gmail.com
Phone: +55-51-81018818 Fax: +55-51-33085616

Abstract

Aim: To investigate the association between human papillomavirus (HPV) and esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) in southern Brazil.

Methods: We studied 189 esophageal samples from 125 patients from three different groups: (a) 102 biopsies from 51 patients with ESCC, with one sample from the tumor and another from normal esophageal mucosa distant from the tumor; (b) 50 esophageal biopsies from 37 patients with a previous diagnosis of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC); and (c) 37 biopsies from esophageal mucosa with normal appearance from 37 dyspeptic patients, not exposed to smoking or alcohol consumption. Nested-PCR with the MY09/11 and GP5/6 L1 primers was used to detect HPV L1 in samples fixed in formalin and stored in paraffin blocks. All PCR reactions were performed with a positive control (cervicovaginal samples), with a negative control (Human Genomic DNA) and with a blank reaction containing all reagents except DNA. We took extreme care to prevent DNA contamination in sample collection, processing, and testing.

Results: The histological biopsies confirmed the diagnosis of ESCC in 52 samples (51 from ESCC group and 1 from the HNSCC group) and classified as well differentiated (12/52, 23.1%), moderately differentiated (27/52, 51.9%) or poorly differentiated (7/52, 13.5%). One hundred twenty-eight esophageal biopsies were considered normal (51 from the ESCC group, 42 from the HNSCC group and 35 from dyspeptic patients). Nine had esophagitis (7 from the HNSCC and 2 from dyspeptic patients). Of a total of 189 samples, only 6 samples had insufficient material for PCR analysis: 1 from mucosa distant from the tumor in a patient with ESCC, 3 from patients with HNSCC and 2 from patients without cancer. In 183 samples (96.8%) GAPDH, G3PDH and/or β -globin were amplified, thus indicating the adequacy of the DNA in those samples. HPV DNA was negative in all the 183 samples tested: 52 with ESCC, 9 with esophagitis and 122 with normal esophageal mucosa.

Conclusion: There was no evidence of HPV infection in different ESCC from southern Brazil.

Keywords: Esophageal cancer; esophageal squamous cell carcinoma; human papillomavirus; head and neck cancer; polymerase chain reactions; nested PCR.

Core tip: This paper gives additional evidence related to the controversy on the potential role of HPV in the pathogenesis of esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). Taking great care to avoid contamination by environmental HPV and using a very sensitive HPV DNA detection technique, we found no evidence of HPV neither in ESCC tumor tissue, nor in esophageal non-tumoral tissue from ESCC patients, or from head and neck squamous cell carcinoma patients or from dyspeptic controls without cancer. These data convincingly argue that when environmental contamination is carefully controlled, there is no evidence that HPV is involved in ESCC carcinogenesis in southern Brazil.

INTRODUCTION

Worldwide, esophageal cancer is the eighth most common cancer and the sixth most common cause of death from cancer, with an estimated incidence of 482,000 new cases and 407,000 deaths in 2008^[1]. Esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) is still the most common type worldwide and its known risk factors are smoking and excessive alcohol consumption, poor nutritional and socio-economic status, exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), low consumption of fruits and vegetables, ingestion of hot beverages, genetic factors, history of caustic injury in the esophagus, and history of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC)^[2-4]. In Brazil, the highest rates of esophageal cancer occur in the country's southernmost state, Rio Grande do Sul, where the rate of incidence is considered moderate with 18.01 cases per 100,000 men and 6.60 cases per 100,000 women^[5]. In the south of Brazil the most important risk factors are the combination of smoking and excessive alcohol consumption^[5], however, the consumption of a hot beverage made with the infusion of *Ilex paraguayensis* (also known as *yerba mate*) is also a risk

factor^[6]. This beverage is often consumed at high temperatures and contains high levels of PAH^[7].

The role of human papillomavirus (HPV) in the development of ESCC remains controversial^[8-12]. Two studies conducted in southern Brazil, each using a different technique, showed different results regarding the association between ESCC and HPV^[13, 14]. Therefore, to clarify the association between HPV infection and ESCC in southern Brazil, we looked for the presence of HPV DNA in esophageal biopsies from: (a) primary tumor and mucosa without neoplasia from patients with ESCC; (b) Lugol stained and unstained areas in patients with HNSCC; and (c) normal appearing mucosa from patients not exposed to tobacco or alcohol.

MATERIALS AND METHODS

Ethics

The study was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria and of the Federal University of Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil. Informed consent was obtained from each participant before they underwent upper GI endoscopy.

