

Paula Roberta Aguiar Pastrez

**ASSOCIAÇÃO ENTRE A INFECÇÃO DE HPV DE ALTO RISCO E A EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS
RELACIONADAS À CARCINOGENESE ESOFÁGICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação do Hospital de Câncer de Barretos - Fundação Pio XII para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Oncologia

Nível: Mestrado

Orientador: Prof. Dr. Adhemar Longatto Filho

Co-orientadora: Dra. Vânia Sammartino
Mariano

**Barretos, SP
2015**

Paula Roberta Aguiar Pastrez

**ASSOCIAÇÃO ENTRE A INFECÇÃO DE HPV DE ALTO RISCO E A EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS
RELACIONADAS À CARCINOGENESE ESOFÁGICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação do Hospital de Câncer de Barretos - Fundação Pio XII para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Oncologia

Nível: Mestrado

Orientador: Prof. Dr. Adhemar Longatto Filho

Co-orientadora: Dra. Vânia Sammartino
Mariano

**Barretos, SP
2015**

SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

Este estudo está vinculado ao projeto “O papel do Papilomavírus Humano (HPV) como agente etiológico do câncer esofágico. Um estudo transversal, caso-controle e longitudinal no Hospital de Câncer de Barretos” que foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCB-FPXII (protocolo 637/2012 - Anexo 1), e recebe apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) através de auxílio à pesquisa Universal 14/2012, Faixa C (processo 482666/2012-9), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) através de bolsa de mestrado (processo 2013/15968-0) e INCT HPV (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) [processo 08/57889-1]; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [processo 573799/2008-3]).

As opiniões, hipóteses ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão do CNPq e FAPESP e INCT-HPV.

Esta dissertação foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas da Pós-Graduação do Hospital de Câncer de Barretos - Fundação Pio XII, baseando-se no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Oncologia e no Manual de Apresentação de Dissertações e Teses do Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram ainda que este trabalho foi realizado em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas (FAPESP), não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado como plágio, fabricação ou falsificação de dados. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram não ter qualquer conflito de interesse relacionado a este estudo.

À Deus, minha família, amigos, colegas de trabalho e orientadores pelo apoio, força,
incentivo, companheirismo e amizade. Sem eles nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

*Ao meu orientador, Prof. Dr. **Adhemar Longatto Filho**, pela infinita disponibilidade, por todos os ensinamentos e pela impecável condução deste meu trabalho. Obrigada por conseguir acalmar minhas ansiedades e angustias, com toda sua paciência e serenidade. Eu tenho muito orgulho de ter esse exemplo de pessoa como orientador!*

*À minha coorientadora e amiga, Dra. **Vânia Sammartino Mariano**, por acreditar em mim e mostrar o caminho da ciência; fazer parte da minha vida nos momentos bons e ruins, estar sempre pronta a me ouvir e esclarecer minhas dúvidas neste meu caminhar. Você é uma grande amiga que ganhei de presente do mestrado e que agora será para toda vida. Como te disse inúmeras vezes “Quero ser igual a você quando crescer”. O meu imenso carinho, gratidão e admiração.*

*A meus pais, **Roberta e Paulo**, meu infinito agradecimento. Sempre acreditaram em minha capacidade e me acharam A MELHOR de todas, mesmo não sendo. Isso só me fortaleceu e me fez tentar, não ser A MELHOR, mas a fazer o melhor de mim. Obrigada pelo amor incondicional!*

*A meu querido esposo, **Carlos Henrique**, por ser tão importante na minha vida. Sempre ao meu lado, compreendendo e incentivando cada momento dessa fase da minha vida. Devido a seu companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio, alegria e amor, este trabalho pôde ser concretizado. Obrigada por ter feito do meu sonho o nosso sonho!*

*À toda a **minha família**, avós, tios e tias, os quais amo muito, obrigada pelo carinho e incentivo.*

*Aos **amigos** que fizeram parte desses momentos sempre me ajudando e incentivando. Em especial à minha amiga **Cintia**, que foi quem me mostrou essa oportunidade de fazer o mestrado e me apresentou aos meus orientador e co-orientadora. Ci, se não fosse aquela mensagem de celular perguntando se eu pensaria em fazer mestrado, talvez não tivesse tomado esse rumo na minha vida. Muito obrigada!*

*Às amigas irmãs que ganhei do mestrado, **Allini** e **Estela**, pelos momentos vividos juntos. Nossa afinidade foi imediata e, aos poucos nos tornamos mais que amigas, quase irmãs... Obrigada por dividir comigo as angústias e alegrias e ouvirem meus desabafos. Foi bom contar com vocês! Nossa parceria é sucesso!*

***Allini**, primeiramente, obrigada por dividir comigo o projeto de HPV em esôfago. Certamente uma dissertação não seria tão completa sem a outra. Obrigada pelos momentos juntos nas disciplinas, sempre pronta para me ajudar e ensinar com toda sua paciência e sabedoria. Obrigada pelas inúmeras análises estatísticas, pela parceria durante as coletas dos pacientes, pelas viagens juntas, pelos almoços e por ser tão carinhosa e amiga. O seu coração é imenso! Muito obrigada por ser minha amiga, sem sua ajuda certamente esse projeto não seria realidade, você foi fundamental.*

***Estelinha**, você chegou um pouco mais tarde na minha vida e, chegou na hora certa! Muito obrigada por ter me ajudado tanto, ter “quebrado meu galho” infinitas vezes cuidando das coisas no laboratório sozinha quando eu não estive presente. Obrigada por me ouvir sempre que eu precisei e por ser tão companheira. Sem a sua ajuda eu não teria conseguido chegar até aqui. Saiba que o meu carinho e gratidão por você é eterno!*

*Aos **pacientes** do Hospital de Câncer de Barretos e AME Clínico de Barretos que participaram espontaneamente deste trabalho. Por causa deles é que esta dissertação se concretizou. Vocês merecem meu eterno agradecimento!*

*Aos colaboradores do **Departamento de Endoscopia do Hospital de Câncer de Barretos**, em especial à Dra Denise Peixoto Guimarães, Dr. Gilberto Fava, Dra Kelly Menezio Giardina Oliveira, Dr. Emiliano de Carvalho Almodova, Dr. Thiago Rabelo da Cunha, Dra Ana Amélia Viel, Dr Leonorado Nogueira Taveira, à toda a equipe de enfermagem, técnicos de enfermagem e recepcionistas, pela imensa ajuda durante o longo período de coleta de amostras e recrutamento de pacientes. A ajuda de cada um de vocês foi fundamental para a execução desse projeto.*

*Aos colaboradores do **Departamento de Endoscopia do Ambulatório Médico de Especialidades de Barretos**, em especial ao Dr Said Abdala Zemi Neto, Dr Cezar Sicchieri, à*

enfermeira Marilene e à toda equipe de enfermagem, técnicos de enfermagem e recepcionistas, pelo auxílio durante o recrutamento dos participantes e coleta de amostra biológica para este estudo.