Patients and Tissues

We evaluated 189 consecutive esophageal samples, collected in Santa Maria, a city in the central region of Rio Grande do Sul, the most southern state in Brazil, from 2008 to 2011. We included 51 samples from esophageal tumors and 51 samples from non-tumoral areas of the esophagus of patients with ESCC. We analyzed 50 esophageal biopsies (32 from Lugol stained areas, 17 from unstained areas and 1 from tumor) from patients diagnosed with HNSCC. Neither the patients with ESCC nor those with HNSCC had received chemotherapy or radiotherapy before the sample collection. We also collected biopsies from the normal middle esophagus of thirty-seven non-smoking and non-alcohol drinking dyspeptic patients who underwent upper GI endoscopy.

We collected demographic data (sex, age, place of birth, occupation) and information regarding smoking habits, alcohol consumption and previous history of

cancer.

The samples were fixed in neutral buffered formalin, embedded in paraffin, cut and stained with Hematoxylin-Eosin. For DNA extraction, one slice at least 5 μm thick, as recommended for PCR amplification, was cut from the paraffin-embedded tissues^[15]. To minimize the risk of contamination, the materials used to process the sample stored in the paraffin block were completely disposable and used once per sample. In addition, the microtome sample holder was washed with absolute alcohol and the blade was replaced before each block was cut. Different rooms were used for DNA extraction, preparing the DNA solution, adding the DNA samples to the PCR solution and electrophoresis analysis. The rooms could only be accessed through antechambers with a single flow of material. All PCR reactions were performed with a positive control (cervicovaginal samples), with a negative control (Human Genomic DNA, Cat. no. G304A, Promega, Madison, WI, USA) and with a blank reaction containing all reagents except DNA.

The same method was also employed to test for the presence of HPV DNA in thirty-five samples of primary tumor from patients with HNSCC.

DNA Extraction and PCR

Once the samples were de-waxed, the DNA was extracted using the Qiagen QIAamp DNA Mini Kit (Valencia, California) according to manufacturer's instructions. DNA quantification and purity were determined by optical density in a spectrophotometer (Thermo Scientific NanoDrop 2000).

The DNA (25-80 ng) from each sample was amplified by PCR. The integrity of the DNA samples was observed by amplifying the human conserved genes GAPDH, G3PDH and β -globin. The sequences of the HPV L1 gene were amplified by nested-PCR using two general primer sets: MY09/MY11 (MY09: 5'-GTCCMARRGGAWACTGATC-3', MY11: 5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3') in the first amplification step to produce a 450 bp fragment; and GP5/GP6 (GP5: 5'-TTTGTTACTGTGGTAGATAC-3', GP6: 5'-ACTAAATGTCAAATAAAAAG-3') in the second step to produce 150 bp fragments of the PCR product. In the first step, PCR was performed with a reaction mixture containing 50 μl , including 5.0 μl of the

genome from the extracted DNA sample, 5.0 ul 10 x PCR buffer, 5.0 ul of dNTP (2.5 mM), 1.2 ul of MgCl₂ (50 mM), 0.5 ul of Taq DNA polymerase and 0.2 ul (500 pmol/ul) of the MY09 and MY11 primers. In the second step, which also had a final volume of 50 ul, 1.0 ul (500 pmol/ul) of the GP5 and GP6 primers was used. The PCR mixture was subjected to 40 amplification cycles, each consisting of an initial denaturation step at 94°C for 30 sec, annealment at 56°C for 1 min and extension at 72°C for 1 min. The PCR products were separated by eletrophoresis on 2% agarose gel and visualized by staining with ethidium bromide by electrophoresis (Figure 1).

Statistical analysis

The variables were expressed as mean and standard deviation (SD) or numbers and percents. Associations would have been considered statistically significant when a two-sided p-value was ≤ 0.05 . All statistical analyzes were performed with the aid of SPSS 11 (Statistical Package for Social Sciences).

RESULTS

Patient Characteristics

We included 125 individuals divided in three groups (Table 1): (a) 51 patients with ESCC, 43 male (84.3%) with a mean age of 60.1 ± 10.3 years; (b) 37 patients with previous diagnosis of HNSCC, 34 males (91.9%) with a mean age of 57.8 ± 8.4 years; and (c) 37 dyspeptic patients, 12 males (32.4%) with a mean age of 56.8 ± 17.7 years.

Histology

We studied 189 esophageal biopsy samples. All fifty-two biopsies from tumoral areas (51 from the ESCC group and 1 from the HNSCC group) were diagnosed as squamous cell carcinoma and classified as well differentiated (12/52, 23.1%), moderately differentiated (27/52, 51.9%) or poorly differentiated (7/52, 13.5%). None of the 51 samples of esophageal mucosa distant from the tumor in the ESCC group showed malignancy.

In the patients with HNSCC, we performed 55 esophageal biopsies. Their histological analysis showed the following findings: forty-two were normal (76.4%),

seven had esophagitis (12.7%), one contained ESCC (1.8%) and five had insufficient tissue for histological analysis (9.1%).

In the biopsies of normal esophagus in the dyspeptic patients, 35 were considered normal and 2 had mild esophagitis.