*Ao **Departamento de Patologia**, em especial ao Dr. **Cristovam Scapulatempo Neto** pelas centenas de lâminas lidas aos finais de semana e nas madrugadas. Saiba que eu nunca esquecerei a sua ajuda e prontidão. Muito obrigada!*

*Ao **Departamento do Biobanco**, sem exceção, pelo cuidadoso trabalho de armazenamento de amostras dos pacientes para os projetos e confecção de lâminas para o estudo.*

*Ao **Departamento de imunohistoquímica**, sem exceção, pela prontidão em realizar as reações deste estudo nos intervalos daquelas para a rotina do hospital.*

*Ao **Departamento do SAME**, pela prontidão em separar os inúmeros prontuários.*

*Aos membros das bancas de acompanhamento e qualificação Dr. **Cristovam Scapulatempo Neto** e Dr. **José Eduardo Levi**, pelas sugestões, atenção e grande colaboração para a finalização deste estudo.*

*A todos os integrantes do **Grupo de Pesquisas em HPV do Hospital de Câncer de Barretos**, em especial ao Dr. **Kari Juhani Syrjänen**, MsC. **Adriana Tarlá Lorenzi**, MsC. **Maíra Degiovani Stein**, Msc. **Larissa de Melo Kuiu**, **Monique Amendola** e **Fernanda Munari**.*

*Aos **colegas de trabalho** do Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular, em especial aos biólogos que sempre me ensinaram e auxiliaram no que foi preciso.*

*Aos **colegas do mestrado**, pela companhia das várias sextas-feiras que estivemos juntos. Parceria durante as disciplinas, trabalho realizados, momentos de descontração dos almoços juntos. Saibam que esses momentos ficarão pra sempre no meu coração.*

*Aos **estatísticos** do Núcleo de Apoio ao Pesquisador, em especial ao **Cleiton** pelos cálculos de tamanho amostral e ao **Marco Antônio**, pela realização das análises estatísticas.*

*Aos membros da banca de defesa, Dra **Laura Sichero** e Dr **Carlos Eduardo Jacob**, por aceitarem prontamente em participar desse momento importante da minha vida.*

*Ao **Programa de Pós-graduação** do Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos.*

*À secretaria de pós-graduação, em especial à **Brenda Honda Moraes** e à **Silvana Rodrigues**, pela prontidão em ajudar sempre no que fosse possível.*

*A todos os **pesquisadores** do CPOM e IEP.*

*Ao **INCT HPV e ICESP**, em especial à Dra **Luisa Villa**, Dra **Laura Sichero** e **Emily Montosa Nunes** pela parceria e apoio financeiro na detecção de HPV por Luminex.*

*À **FAPESP** por financiar esse projeto de pesquisa com a bolsa de mestrado*

*Ao **CNPq** pelo financiamento.*

Ninguém vence sozinho... OBRIGADA A TODOS!

“O que você faz com amor e cuidado tem uma chance de fazer diferença, tanto para você como para a vida de outras pessoas. Tudo o que se faz sem amor e sem convicção é fadado ao fracasso e à perda de tempo, para você e para os outros” (Wim Wenders).

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE SÍMBOLOS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Câncer de esôfago	1
1.2 HPV como agente etiológico do câncer	3
1.3 Formas de detecção de HPV	6
1.4 Estudos brasileiros sobre o HPV no câncer esofágico	8
1.5 Marcadores moleculares em carcinoma de células escamosas de esôfago	8
1.6 Justificativa	11
2. OBJETIVOS	13
2.1 Geral	13
2.2 Específicos	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Delineamento do estudo	14
3.2 População do estudo	14
3.2.1 Casos	14
3.2.2 Controles	15
3.3 Tamanho amostral	15
3.4 Inclusão dos participantes do estudo	15
3.5 Detecção de HPV	19
3.5.1 Detecção de HPV-16 por PCR em tempo real específico	21
3.5.2 Detecção de α -HPV de alto risco por PCR multiples (Luminex)	21
3.6 Detecção de marcadores moleculares relacionados à infecção por HPV por imunohistoquímica	23
3.6.1 p53	23
3.6.2 p16 e Ki-67	24
3.7 Análises estatísticas	25
4. RESULTADOS	26
4.1 Inclusão dos indivíduos de pesquisa	26

4.2 Caracterização da população do estudo	26
4.3 Caracterização do tecido tumoral	27
4.4 Identificação de HPV	28
4.4.1 Detecção de HPV-16 por PCR em tempo real específico	29
4.4.2 Detecção de α -HPV de alto risco por PCR multiples (Luminex)	31
4.5 Imunohistoquímica	42
4.5.1 Análise da expressão de p53	42
4.5.2 Análise da expressão de p16/Ki-67	50
5. DISCUSSÃO	70
6. CONCLUSÕES	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
ANEXOS	92
Anexo 1 - Carta de aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa	92
Anexo 2 - Termo de consentimento livre e esclarecido - Casos	94
Anexo 3 - Termo de consentimento livre e esclarecido - Controles	95
Anexo 4 - Instrumento de coleta de dados	98
Anexo 5 - Instrumento de coleta de dados clínicos	102
Anexo 6 - Artigo a ser submetido	103

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mecanismo de infecção do HPV em células de colo uterino	6
Figura 2 - Cálculo de consumo de bebidas alcoólicas	17
Figura 3 - Material utilizado na EDA para coleta de amostra biológica para o projeto	18
Figura 4 - Imagem de procedimento endoscópico	19
Figura 5 - Imagem de procedimento endoscópico na área tumoral	19
Figura 6 - Gel de agarose 1,5% após amplificação usando <i>primer</i> β -globina	29
Figura 7 - Descrição do número de amostras analisadas em cada experimento	42
Figura 8 - Imunohistoquímica de p53 em CEC de esôfago	43
Figura 9 - Imunohistoquímica de p16/Ki-67 em CEC de esôfago e esôfago saudável	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tamanho amostral considerando 5% de significância	15
Tabela 2 - Variáveis do estudo	16
Tabela 3 - Características dos anticorpos utilizados no estudo	25
Tabela 4 - Critérios para resultado da imunohistoquímica dos marcadores investigados	25
Tabela 5 - Caracterização da população do estudo	27
Tabela 6 - Caracterização do tecido tumoral	28
Tabela 7 - Casos analisados para presença do HPV-16 por PCR em tempo real	30
Tabela 8 - Controles analisados para presença do HPV-16 por PCR em tempo real	30
Tabela 9 - Comparação da frequência de HPV-16 entre os grupos caso e controle	30
Tabela 10 - Caracterização da população do estudo em relação à presença de HPV-16 e as variáveis sociodemográficas	31
Tabela 11 - Frequência de HPV de alto risco nos grupos caso e controle através do Luminex	32
Tabela 12 - Casos analisados para presença de HPV de alto risco por Luminex	32
Tabela 13 - Controles analisados para presença de HPV de alto risco por Luminex	32
Tabela 14 - Frequência dos tipos de HPV de alto risco detectados pelo Luminex	
Tabela 15 - Caracterização da população do estudo em relação à presença de HPV de alto risco e as variáveis sociodemográficas	34
Tabela 16 - Descrição detalhada dos métodos de detecção de HPV	35
Tabela 17 - Valores de referência teste de concordância de Kappa	37
Tabela 18 - Concordância entre a detecção de HPV-16 por PCR tempo real e Luminex	37

Tabela 19 - Concordância entre as técnicas de detecção de HPV	37
Tabela 20 - Comparação da frequência de HPV de alto risco entre os grupos caso e controle	38
Tabela 21 - Frequência geral de HPV de alto risco para os tecidos do grupo caso	38
Tabela 22 - Descrição da frequência geral de HPV de alto risco nos controles incluídos no estudo	39
Tabela 23 - Frequência de HPV de alto risco entre tecido normal adjacente e controle	39
Tabela 24 - Caracterização da população HPV de alto risco positiva e negativa em relação às variáveis sociodemográficas	40
Tabela 25 - Caracterização da população HPV de alto risco positiva e negativa para tecido tumoral em relação às variáveis sociodemográficas e clinicopatológicas	40
Tabela 26 - Expressão de p53 entre os grupos caso e controle	43
Tabela 27 - Expressão de p53 nos tecidos obtidos dos casos	44
Tabela 28 - Descrição da expressão de p53 nos tecidos obtidos de controles	44
Tabela 29 - Expressão de p53 nos tecidos normal adjacente e controle	45
Tabela 30 - Caracterização das amostras em relação à expressão p53	45
Tabela 31 - Caracterização das amostras tumorais em relação a expressão de p53 e variáveis sociais, clinicopatológicas e presença de HPV	47
Tabela 32 - Caracterização da expressão de p53 em tecidos normal adjacente e controle em relação às variáveis sociais e status de HPV	49
Tabela 33 - Caracterização da expressão de p16 e Ki-67 nos grupos caso e controle	52
Tabela 34 - Expressão de p16 e Ki-67 em tecidos tumoral e normal adjacente	53
Tabela 35 - Caracterização da expressão de p16 e Ki-67 entre tecidos esofágicos normal adjacente e controle	54
Tabela 36 - Perfil de expressão de Ki-67 nos tecidos dos grupos caso e controle	54