PCR analysis

The average DNA concentration in the samples was 214.68 ng/uL (range: 8-1313), with a mean ratio between the absorbance readings at 260 nm and 280 nm wavelengths of 2.12 (range 1.15 to 5.95). GAPDH, G3PDH and/or β -globin were amplified in 183 (96.8%) esophageal biopsies, showing that the DNA was adequate for analysis. These conserved human genes were not amplified in only six samples, all with normal esophageal mucosa (1 from mucosa distant from the tumor in a patient with ESCC, 3 from patients with HNSCC and 2 from patients without cancer). The PCR results were negative for HPV DNA in all the esophageal biopsies (52 with ESCC, 9 with esophagitis and 122 with normal esophageal mucosa), as well as in all biopsies from the primary tumor of head and neck cancer.

DISCUSSION

The current study used a nested primer-based PCR test to identify HPV DNA in esophageal samples from individuals from a moderate risk area for ESCC in southern Brazil. Our results showed no evidence of HPV DNA in any of the samples of the ESCC and from non-tumoral areas of the esophagus, in the esophageal mucosa of patients with HNSCC, or in the esophageal mucosa from patients without risk factors for ESCC.

Some studies using a bovine model have found that the bovine papillomavirus is essential in the early stages of carcinogenesis of the upper digestive tract, but is not required for progression to the status of malignancy^[8, 16, 17]. Considering the possibility of this “hit-and-run” mechanism to induce oncogenesis in the esophagus in humans, we included samples with and without cancer from the esophageal mucosa of patients with ESCC and esophageal mucosal samples from

patients with HNSCC. In order to enhance the detection of ESCC precursor lesions, all patients with HNSCC underwent upper endoscopy with mucosal iodine staining and biopsy of stained and unstained areas^[18-21]. However, all samples were negative for HPV DNA, both in the primary tumors and in the esophageal mucosa without neoplasia of patients with ESCC or HSNCC and in the group without cancer who were not exposed to tobacco or alcohol. The consistent presence of the GAPDH, G3PDH or β -globin genes in the samples indicated that the specimens were suitable for DNA analysis.

We used the nested primer-based PCR system with the MY11-MY09 consensus primers in combination with another general primer pair, GP5-GP6, positioned within the former. According to Evander et al.^[22], this two-step PCR amplification is able to detect 1 to 10 copies of the HPV 16 genome, while the use of isolated pairs of primers MY11-MY09 or GP5-GP6 detect 100 and 10 copies, respectively. Thus, we used a technique with good yield for samples with low viral load. In addition, the MY11-MY09 primer is highly capable of detecting multiple HPV types within a given sample^[23]. Furthermore, the inner primer pair GP5-GP6 spans a shorter region (about 150 bp), which is useful when the DNA is isolated from paraffin-embedded tissue fixed with formalin^[24-27]. More sensitive techniques can be used to detect HPV DNA, but as Ha et al.^[28] suggest, without at least one copy of the viral genome per cell, a clonal relationship cannot be established; therefore, a sufficient number of copies of HPV affecting most of the cells in the lesion is required. Hence, we believe that our technique was sufficiently sensitive to accurately detect the presence of HPV DNA in tissue samples from the aero-digestive tract.

In southern Brazil, Weston and Prolla^[13] analyzed 40 ESCC samples and 10 benign esophageal biopsies from patients without cancer. Using the Hybrid Capture II test, they detected HPV DNA in only one case of ESCC and in one benign specimen. Subsequently, Damin et al.^[14] reported detecting HPV in 15.75% of ESCC patients (26/165) and in none of the specimens of benign esophagus (0/26) using auto-nested PCR with the GP5 + / GP6 + consensus primer pair. Some features of our study that differed from these two previous HPV studies conducted in southern

Brazil are: (1) the extreme care we took to prevent DNA contamination throughout the specimen processing and testing; (2) the use of a more highly sensitive HPV detection method; and (3) the assessment of possible precursor lesions in the non-tumoral mucosa of esophagi with cancer and in the esophageal mucosa of patients with head and neck cancer.

A tissue study similar to ours was recently reported from a high-risk area of China^[29]. The authors analyzed tumor samples from 272 patients with ESCC who underwent esophagectomy at the Yaocun Commune Hospital in Linxian, in north-central China. The patients came from various regions of China, with different incidence rates of ESCC and different mortality rates for cervical cancer. HPV DNA was tested on fresh frozen tumor tissue and tumor samples fixed with formalin and stored in paraffin using PCR with the PGM1 L1 and SPF10 L1 consensus primers, respectively. Adopting careful measures to avoid contamination of the samples, similar to those used in the present study, these authors also found no cases with convincing evidence of carcinogenic HPV activity.

There are some limitations to the present study, such as the lack of information regarding sexual habits, socio-economic characteristics and the consumption of the beverage *yerba mate*, but there is no reason to think that having such information would have changed the PCR results of this study.

Our results confirm previous observations in other regions that report the absence of an association between esophageal mucosa infection by HPV and ESCC, and suggest that, in southern Brazil, this virus is not an important risk factor for squamous cell carcinoma of the esophagus.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the following individuals for their assistance: Patrícia Chaves Brites for useful suggestions in the HPV analysis, and Drs Leandro Bizarro Muller, Eduardo Buzatti Souto, Daniela Costa, Stela Maria Motta, Alexandre Rampazzo and João Carlos Cantarelli Jr for their collaboration in the upper endoscopy. Special acknowledgment is given to Dr Sanford M. Dawsey for his helpful comments on the manuscript and for his help in the English revision.

COMMENTS

Background: The high geographical variation in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) incidence observed worldwide reflects the exposure to specific environmental factors that are not completely understood. High-risk human papillomavirus (HPV) infections are present in almost all cervical cancers, beside other neoplasms in squamous epithelial-lined tissues, probably being involved in their genesis. The etiologic role HPV in ESCC remains highly controversial.

Research frontiers: A large number of controversial manuscripts have been published investigating the possible role of HPV in the etiology of esophageal cancer. In this study the authors used very sensitive HPV DNA detection technique, and evaluated the HPV presence in ESCC tumor tissue and esophageal non-tumoral tissue.

Innovations and breakthroughs: Previous studies have suggested that the HPV would have an essential role in the early stages of the ESCC. Besides ESCC tumor tissue, we also examined esophageal non-tumoral tissue from the same ESCC patients. We also analysed esophageal biopsies from patients with head and neck squamous cell carcinoma and from dyspeptic controls without cancer. We used a highly sensitive technique for detection of HPV, with nested-PCR taking the utmost care to avoid false positive results caused by samples contamination.

Applications: This study adds more evidence that HPV is not involved in esophageal carcinogenesis, and it also suggests the high prevalence of HPV in some ESCC studies can be due to contamination. Therefore, the results of this study reinforce the need of utmost care to avoid contamination in further protocols looking for HPV in tissue samples.

Terminology: Nested PCR uses two sequential sets of primers. The first pair of PCR primers amplify a fragment similar to a standard PCR. The second primer set binds to sequences in the target DNA that are within the portion amplified by the first set. Thus, the second set of primers will bind and amplify target DNA within the products of the first reaction. The advantage of nested PCR is that if the wrong PCR fragment was amplified, the probability is quite low that the region would be amplified a second time by the second set of primers.

Peer review: Overall, it is a well written and easy to follow paper that reports a hot topic about the involvement of HPV infection in the development of ESCC. The technique and the sampling procedure used are correct. The topic of the contribution of HPV to ESCC is an important one since there is a vaccine for HPV that if related to squamous cell carcinoma could have a significant impact on the public health implications of this disease. This is a well prepared manuscript that reads well.

REFERENCES

1. **Ferlay J**, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 2010;**127**:2893-917. [PMID: 21351269 DOI: 10.1002/ijc.25516]
2. **Ribeiro U, Jr.**, Posner MC, Safatle-Ribeiro AV, Reynolds JC. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oesophagus. *Br J Surg* 1996;**83**:1174-85. [PMID: 8983603]
3. **Enzinger PC**, Mayer RJ. Esophageal cancer. *N Engl J Med* 2003;**349**:2241-52. [PMID: 14657432 DOI: 10.1056/NEJMra035010]
4. **Kamangar F**, Chow WH, Abnet CC, Dawsey SM. Environmental causes of esophageal cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 2009;**38**:27-57, vii. [PMID: 19327566 PMID: PMC2685172 DOI: 10.1016/j.gtc.2009.01.004]
5. **INCA**. Estimativa 2012: Incidência de câncer no Brasil. In. Rio de Janeiro; 2011:118. Available from: URL: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>