Tabela 37 - Caracterização da população positiva para p16 em relação as variáveis sociais e status de HPV	55
Tabela 38 - Caracterização da expressão de p16 em tecido tumoral em relação às variáveis sociais, clinicopatológicas e status de HPV	56
Tabela 39 - Caracterização da expressão de p16 em tecidos normal adjacente e controles em relação às variáveis sociais e status de HPV	58
Tabela 40 - Concordância entre a expressão de p16 e positividade para DNA HPV de alto risco em amostras esofágicas	59
Tabela 41 - Caracterização dos indivíduos incluídos no estudo de acordo com a função combinada do status de p16 e HPV	60
Tabela 42 - Caracterização da população positiva para dupla marcação p16/Ki-67 em relação as variáveis sociais e status de HPV	61
Tabela 43 - Caracterização da expressão da dupla marcação p16/Ki-67 em tecido tumoral em relação às variáveis sociais, clinicopatológicas e status de HPV	62
Tabela 44 - Caracterização da expressão da dupla marcação p16/Ki-67 em tecidos normal adjacente controles em relação às variáveis sociais e status de HPV	64
Tabela 45 - Caracterização dos indivíduos incluídos no estudo de acordo com a função combinada do status de p16/Ki-67 e HPV	66
Tabela 46 - Descrição da concordância entre a expressão dos marcadores p53, p16, p16/Ki-67 e status de HPV	68

LISTA DE ABREVIATURAS

HCB-FPXII	Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII
HCB	Hospital de Câncer de Barretos
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
AME	Ambulatório Médico de especialidades
CE	Câncer esofágico
CEC	Carcinoma de células escamosas
CC	Câncer cervical
HPV	Papilomavírus humano
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> (Tradução: Ácido desoxirribonucleico)
pRb	Proteína do retinoblastoma
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Tradução: Ácido ribonucleico)
ISH	Hibridização <i>in situ</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Tradução: Reação em cadeia de polymerase)
CDK	<i>Cyclin Dependent Kinase</i> (Tradução: Quinase dependentes de ciclina)
PSA	Antígeno próstata-específico
IgG	Imunoglobulina do tipo G
EDA	Endoscopia Digestiva Alta
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
pb	Pares de bases
HCl	Cloreto de hidrogênio
KCl	Cloreto de potássio
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
ct	<i>Threshold cycle</i> (Tradução: Ciclo limiar)
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i> (Tradução: Agência Internacional para Pesquisa em Câncer)
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Tradução: Ácido etilenodiamino tetra-acético)
MFI	<i>Mean fluorescence intensity</i> (Tradução: Intensidade de fluorescência média)
IHC	Imunohistoquímica
MW	Marcador de peso molecular
NO	Controle negativo
H₂O	Água
TNM	Sistema baseado no tamanho e/ou extensão do tumor primário (T), quantidade de linfonodos comprometidos (N) e presença de metástases (M)

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
/	Divisão
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
=	Igual
-	Menos ou Negativo
μL	Microlitro
x	Multiplicação
%	Porcentagem
+	Positivo
XII	Doze
<	Menos
>	Maior
$\leq$	Menor ou igual
$\geq$	Maior ou igual
I	Um
II	Dois
III	Três
IV	Quatro
()	Parênteses
*	Asterisco
'	Linha
$\pm$	Mais ou menos

RESUMO

Pastrez PRA. Associação entre a infecção por HPV de alto risco e a expressão de proteínas relacionadas à carcinogênese esofágica. **Dissertação (Mestrado)**. Barretos: Hospital de Câncer de Barretos; 2015.

JUSTIFICATIVA: O carcinoma de células escamosas do esôfago é a sexta neoplasia maligna mais letal no mundo, apresenta diferença significativa na taxa de prevalência dentro da mesma população e a etiologia ainda inconclusiva, sugerindo a existência de múltiplos fatores de risco para doença. Como sugerido há anos, o HPV é considerado potencial fator de risco para a doença, mas ainda é pouco esclarecido o fator determinante para que a maquinaria das células infectadas por HPV progrida na via carcinogênica. **OBJETIVO:** Avaliar a frequência de HPV de alto risco no carcinoma de células escamosas de esôfago e a expressão de marcadores moleculares relacionados à carcinogênese esofágica. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Este é um estudo de caso-controle que incluiu um total de 101 pacientes com carcinoma de células escamosas de esôfago (casos) e 101 controles, pareados por idade e sexo. Durante a endoscopia digestiva alta, biópsias esofágicas foram coletadas dos tecidos tumoral e normal adjacente para os casos e, esôfago distal e proximal para os controles. Após macrodissecção da área de interesse previamente delimitada, o DNA foi extraído utilizando o QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen). Para identificação viral, foram realizadas a PCR em tempo real utilizando iniciadores (E7 de HPV-16) e sonda específicos para o HPV-16 e, PCR multiplex utilizando esferas acopladas a sondas específicas para 18 tipos de HPV de alto risco. Dados sociais, clinicopatológicos e de estilo de vida foram obtidos através de instrumento de coleta de dados. **RESULTADOS:** A prevalência de HPV-16 obtida por PCR em tempo real foi de 3,0% e 20,8% para indivíduos com câncer esofágico e indivíduos saudáveis, respectivamente. A prevalência de HPV de alto risco obtida por PCR multiplex foi de 21,3% em indivíduos com câncer esofágico e 22,2% em indivíduos saudáveis sem câncer. Somando as resultados das duas tecnologias, a prevalência geral de HPV de alto risco em indivíduos com câncer esofágico foi de 20,8% e para indivíduos sem câncer foi de 34,7%. Análises imunohistoquímica mostraram que não há relação estatisticamente significativa entre a expressão de p53, p16 e p16/Ki-67 com a infecção por HPV de alto risco na população estudada. Entretanto, a expressão de p53 foi significativamente maior em indivíduos que

faziam consumo de álcool e, álcool e tabaco concomitantemente. **CONCLUSÃO:** Estes resultados sugerem que o HPV de alto risco não está relacionado com o desenvolvimento do CEC esofágico e a expressão das proteínas p53, p16 e p16/Ki-67 não possui relação com o status de HPV de alto risco nos tecidos esofágicos.

PALAVRAS-CHAVE: Neoplasias esofágicas, Papillomaviridae, biomarcadores farmacológicos, imunohistoquímica, biologia molecular, estilo de vida

ABSTRACT

Pastrez PRA. Association between high-risk HPV infection and expression of proteins reported to esophageal carcinogenesis. **Dissertation (Master's degree)**. Barretos: Barretos Cancer Hospital; 2015.