6. **Fagundes RB**, Abnet CC, Strickland PT, et al. Higher urine 1-hydroxy pyrene glucuronide (1-OHPG) is associated with tobacco smoke exposure and drinking mate in healthy subjects from Rio Grande do Sul, Brazil. *BMC Cancer* 2006;**6**:139-145. [PMID: 16729889 PMCID: PMC1539013 DOI:10.1186/1471-2407-6-139]
7. **Kamangar F**, Schantz MM, Abnet CC, Fagundes RB, Dawsey SM. High levels of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in mate drinks. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;**17**:1262-8. [PMID: 18483349 DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-08-0025]
8. **Syrjanen KJ**. HPV infections and oesophageal cancer. *J Clin Pathol* 2002;**55**:721-8. [PMID: 12354793 PMCID: PMC1769774]
9. **Farhadi M**, Tahmasebi Z, Merat S, Kamangar F, Nasrollahzadeh D, Malekzadeh R. Human papillomavirus in squamous cell carcinoma of esophagus in a high-risk population. *World J Gastroenterol* 2005;**11**:1200-3. [PMID: 15754405]
10. **Gao GF**, Roth MJ, Wei WQ, et al. No association between HPV infection and the neoplastic progression of esophageal squamous cell carcinoma: result from a cross-sectional study in a high-risk region of China. *Int J Cancer* 2006;**119**:1354-9. [PMID: 16615110 DOI: 10.1002/ijc.21980]
11. **Koh JS**, Lee SS, Baek HJ, Kim YI. No association of high-risk human papillomavirus with esophageal squamous cell carcinomas among Koreans, as determined by polymerase chain reaction. *Dis Esophagus* 2008;**21**:114-7. [PMID: 18269645 DOI: 10.1111/j.1442-2050.2007.00726.x]
12. **Koshiol J**, Kreimer AR. Lessons from Australia: human papillomavirus is not a major risk factor for esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;**19**:1889-92. [PMID: 20696658 PMCID: PMC2921224 DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-10-0506]
13. **Weston AC**, Prolla JC. Association between esophageal squamous cell carcinoma and human papillomavirus detected by Hybrid Capture II assay. *Dis Esophagus* 2003;**16**:224-8. [PMID: 14641314]

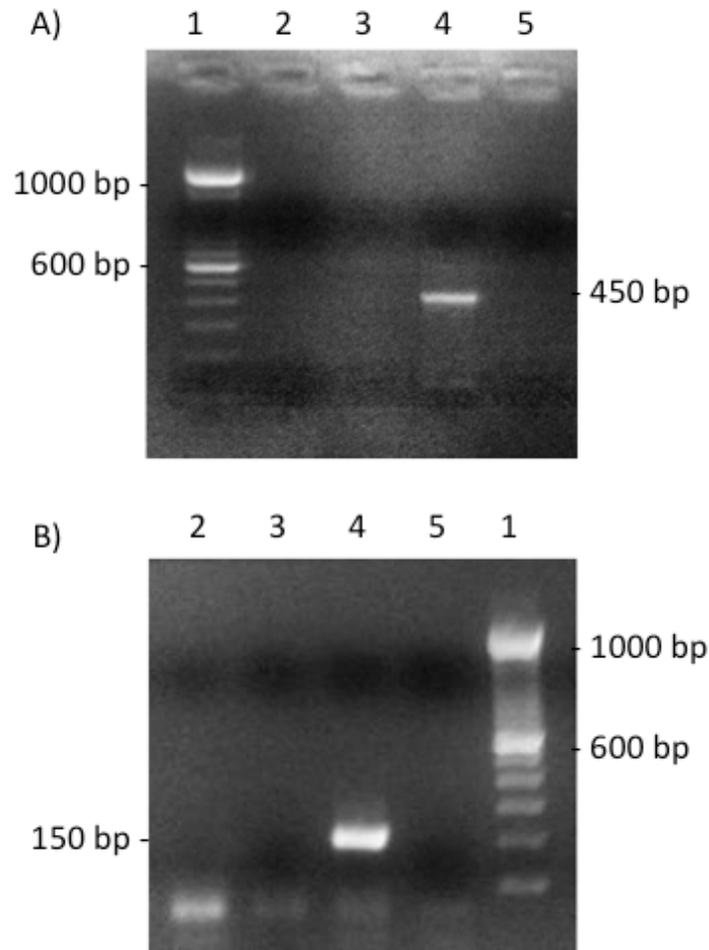
14. **Souto Damin AP**, Guedes Frazzon AP, de Carvalho Damin D, et al. Detection of human papillomavirus DNA in squamous cell carcinoma of the esophagus by auto-nested PCR. *Dis Esophagus* 2006;**19**:64-8. [PMID: 16643171]
15. **Greer CE**, Wheeler CM, Manos MM. Sample preparation and PCR amplification from paraffin-embedded tissues. *PCR Methods Appl* 1994;**3**:S113-22. [PMID: 7920232]
16. **Jarrett WF**, McNeil PE, Grimshaw WT, Selman IE, McIntyre WI. High incidence area of cattle cancer with a possible interaction between an environmental carcinogen and a papilloma virus. *Nature* 1978;**274**:215-7. [PMID: 210386]
17. **Saveria Campo M**, Moar MH, Jarrett WF, Laird HM. A new papillomavirus associated with alimentary cancer in cattle. *Nature* 1980;**286**:180-2. [PMID: 6250043]
18. **Shiozaki H**, Tahara H, Kobayashi K, et al. Endoscopic screening of early esophageal cancer with the Lugol dye method in patients with head and neck cancers. *Cancer* 1990;**66**:2068-71. [PMID: 1699649]
19. **Makuuchi H**, Machimura T, Shimada H, et al. Endoscopic screening for esophageal cancer in 788 patients with head and neck cancers. *Tokai J Exp Clin Med* 1996;**21**:139-45. [PMID: 9239817]
20. **Tincani AJ**, Brandalise N, Altemani A, et al. Diagnosis of superficial esophageal cancer and dysplasia using endoscopic screening with a 2% lugol dye solution in patients with head and neck cancer. *Head Neck* 2000;**22**:170-4. [PMID: 10679905]
21. **Scherubl H**, von Lampe B, Faiss S, et al. Screening for oesophageal neoplasia in patients with head and neck cancer. *Br J Cancer* 2002;**86**:239-43. [PMID: 11870513 PMCID: PMC2375180 DOI:[10.1038/sj.bjc.6600018](https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600018)]
22. **Evander M**, Edlund K, Boden E, et al. Comparison of a one-step and a two-step polymerase chain reaction with degenerate general primers in a population-based study of human papillomavirus infection in young Swedish women. *J Clin Microbiol* 1992;**30**:987-92. [PMID: 1315341 PMCID: PMC265198]
23. **Qu W**, Jiang G, Cruz Y, et al. PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. *J Clin Microbiol* 1997;**35**:1304-10. [PMID: 9163434 PMCID: PMC229739]

24. **Ben-Ezra J**, Johnson DA, Rossi J, Cook N, Wu A. Effect of fixation on the amplification of nucleic acids from paraffin-embedded material by the polymerase chain reaction. *J Histochem Cytochem* 1991;**39**:351-4. [PMID: 1704393]
25. **Karlsen F**, Kalantari M, Chitemerere M, Johansson B, Hagmar B. Modifications of human and viral deoxyribonucleic acid by formaldehyde fixation. *Lab Invest* 1994;**71**:604-11. [PMID: 7967515]
26. **Thompson CH**, Rose BR. Deleterious effects of formalin/acetic acid/alcohol (FAA) fixation on the detection of HPV DNA by in situ hybridization and the polymerase chain reaction. *Pathology* 1991;**23**:327-30. [PMID: 1664516]
27. **Coura R**, Prolla JC, Meurer L, Ashton-Prolla P. An alternative protocol for DNA extraction from formalin fixed and paraffin wax embedded tissue. *J Clin Pathol* 2005;**58**:894-5. [PMID: 16049299 PMCID: PMC1770874 DOI: 10.1136/jcp.2004.021352]
28. **Ha PK**, Pai SI, Westra WH, et al. Real-time quantitative PCR demonstrates low prevalence of human papillomavirus type 16 in premalignant and malignant lesions of the oral cavity. *Clin Cancer Res* 2002;**8**:1203-9. [PMID: 12006539]
29. **Koshiol J**, Wei WQ, Kreimer AR, et al. No role for human papillomavirus in esophageal squamous cell carcinoma in China. *Int J Cancer* 2010;**127**:93-100. [PMID: 19918949 PMCID: PMC3069961 DOI: 10.1002/ijc.25023]

Table 1. Clinical and demographic characteristics and risk factors of the patients

	ESCC n=51 (%)	HNSCC n= 37(%)	Not exposed n=37(%)
Age			
Range	42-79	41-78	19-87
Mean	60.1	57.8	56.8
SD	10.3	8.4	17.7
Sex			
Male	43 (84.3)	34 (91.9)	12 (32.4)
Female	8 (15.7)	3 (8.1)	25 (67.6)
Smoking			
Current	42 (82.4)	35 (94.6)	-
Ex-smokers (>10 years)	5 (9.8)	2 (5.4)	10 (27.0)
Never smoked	4 (7.8)	0 (0)	27 (73.0)
Alcohol use			
Current	27 (53.0)	31 (83.8)	-
Ex-alcohol users (>10 years)	8 (15.7)	2 (5.4)	2 (5.4)
Never used alcohol	16 (31.4)	4 (10.8)	35 (94.6)
Active smokers and alcohol users	18 (35.3)	18 (48.6)	-
Never smoked or drunk alcohol	3 (5.9)	0 (0)	26 (70.3)

Figure 1: Analysis of DNA from esophageal tumor tissue for HPV using nested-PCR for HPV L1 gene



(94.5 x 131 mm)

Figure legend:

Analysis of DNA from esophageal tumor tissue for HPV using nested-PCR for HPV L1 gene. The MY09/11 primer pair was used in the first step (A) and the GP5/GP6 primer pair was used in the second step (B). 1, DNA size marker (100 bp DNA ladder); 2, patient tumor DNA, HPV-negative; 3, HPV DNA-negative control (Human Genomic DNA); 4, HPV DNA-positive control (cervicovaginal sample); and 5, negative control containing all PCR reagents except DNA.