BACKGROUND: Esophageal squamous cell carcinoma is the sixth malignant neoplasia in the world, has a significant difference in prevalence rate in the same population and its etiology is poorly known, suggesting the existence of multiple risk factors for disease. As suggested for years, HPV is considered a potential risk factor for the disease, but it is not clearly established the determining factor for the machinery of HPV infected cells make progress towards carcinogenic. **AIM:** To determine the frequency of high-risk HPV in esophageal squamous cell carcinoma and the expression of molecular markers related to esophageal carcinogenesis. **MATERIALS AND METHODS:** This is a case-control study that included a total of 101 patients with esophageal squamous cell carcinoma (cases) and 101 controls matched for age and sex. During endoscopy, esophageal biopsies were collected from the tumor and adjacent normal tissues for cases and, distal and proximal regions for controls. After macrodissection, DNA was extracted using the QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen). For identification of viruses, were performed real-time PCR using primers (HPV-16 E7) and probe specific for HPV-16 and multiplex PCR using specific probes coupled beads for 18 high-risk HPV types. Social, clinicopathological and lifestyle data were obtained through data collection instrument. **RESULTS:** The prevalence of HPV-16 obtained by real-time PCR was 3.0% and 20.8% for esophageal cancer and healthy individual, respectively. The high-risk HPV prevalence obtained by multiplex PCR was 21.3% in subjects with esophageal cancer, and 22.2% in healthy individuals. Adding the results of the two technologies, the general prevalence of high-risk HPV in esophageal cancer was 20.8% and 34.7% in healthy individual. Immunohistochemical analysis showed no statistically significant relationship between the expression of p53, p16 and p16/Ki-67 with high-risk HPV infection in this population. However, p53 expression was increased when alcohol and concomitant alcohol and tobacco were mentioned by patients with esophagus cancer. **CONCLUSIONS:** These results suggest that the high-risk HPV types not associated with the development of esophageal SCC and

that the expression of p53, p16 and p16/Ki-67 have no relationship with the high-risk HPV status in esophageal tissue.

KEYWORDS: Esophageal neoplasias, Papillomaviridae, pharmacological biomarkers, immunohistochemistry, molecular biology, lifestyle

1. INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE ESÔFAGO

O câncer esofágico (CE), oitavo tipo de câncer mais incidente (456 mil casos/ano) e sexto mais letal no mundo (400 mil/ano), é geralmente diagnosticado em estágio avançado devido, principalmente, à ausência de sintomas iniciais específicos da doença e falta de testes não-invasivos confiáveis para o rastreio. Dessa forma, a doença de progressão rápida apresenta prognóstico extremamente ruim para o paciente¹⁻¹⁶ e sobrevida global em 5 anos abaixo de 20%. No entanto, se os pacientes fossem diagnosticados em estágio inicial, a sobrevida global em 5 anos passaria a ser de 80-90%¹⁷. Dentre os sintomas da doença inicialmente relatados ressaltam-se disfagia, perda de peso, dor no peito, sensação de queimação, e tosse¹⁸. Embora os casos de CE ocorram predominantemente como carcinoma de células escamosas (CEC), tem-se observado crescente incidência de adenocarcinomas associados ao chamado esôfago de Barrett (metaplasia gastro-esofágica), provavelmente pela mudança nos hábitos de vida e aumento das taxas de obesidade mundiais^{19, 20}.

No Brasil, o CE está entre os dez tipos de cânceres com maior incidência, ocupando a sexta posição entre os homens e a décima quarta entre as mulheres. Para o ano de 2014, estimativas indicaram 10.780 casos novos (8.010 em homens e 2.210 em mulheres) e um total de 7.636 mortes (5.961 em homens e 1.675 em mulheres) decorrentes desta neoplasia, com destaque para as regiões sul e sudeste²¹.

A etiologia do CEC é complexa e as variações geográficas, culturais e étnicas sugerem associação de fatores de risco bem estabelecidos para a doença, como consumo de álcool, cigarro e desnutrição, com supostos fatores ambientais, permitindo a classificação dos países como sendo de alta ou baixa incidência para a neoplasia. Dessa forma, China, Índia e Ásia Central são considerados o cinturão do CE por apresentar prevalência muito alta da doença; França, África do Sul, Chile e Brasil são áreas de alto risco, enquanto partes da Europa e América do Norte, são consideradas áreas de baixo risco²²⁻²⁴.

Os motivos dessas variações regionais na incidência do CEC de esôfago são superficialmente entendidos, mas acredita-se que há uma complexa interação de diversos fatores de risco, como idade, história familiar e associação genética, com

fatores extrínsecos, sugerindo a existência de etiologias diferentes entre as áreas de baixo e alto risco para o desenvolvimento do CE. Nota-se que em países industrializados, os principais fatores de risco são o consumo de álcool e tabaco, especialmente a combinação de ambos²⁵⁻²⁷. Nas áreas em desenvolvimento e com alta incidência desta neoplasia, a deficiência nutricional, ingestão de alimentos sólidos e/ou líquidos quentes e agentes infecciosos^{2, 15, 28, 29}, como micro-organismos patogênicos, são considerados os principais fatores associados à doença³⁰.

No início dos anos 80, Syrjänen *et al.* (1982) identificaram pela primeira vez características citopáticas de infecção por HPV em tumores esofágicos benignos e malignos³¹. Além disso, a detecção de HPV em lesões da mucosa oral em continuidade com o epitélio escamoso que reveste o esôfago³² e de proteínas estruturais nas amostras tumorais, contribuíram para a validação da idéia previamente proposta. Entretanto, os estudos realizados com populações de características culturais diferentes e metodologia para detecção viral distinta, resultam em dados significativamente controversos sobre a prevalência de HPV e os tipos virais identificados em CEC de esôfago, estimulando a realização de investigações que elucidem também as moléculas ativadas pelo vírus e a expressão dos marcadores indiretos de infecção³³.

Na tentativa de esclarecer o papel etiológico do HPV no CEC de esôfago, os dados de detecção de DNA viral nesse tipo de câncer foram reunidos em revisões e meta-análises que constataram divergência na prevalência viral. De acordo com os estudos revisados, a prevalência de HPV em CEC de esôfago variando de 0 a 100% seja, provavelmente, decorrente da origem geográfica diferente das amostras³⁴⁻³⁷, pois porcentagens mais elevadas de detecção de HPV foram encontradas frequentemente em regiões de risco elevado para CEC. Neste contexto, o papel etiológico do vírus na carcinogênese esofágica, como sugerido há mais de 30 anos, ainda não foi claramente estabelecido³⁸.

Ainda sobre dados mundiais relacionados à incidência de HPV em esôfago, tem-se que o HPV-16 é o tipo mais prevalente (11,4%) nos diversos estudos analisados, porém há incidência de outros tipos de HPV de alto risco como: HPV-18 (2,9%), HPV-52 (1,1%), HPV-33 (0,8%) e HPV-31 (0,6%)³⁷.

No Brasil, taxas de alta e média incidência de CE são observadas nas regiões sul e sudeste, respectivamente, e relacionam-se principalmente com álcool e tabaco. Entretanto, a incidência duas vezes maior de CE na região sul (18 e 7/100.000 para homens e mulheres, respectivamente) sugere associação de algum outro fator causal para a doença, como alto consumo de chimarrão e chá mate^{39, 40}. Embora as pesquisas tenham demonstrado 13% de prevalência de HPV em tumores esofágicos e predomínio do tipo viral 16, resultados de correlação da infecção viral com expressão aumentada de p16, mutação em TP53 e sobrevida global dos pacientes não foram observados e encorajam estudos na área⁴¹.