APÊNDICES

APÊNDICE A

A. Questionário a ser aplicado aos pacientes

Questionário nº: _____ Entrevistador: _____ Data: __/__/__

Nome: _____ Idade: _____

Endereço: _____

Telefone: Próprio () Contatos ()

Cidade: _____

ID: _____

Sexo: (1) Masculino (2) Feminino Data Nascimento: __/__/__

Profissão atual: _____

Profissão que exerceu durante mais tempo:

Local de Residência: (1) zona urbana (2) zona rural

Onde viveu mais tempo: (1) zona urbana (2) zona rural

Fuma? (1) nunca (2) no passado (3) sim. Idade que começou a fumar:

Durante quanto tempo fuma ou fumou? (calculado pelo entrevistador)?

____ anos ____ meses

Há quanto tempo parou de fumar? ____ anos ____ meses ____ dias.

Quantidade de cigarros consumidos: ____ por dia ____ por semana.

Consumo de álcool: (1) nunca (2) no passado (3) diariamente
(4) fins de semana (5) menos que uma vez por semana

Idade em que iniciou a tomar bebidas alcoólicas: ____ anos

Durante quanto tempo toma ou tomou bebidas alcoólicas (calculado pelo entrevistador): ____ anos ____ meses.

Há quanto tempo parou de tomar bebidas alcoólicas? ____ anos ____ meses ____ dias.

Tipo de bebida	Recipiente	quantidade/dia	quantidade/sem.
Cachaça			
Cerveja			
Vinho			
Outra			

Tipos de recipiente: Martelo=100ml (1), Copo=250ml (2), Cálice=100ml (3), ½ garrafa=300ml (4), Garrafa=600ml (5).

Possui o hábito de tomar chimarrão? (1) Nunca

(2) Agora não, mas sim no passado

(3) Diariamente

(4) Fins de semana

Idade em que iniciou a tomar chimarrão: _____

Tomou chimarrão por quanto tempo? ____ anos ____ meses

Há quanto tempo parou de tomar chimarrão? ____ anos ____ meses

Recipiente para chimarrão:

Recipiente	Quantidade/dia	quantidade/semana
Cuia (100 ml)		
chaleira grande (2 l)		
Garrafa termica (1 l)		

Temperatura: (1) pelando (2) quente (3) morno (4) frio

Preparo de churrasco? (1) Sim 1x/sem() 2x/sem() diariamente() (2) Não

Consumo de Verduras e Frutas

	diariamente	1-3vezes/sem	1x/sem ou -	nunca
Verduras				
Frutas				

Número de peças dentárias: _____

História previa de câncer:

(1)sim Esôfago() Língua () Boca() Laringe()

Tratamento: Cirúrgico () Quimioterapia () Radioterapia () Outros ()

Outras neoplasias: _____

Tratamento: Cirúrgico() Quimioterapia () Radioterapia () TMO ()

Outros ()

(2)não

História familiar de câncer: (1)sim (2)não

Esôfago() Língua () Boca() Laringe() Outros

APÊNDICE B

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para os pacientes dos Grupos 1 e 2

O câncer de esôfago é uma doença bastante comum no Rio Grande do Sul. As pessoas que já tiveram câncer de boca ou de garganta, ou aquelas pessoas que fumam, bebem ou tomam chimarrão diariamente têm maior chance de desenvolver o câncer de esôfago. Em algumas regiões do mundo foi encontrada associação do câncer de esôfago com o Papilomavírus Humano, o mesmo vírus causador do câncer de colo de útero.

Estamos realizando um trabalho onde pretendemos investigar se no Rio Grande do Sul a infecção pelo Papilomavírus Humano pode aumentar o risco de uma pessoa desenvolver câncer de esôfago. Desta forma pretendemos, identificar pessoas que estão sob maior risco de apresentar câncer, antes mesmo de a doença aparecer.

Para realizar a pesquisa é necessário coletar pequenas amostras da parte interna do seu esôfago (biópsias). Isto será realizado durante a endoscopia que você fará. A endoscopia não será feita exclusivamente para a pesquisa e sim porque você precisa realizá-la por indicação do seu médico.

Para fazer a endoscopia você precisa estar em jejum de pelo menos 8 a 12 horas. Antes do exame você terá sua garganta anestesiada com um spray, em seguida você receberá uma injeção na veia que lhe deixará com sono e irá ajudá-lo a tolerar melhor o exame, tendo efeito durante poucas horas. A endoscopia é feita através da passagem de uma sonda endoscópica com uma luz e uma câmera na ponta, que permite ver por dentro seu esôfago, estômago e o início do intestino. A maioria das pessoas tolera muito bem este exame, que dura de 10 a 15 minutos. Porém durante a endoscopia você pode apresentar tosse, ânsia de vômito e raramente depressão respiratória devido ao sedativo. Raramente sangramentos, reações alérgicas ou perfuração do esôfago podem ocorrer, podendo nesses casos ser necessárias transfusões de sangue e/ou cirurgias. Este exame você necessita realizar mesmo não participando da pesquisa, pois foi indicado por seu médico.

Para participar da pesquisa, talvez seja necessário borrifar uma substância corante no seu esôfago chamada solução de Lugol, a qual pode gerar um pouco mais de náuseas e não deve ser aplicada nas pessoas que têm alergia ao iodo (você deve informar se você tem alergia ao iodo). Também serão coletadas de 2 a 3 biópsias do seu esôfago (eventualmente mais), estes procedimentos aumentam em poucos minutos o tempo do exame, podem gerar pequenos sangramentos, e raramente sangramento um pouco maior pode ocorrer. As biópsias não causam dor.

Caso seja encontrada alguma alteração nas biópsias realizadas no seu esôfago, que tenha alguma importância para sua saúde, você será comunicado.

Eu,....., fui informado dos objetivos especificados acima e da justificativa desta pesquisa, de forma clara e detalhada. Recebi informações sobre cada procedimento, no qual estarei envolvido, dos desconfortos ou dos riscos previstos, tanto quanto dos benefícios esperados, como também fui informado que não receberei remuneração por minha participação na pesquisa. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Além disso, sei que novas informações obtidas durante o estudo me serão fornecidas e que terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, face a estas informações.

O profissional....., certificou-me de que as informações por mim fornecidas terão caráter confidencial.

Local

,...../...../.....

Assinatura do Paciente

Assinatura do Pesquisador

Como localizar o pesquisador:

Dr. Luís Carlos Moreira Antunes – (55)32208739e (55)99758423 – Santa Maria RS

Dr. Renato B. Fagundes (51) 81018818

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para os pacientes do Grupo 3

O câncer de esôfago é uma doença bastante comum no Rio Grande do Sul. As pessoas que já tiveram câncer de boca ou de garganta, ou aquelas pessoas que fumam, bebem ou tomam chimarrão diariamente têm maior chance de desenvolver o câncer de esôfago. Em algumas regiões do mundo foi encontrada associação do câncer de esôfago com o Papilomavírus Humano, o mesmo vírus causador do câncer de colo de útero.

Estamos realizando uma pesquisa onde pretendemos investigar se no Rio Grande do Sul a infecção pelo Papilomavírus Humano pode aumentar o risco de uma pessoa desenvolver câncer de esôfago. Desta forma pretendemos, identificar pessoas que estão sob maior risco de apresentar câncer, antes mesmo de a doença aparecer.

Para realizar a pesquisa é necessário coletar pequenas amostras da parte interna do seu esôfago (biópsias). Isto será realizado durante a endoscopia que você fará. A endoscopia não será feita exclusivamente para a pesquisa e sim porque você precisa realizá-la por indicação do seu médico, mas a amostra do esôfago não faz parte do seu atendimento e portanto estamos solicitando que você permita que coletamos uma pequena amostra de seu esôfago para a pesquisa.

Para fazer a endoscopia você precisa estar em jejum de pelo menos 8 a 12 horas. Antes do exame você terá sua garganta anestesiada com um spray, em seguida você receberá uma injeção na veia que lhe deixará com sono e irá ajudá-lo a tolerar melhor o exame, tendo efeito durante poucas horas. A endoscopia é feita através da passagem de uma sonda endoscópica com uma luz e uma câmera na ponta, que permite ver por dentro seu esôfago, estômago e o início do intestino. A maioria das pessoas tolera muito bem este exame, que dura de 10 a 15 minutos. Porém durante a endoscopia você pode apresentar tosse, ânsia de vômito e raramente depressão respiratória devido ao sedativo. Raramente sangramentos, reações alérgicas ou perfuração do esôfago podem ocorrer, podendo nesses casos ser necessárias transfusões de sangue e/ou cirurgias. Este exame você necessita realizar mesmo não participando da pesquisa, pois foi indicado por seu médico.

Serão coletadas 2 amostras do seu esôfago. Estes procedimentos aumentam em poucos minutos o tempo do exame, podem gerar pequenos sangramentos, e não causam dor.

Caso seja encontrada alguma alteração nas biópsias realizadas no seu esôfago, que tenha alguma importância para sua saúde, você será comunicado.

Eu,....., fui informado dos objetivos especificados acima e da justificativa desta pesquisa, de forma clara e detalhada. Recebi informações sobre cada procedimento, no qual estarei envolvido, dos desconfortos ou dos riscos previstos, tanto quanto dos benefícios esperados, como também fui informado que não receberei remuneração por minha participação na pesquisa. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Além disso, sei que novas informações obtidas durante o estudo me serão fornecidas e que terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, face a estas informações.

O profissional....., certificou-me de que as informações por mim fornecidas terão caráter confidencial.

Local

,...../...../.....

Assinatura do Paciente

Assinatura do Pesquisador

Como localizar o pesquisador:

Dr. Luís Carlos Moreira Antunes--(55)32208739 e (55)99758423-- Santa Maria RS

Dr. Renato B. Fagundes (51) 81018818

APÊNDICE C

LOGÍSTICA