1.2 HPV COMO AGENTE ETIOLÓGICO DO CÂNCER

Papilomavírus humano (HPV) são vírus da família *Papillomaviridae*, não envelopados, com pequeno genoma de aproximadamente 8 mil pares de bases que arranjam-se em dupla fita de DNA circular. Ainda, são caracterizados pelo tropismo muco-cutâneo onde podem causar lesões hiperproliferativas⁴². É bem estabelecido que o HPV é o agente causador da infecção sexualmente transmitida mais comum no mundo e que a maioria (80%) dos indivíduos com vida sexual ativa será infectada por esse vírus em algum momento da vida⁴².

Atualmente, são descritos mais de 150 tipos de HPV e desses, aproximadamente 40 são capazes de infectar mucosas e apenas 20 estão fortemente associados com o desenvolvimento de carcinoma cervical (CC). O potencial oncogênico do HPV é determinado pelo seu tempo de permanência no hospedeiro e permite a classificação em alto (16, 18, 31 e 33, por exemplo) e baixo risco (6,11, os tipos mais frequentemente encontrados em proliferações benignas) tumorigênico⁴³. Dessa forma, a infecção persistente causada por HPV de alto risco está estreitamente associada à ocorrência de displasia de alto grau em diferentes sítios anatômicos como, colo uterino, vulva, ânus, vagina e pênis, sendo, portanto, considerado o principal fator de risco para o desenvolvimento de neoplasia nesses órgãos⁴³. Dentre os diversos tipos de HPV de alto risco capazes de infectar mucosas e associar-se a carcinogênese, o HPV-16 é o mais prevalente nas neoplasias em diferentes sítios anatômicos e regiões do mundo⁴⁴.

Com base na familiaridade da sequência, a árvore filogenética de HPV é composta de cinco gêneros (*alfa*, *beta*, *gama*, *mu*, e *nu* papilomavírus) que estão agrupados em espécies e subdivididos em tipos. Aqueles frequentemente encontrados em tumores do colo uterino e por isso denominados de alto risco oncogênico, são espécies contidas no gênero α ⁴⁵.

O HPV é considerado fator necessário para o desenvolvimento de quase 100% dos casos de CC e presente também em 50% dos carcinomas de células escamosas de vulva, 30 a 50% de carcinomas penianos e 60 a 90% dos carcinomas de vagina. De acordo com os resultados das diversas pesquisas, o vírus também contribui significativamente para o desenvolvimento de carcinomas de cabeça e pescoço, principalmente os de orofaringe e, nesse caso, a presença de HPV nos tumores representa melhor prognóstico e reduz risco de morte em 60 a 80%⁴⁶. Embora os dados confirmem a contribuição de HPV de alto risco para o desenvolvimento de câncer anogenital e de cabeça e pescoço, os resultados de associação do HPV com cânceres não genitais como de olhos, aparelho digestivo alto e pulmão, ainda são controversos e exigem melhor investigação^{8, 26, 27, 32, 47, 48}.

O papel das oncoproteínas virais no ciclo celular

A carcinogênese induzida por HPV é controlada pela ação de oncoproteínas virais, com destaque para a expressão aumentada de E6 e E7, que inibem os efeitos das proteínas supressoras de tumor, p53 e pRb (proteína do retinoblastoma), respectivamente, descontrolando o ciclo celular e aumentando a instabilidade cromossômica que são etapas fundamentais no desenvolvimento desta neoplasia maligna⁴⁹⁻⁵¹. Fisiologicamente, a pRB expressa nas células do hospedeiro regula negativamente o ciclo celular por estar associada com o fator de transcrição da família E2F e prevenir a entrada das células na fase de síntese (S) do ciclo celular. Quando há influência dos oncogenes do HPV, a oncoproteína viral E7 liga-se a pRB e rompe o complexo pRb/E2F, liberando o fator de transcrição E2F que iniciará a etapa de síntese protéica necessária para a replicação de DNA. Atualmente, as diversas proteínas celulares que têm expressão relacionada com E2F (como ciclina E, p16 e p21) têm sido utilizadas como marcadores para infecção por HPV^{52, 53}.

Em adição aos eventos exercidos por E7, a oncoproteína viral E6 interage e induz a degradação da proteína supressora de tumor p53 que fisiologicamente é responsável pela promoção de apoptose das células com dano de DNA. Na ausência de HPV, a p53 regula a expressão da proteína p21 que se associa às ciclinas D e E, induzindo indiretamente a parada do ciclo celular em G1. Além disso, p53 induz apoptose por ativar diretamente os genes de morte programada responsáveis pela eliminação de células neoplásicas^{52, 53}.

Entretanto, acredita-se que este modelo E6-p53 e E7-pRb não seja exclusivo para desencadear o câncer induzido pela infecção por HPV, baseando-se na alta porcentagem de eliminação espontânea de HPV e o longo período entre o início da infecção persistente e o desenvolvimento da transformação maligna no colo uterino⁵⁴.

Em amostras tumorais de cabeça e pescoço (especificamente as de tonsilas) positivas para HPV, a expressão de algumas dessas proteínas, como p53 e p16 está alterada e o desenvolvimento clínico, relacionado à resposta ao tratamento e sobrevida dos casos, é favorável em relação àqueles negativos para o vírus⁵⁵⁻⁵⁷. Sendo assim, a localização destas proteínas na célula pode ser uma eficiente ferramenta de investigação de potenciais marcadores dessa infecção por reação imunohistoquímica⁵⁸.

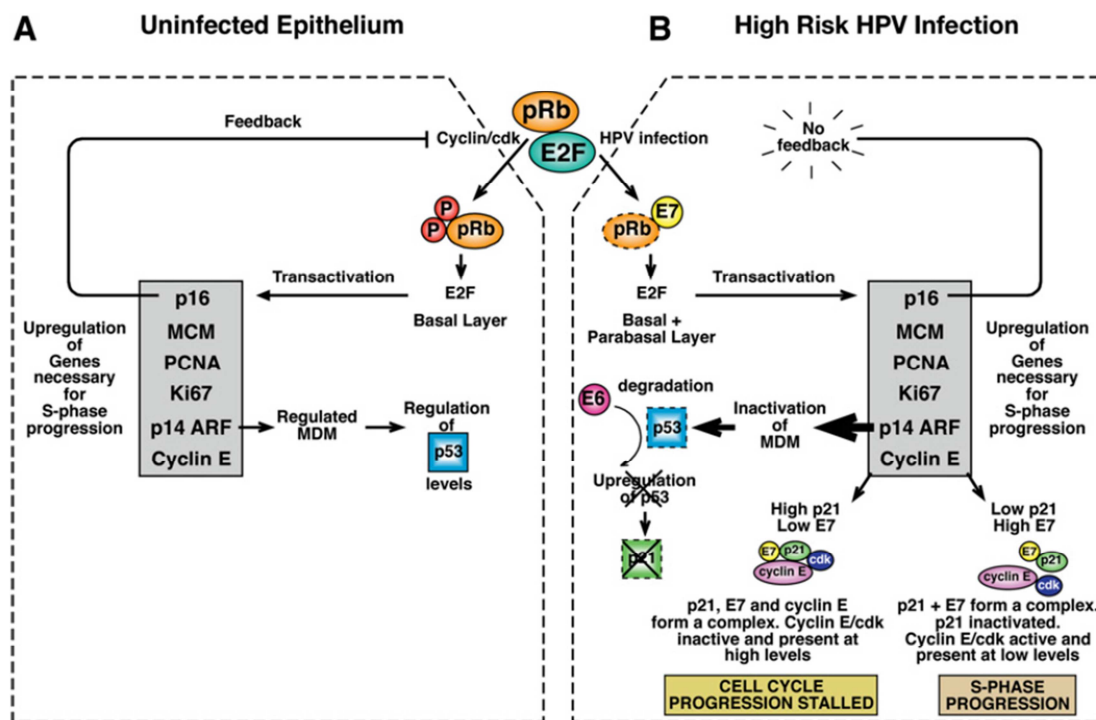


Figura 1 - Mecanismo de infecção do HPV em células de colo uterino (modificado de Doorbar *et al*, 2006).

A - Epitélio normal, não infectado por HPV. A pRb está ligada ao fator de transcrição E2F. Quando a célula recebe um estímulo de crescimento externo, o complexo ciclina/CDK promove a fosforilação de pRb, o qual vai deixar o E2F livre, promovendo a expressão de proteínas fundamentais para a progressão do ciclo celular. A p16 irá regular os níveis de ciclina/CDK, realizando um mecanismo de feedback e, além disso, regular a expressão de p14, responsável por regular a expressão de MDM que, por conseguinte, irá regular os níveis de p53, um supressor tumoral responsável por reparo de DNA e apoptose de células instáveis.

B - Epitélio infectado por HPV. Há presença de oncogenes E6 e E7, que irão interferir em todo o mecanismo de ação do ciclo celular. A E7 irá se ligar à pRB deixando o E2F livre, que irá estimular a expressão de proteínas necessárias para a progressão do ciclo celular. Entretanto, não haverá o mecanismo de *feedback* regulado por p16, mesmo que este esteja aumentado, porque não há presença de ciclina/CDK. Consequentemente, os níveis reduzidos de p14 inativarão MDM e aumentará os níveis de p53. No entanto, esse efeito é anulado pela ação de E6 que inibirá a função de p53 e, consequentemente reduzirá os níveis de p21, cuja expressão é regulada por p53. Sendo assim, quando há elevado nível de E7 e reduzido de p21, o complexo ciclina E/CDK fica livre e permite a progressão do ciclo celular de células infectadas pelo HPV⁵⁹.

1.3 FORMAS DE DETECÇÃO DE HPV

Para fazer a detecção do vírus, ainda não há uma técnica padrão que seja disponível e utilizada mundialmente na atualidade, e isto reflete em significativa variação de resultados entre os laboratórios que, somado à variação geográfica das amostras, resultam em viés dos resultados encontrados. Dentre as diversas estratégias

disponíveis que variam desde o desenho até o alvo abordado, destacam-se aquelas que visam: DNA, RNA, oncoproteínas virais, proteínas celulares e anticorpos específicos para o HPV⁶⁰, sendo elas histologia, Southern blotting, hibridização dot blot, sorologia para proteína L1 HPV, hibridização *in situ* (ISH), e reação em cadeia de polimerase (PCR)⁶¹. Os estudos mais atuais destacam a utilização, principalmente, de ISH ou PCR, sendo o PCR mais específico, porém com altas taxas de resultados falso positivos, enquanto a ISH apresenta alta especificidade, porém baixa sensibilidade. Entretanto, foi demonstrado que a taxa de detecção de HPV em CEC de esôfago é similar para as duas técnicas (27,7% por PCR e 24,3% por ISH), sem diferenças estatisticamente significantes entre elas⁶¹.

A amplificação de DNA HPV por PCR é uma técnica capaz de amplificar sequências através da utilização de *primers* desenhados para se ligar à uma região altamente conservada em diversos tipos de HPV (detectam vários tipos de HPV simultaneamente) ou a sequência específica para um tipo de HPV (tipo-específicos), permitindo a genotipagem do HPV.

Recentemente, um ensaio baseado em PCR multiplex usando *primers* de amplo espectro com subsequente hibridização multiplex para sondas tipo-específicas acopladas às beads de Luminex, tem sido utilizado para detectar e identificar diferentes tipos de HPV ao mesmo tempo, inclusive identificando co-infecção por HPVs na mesma amostra^{45, 62}.

Como vantagens dos métodos baseados em amplificação de DNA, têm-se a alta sensibilidade por ser capaz de detectar apenas uma cópia do genoma viral por célula⁶⁰ e a especificidade das técnicas⁶³. Além disso, é possível ter a amplificação simultânea de muitos fragmentos de material genético (PCR multiplex) e de diferentes amplicons (PCR multiplex, PCR tempo real) com uma quantidade reduzida de material⁶³.

Diversos aspectos da carcinogênese mediada por HPV vêm sendo explorados em pesquisas que visam ampliar as abordagens clínicas e terapêuticas dos tumores associados ao vírus. As pesquisas em desenvolvimento incluem análises genômicas e proteômicas que objetivam traçar perfis de genes e proteínas candidatas às ferramentas utilizadas na classificação diferencial das lesões.

1.4 ESTUDOS BRASILEIROS SOBRE O HPV NO CÂNCER ESOFÁGICO

Com objetivo de avaliar o papel de HPV na carcinogênese esofágica, estudos brasileiros analisaram a frequência viral e as proteínas do ciclo celular cuja expressão aparece alterada em tumores de colo uterino HPV positivos. No entanto, os resultados sobre o papel do HPV no câncer esofágico e a sinalização responsável pela malignização não foram conclusivos e necessitam de melhor investigação^{41, 64, 65}.

Em 2003, foi detectado⁶⁴ por ensaio de captura híbrida, uma baixa frequência (2,5%) de DNA HPV de baixo risco em amostras de tumor esofágico (40 pacientes), enquanto 10% de positividade para DNA HPV de alto risco (10 pacientes) foram obtidos em amostras não tumorais. Em 2006, ensaio de PCR detectou HPV de alto risco (16 e 18) em 15,75% das amostras de uma série de 106 casos tumorais, enquanto o DNA viral não foi detectado nas amostras normais, sugerindo que a presença de HPV-16 e 18 está relacionada com o fenótipo maligno observado no esôfago⁶⁵. Estudo de 2012, pesquisando DNA viral por PCR e ISH e marcadores indiretos de infecção por HPV em 264 amostras de tumor esofágico, obteve frequência de 13% de HPV, sendo que o tipo mais predominante foi o 16, seguido dos tipos 66 e 18, com ausência de correlação com a expressão de p16 e mutações em TP53⁴¹. Em estudo recente, pesquisadores utilizando a técnica de *nested* PCR, não detectaram o DNA HPV nos 183 tumores de esôfago analisados e, por isso, foi sugerido ausência de relação entre a infecção pelo HPV e o desenvolvimento de CEC de esôfago⁶⁶. Dessa forma, há necessidade de avaliar estes pontos em nossa população.

1.5 MARCADORES MOLECULARES EM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE ESÔFAGO

De modo geral, biomarcadores são diferentes componentes bioquímicos, tais como sequências de DNA, RNAs, proteínas e metabólitos, que atuam de modo sensível e específico em um determinado tipo de doença e que podem ser reconhecidos como tal. Os biomarcadores podem auxiliar na detecção de doenças, como o câncer, escolha do tratamento e prever sobrevida após o tratamento. Podem ainda distinguir

doenças malignas de benignas e identificar os estágios de evolução da doença, sempre com alta sensibilidade e especificidade¹⁸.

Para algumas neoplasias malignas, como o câncer de próstata, o diagnóstico precoce pode estar relacionado com a dosagem do antígeno prostático específico (PSA)^{18, 67}; no entanto, para muitas outras, como o câncer esofágico, ainda não há um biomarcador ideal.

Atualmente, o tratamento padrão para CE é cirúrgico, combinado com quimioterapia e radioterapia neoadjuvantes ou apenas quimio/radioterapia⁶⁸. No entanto, a neoplasia maligna apresenta um quadro contraditório que exige atenção. Para aumento da sobrevida, é necessária que a doença seja detectada precocemente, mas não há constatação precoce de sintomas específicos e isto provoca a evolução do quadro para metástase em mais de 50% dos casos, quando a doença é diagnosticada³⁴. Se a sobrevida aumenta consideravelmente (80-90%) com o diagnóstico precoce, há intensa busca por técnicas de rastreio eficaz e identificação de marcador tumoral ideal⁶⁷. Com este objetivo, diversos estudos têm sido realizados sobre o câncer de esôfago, mas não há consenso do que pode ser usado como monitor de detecção precoce ou recorrência tumoral⁶⁷.

Vários estudos com CEC de esôfago recidivado e tratado com quimio/radioterapia, encontraram que os níveis de expressão de p53 e p16, entre outras proteínas, podem ser usados como fatores prognóstico para essa doença. Entretanto, há divergências neste aspecto, porque há estudos que não encontraram correlação significativa entre os níveis de expressão destas proteínas e seu significado clínico⁶⁹.

p53

A proteína supressora tumoral p53 codificada pelo gene TP53 localizado no cromossomo 17q13.1⁷⁰ possui papel fundamental na regulação da proliferação e proteção de células expostas a agentes mutagênicos⁷¹, além de ter relação com o ciclo celular do HPV. A função supressora tumoral refere-se ao fato de induzir apoptose, parada do ciclo celular e senescência em resposta ao estresse provocado principalmente por hipóxia e ativação dos oncogenes⁷².

Em condições normais, a p53 está geralmente presente no núcleo da célula e em pequenas quantidades por possuir um tempo de meia vida muito curto. No entanto, o aumento do tempo de meia vida e o consequente aumento da expressão de p53 detectada no núcleo celular por imunohistoquímica, podem ocorrer quando a proteína está mutada. Essas mutações são causadas por fatores ambientais e genéticos que resultam na perda da habilidade de induzir morte celular, provocando um descontrole do crescimento celular que promove a tumorigênese⁷⁰, incluindo a do esôfago; e, além disso, sua detecção pode ter importante papel no prognóstico da doença. Entretanto, o exato papel da superexpressão de p53 em CEC de esôfago permanece incerto, apesar da existência de diversos estudos mostrarem que essa superexpressão estaria associada com prognóstico ruim e então seria considerada um preditor de sobrevida global^{67, 72}.

p16 e Ki-67

A proteína p16 apresenta importante papel supressor tumoral e regulador do ciclo celular, mas está inativada em vários tipos de cânceres humanos. Ainda, controla o envelhecimento, regula a senescência celular, deleta e repara danos ao DNA através de mecanismos pertencentes à via de sinalização de p16 (via p16-Rb)⁷³.

Em tumores de cabeça e pescoço, observou-se que a presença de HPV modifica a interação entre o hospedeiro e a expressão dos dois oncogenes virais: E6 e E7. A proteína viral E7 se liga à pRb susceptível e degrada rapidamente a Rb por ubiquitinação, resultando no aumento da expressão da proteína p16 por uma interação de *feedback*. Assim, tumores HPV positivos estão fortemente correlacionados com a alta expressão de p16^{74, 75}. No entanto, em condições fisiológicas, a expressão de p16 também pode ser detectada, embora de forma bem menos exuberante, porque executa função supressora.

Para solucionar este problema metodológico de imarcação de p16 em células normais, faz-se imunomarcação para Ki-67 concomitantemente e assim, é possível reconhecer especificamente células desreguladas que estão sendo conduzidas a transformação cancerosa por infecção por HPV de alto risco. A expressão de Ki-67 está fortemente associada com proliferação e crescimento celular, e é amplamente utilizada na rotina patológica como um marcador de proiferação celular⁷⁶.

Vale ressaltar que um pequeno número de CC, bem como CEC de cabeça e pescoço, mostram alta expressão de p16 sem ter associação com HPV^{74, 77}. Ainda, os relatos da expressão de p16 em amostras de tecidos normais adjacentes e tumorais de esôfago são pouco esclarecedores e sugerem sua investigação.

A imunohistoquímica para p16 é uma alternativa complementar ao teste de HPV em câncer de orofaringe atualmente, por possuir uma alta correlação entre a detecção de HPV e superexpressão de p16. No entanto, a ausência de um mecanismo de ligação direto e exclusivo entre a integração de DNA HPV e a expressão de p16, é o que justifica a não indicação deste teste isoladamente⁶⁰. Entretanto, um estudo realizado em 2014⁷⁸, mostrou que pacientes com CE apresentam importante aumento nos níveis de IgG anti-p16, comparados com sujeitos controles, sugerindo que as auto IgG circulantes para a proteína p16 podem ser potencial biomarcador para diagnóstico precoce de CE⁷⁸. No entanto, pouco se sabe sobre a relação da expressão de p16, Ki-67 ou dupla marcação p16/Ki-67 em tumores de esôfago HPV positivos ou negativos.

1.6 JUSTIFICATIVA

O CEC de esôfago é a oitava neoplasia maligna mais prevalente e sexta mais letal no mundo. A diferença significativa da taxa de prevalência da neoplasia em uma mesma população e a etiologia inconclusiva do CEC sugerem a existência de múltiplos fatores de risco para doença, destacando-se o HPV que foi sugerido como potencial candidato a esse papel há anos.

Ainda é pouco esclarecido o fator determinante para que a maquinaria das células infectadas por HPV progrida na via carcinogênica⁷⁹.

Diante da escassez de estudos sobre o papel de HPV de alto risco no CE e vias moleculares ativadas durante a carcinogênese, o atual projeto se propõe a estudar este assunto na população brasileira representada por indivíduos admitidos no Hospital de Câncer de Barretos, hospital de referência em Oncologia, oriundos de vários estados do país. Além disso, também serão investigadas proteínas críticas no processo de malignização que estão associadas direta ou indiretamente às vias celulares influenciadas pelo HPV. Muitas dessas proteínas estão em investigação e algumas demonstram resultados promissores, embora dependentes de coleta

prospectiva e maior número de amostras investigadas para a definição de sua utilidade clínica⁸⁰.

Portanto, objetivamos avaliar a expressão de moléculas-chave do ciclo celular como p53, p16 e Ki-67 no desenvolvimento de carcinoma esofágico associado ou não ao HPV. Um consenso nesse tema ajudaria na implementação de medidas preventivas da doença e estratégias de tratamento que podem contribuir com aumento da sobrevida e qualidade de vida dos pacientes.

2 OBJETIVO

2.1 Geral

Avaliar a frequência de HPV de alto risco no carcinoma de células escamosas de esôfago e a expressão de marcadores moleculares relacionados à carcinogênese esofágica.

2.2 Específicos

1. Avaliar a frequência de HPV-16 nas amostras de pacientes portadores de CE e controles utilizando-se técnica de PCR em tempo real específica para este tipo viral.

2. Avaliar a frequência de HPV de alto risco nas amostras de pacientes portadores de CE e controles utilizando-se técnica de Luminex.

3. Avaliar a expressão das proteínas p53, p16 e Ki-67 em amostras de CE e controles.

4. Avaliar a relação dos marcadores moleculares com a presença de HPV de alto risco e as variáveis sócio-demográficas e clínicas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento do estudo

Este projeto compreendeu a coleta prospectiva de amostras obtidas de pacientes admitidos no HCB - FPXI com diagnóstico de CEC de esôfago, confirmado por histopatologia ou imunohistoquímica, pelo Departamento de Patologia da mesma instituição, após realização da Endoscopia Digestiva Alta (EDA). Amostras de pacientes saudáveis (controles) foram obtidas no Ambulatório Médico de Especialidades (AME - Clínico) de Barretos à partir da realização de EDA por solicitação não oncológica. O desenvolvimento do projeto compreendeu também a colaboração dos Departamentos de Patologia, Endoscopia, Digestivo Alto, Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular do Hospital de Câncer de Barretos e Departamento de Endoscopia do AME Clínico de Barretos.

3.2 População de estudo

3.2.1 Casos:

Critérios de inclusão

- Confirmação histopatológica ou por imunohistoquímica de CEC de esôfago.
- Idade igual ou acima de 18 anos.
- Ambos os sexos.
- Indicação de EDA.

Critérios de exclusão

- Voluntários que apresentem dificuldade de entendimento do protocolo de pesquisa.
- Condição clínica desfavorável do paciente para ser submetido aos procedimentos de coleta de amostra biológica para o estudo durante a EDA.
- Quantidade de amostra insuficiente e/ou qualidade inapropriada.
- Ausência de neoplasia na amostra analisada.

3.2.2 Controles

Critérios de inclusão

- Indivíduos sem neoplasia do esôfago.
- Idade igual ou acima de 18 anos.
- Ambos os sexos.
- Indicação de EDA por afecção benigna do sistema digestivo, exceto no esôfago.

Critérios de exclusão

- Voluntários que apresentem dificuldade de entendimento do protocolo de pesquisa.
- Condição clínica desfavorável do paciente para ser submetido aos procedimentos de coleta de amostra biológica para o estudo durante a EDA.
- Quantidade de amostra insuficiente e/ou qualidade inapropriada.

3.3 Tamanho amostral

O cálculo do tamanho amostral foi baseado em semelhante estudo caso-controle chinês previamente publicado⁸¹. De acordo com o estudo, a taxa de infecção de HPV de alto risco em câncer de esôfago é de aproximadamente 31%, enquanto indivíduos saudáveis apresentam taxa de 6%. Considerando um nível de significância de 5%, poder de 0.9 e diferença de 20%, calculou-se a necessidade de 82 sujeitos em cada grupo do estudo (caso e controle). Para assegurar melhor poder do teste, optou-se por aumentar a casuística calculada para 101 indivíduos em cada grupo do estudo.

Tabela 1 - Tamanho amostral considerando 5% de significância

Poder	Diferença entre os grupos					
	5%	10%	15%	20%	25%	30%
0.9	1707	399	163	82	46	27
0.8	1284	301	123	61	35	20

3.4 Inclusão dos participantes do estudo

Os casos foram abordados na primeira visita clínica ao ambulatório do Aparelho Digestivo Alto do HCB - FPXII. Os controles foram recrutados aleatoriamente no AME

da mesma cidade no dia da realização do exame de EDA. Para fins de análise, os controles foram considerados elegíveis quando apresentaram as variáveis gênero e idade, com intervalo de no máximo 3 anos, compatíveis com as dos casos.

Os casos e controles abordados foram encaminhados a uma sala reservada e convidados a participar do estudo, sendo orientados de que não sofreriam qualquer prejuízo no seu tratamento ou conduta médico laboratorial caso não participassem do estudo. Foi explicado ao indivíduo o objetivo do trabalho e dada a ele garantia de sigilo de sua identidade e de qualquer informação relatada. Após aceitar participar da pesquisa, paciente e aplicador do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) assinaram as duas vias do documento (Anexos 2 e 3), sendo que uma via foi entregue ao paciente e a outra foi encaminhada aos arquivos do estudo. Os pacientes também responderam um instrumento de coleta de dados contendo informações sociodemográficas e a respeito de fatores de risco conhecidos para o CEC de esôfago e também para infecção por HPV (Anexo 4). Porém, este estudo não abordou todas as variáveis contidas no instrumento de coleta de dados aplicado porque muitas foram temática de outro projeto do grupo.

Variáveis analisadas no estudo

As entrevistas forneceram informações para caracterizar o tempo e o tipo das exposições. As exposições estudadas referem-se às características sociodemográficas, estilo de vida (consumo de álcool e tabaco), clínicas, e infecção pelo HPV. As variáveis do estudo podem ser observadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Variáveis do estudo

Grupo de variáveis	Variáveis do estudo
Sociodemográficas	<i>Idade, sexo</i>
Estilo de vida	<i>álcool, tabaco</i>
<i>Clínicas</i>	<i>Estadiamento TNM, Grau de diferenciação tumoral, Topografia do tumor, Infecção por HPV</i>

Para fins de análise estatística, algumas variáveis foram recategorizadas. A variável idade foi categorizada, de acordo com o valor da mediana, em “<60 anos” e “≥60 anos”.

Para a investigação relacionada ao consumo de álcool e tabaco, o participante da pesquisa foi interrogado sobre os tipos de bebida ingerida (álcool: cerveja, vinho e destilados) e tabaco utilizado (tabaco: cigarro de filtro, cigarro de palha, cachimbo e charuto). Para ambos os hábitos, quando a resposta foi “sim”, houve investigação mais detalhada sobre a idade de início e de término, quantidade e frequência. Foi considerado consumo atual de bebida alcoólica se o participante de pesquisa referiu ter abandonado o consumo nos últimos 12 meses.

Para quantificar o consumo de álcool, foi utilizado o cálculo de consumo de bebidas alcoólicas (grama de etanol por mililitro por dia) observado na Figura 2⁸². Considerou-se teor alcoólico de 5% para cerveja, 12% para vinho e de 40% para destilados. Quando o participante da pesquisa referiu ter consumido mais de um tipo de bebida alcoólica não simultaneamente, o valor obtido no cálculo foi somado. A variável contínua “Gramas de etanol por mililitro por dia” foi categorizada (ponto de corte: 30 gramas de etanol por mililitro por dia)⁸³.

$$\text{tipo de bebida} = \frac{(\text{unidades} \times \text{quantidade})}{\text{frequência}_{\text{dia}}} \times (\text{teor alcólico} \times 0,80) \times 365 \times \\ (\text{idade final} - \text{idade inicial}) / (\text{total de tempo em dias de consumo})$$

Figura 2 - Cálculo de consumo de bebidas alcoólicas.

Para estabelecer uma variável que considerasse o valor total de tabaco consumido e que permitisse a comparação entre os participantes da pesquisa, foi estimado que cada cigarro (filtro ou palha) teria 1 grama de tabaco, cada charuto 4 gramas e cada cachimbo 3 gramas. Após esta transformação, foi somada a quantidade de gramas consumidas e dividida por 20 (quantidade de gramas de tabaco existente em um maço de cigarros). Este valor foi multiplicado pelo número de anos de consumo para se obter assim, média de maços consumidos por ano⁸⁴. A variável contínua “Maços de tabaco consumidos por ano” foi categorizada (ponto de corte: 40 maços-ano)⁸⁵.

A infecção pelo HPV foi investigada no material biológico coletado de acordo com o protocolo descrito nesta dissertação, definindo-se o resultado como “negativo” e “positivo”.

As informações clínicas foram obtidas em um instrumento de coleta de dados padronizado (Anexo 5 - Instrumento de coleta de dados clínicos) através dos dados descritos no prontuário médico de cada participante da pesquisa do grupo “caso”.

Método endoscópico e coleta de amostra biológica de esôfago

A EDA foi realizada seguindo a rotina do Departamento de Endoscopia do Hospital de Câncer de Barretos e AME Clínico, utilizando sedação e video-endoscópios flexíveis (Olympus 180, Japão; Fuginon 4400, Japão) (Figura 3). Após o exame visual, as biópsias endoscópicas foram coletadas em ordem previamente estabelecida: 1) para casos: biópsia da porção esofágica normal adjacente ao tumor (não tumoral) (Figura 4) seguida pela tumoral (Figura 5); 2) para controles: biópsia da região distal seguida pela proximal. O material coletado foi fixado em formalina e incluído em parafina de acordo com a rotina do Departamento de Patologia do Hospital de Câncer de Barretos para diagnóstico histológico.

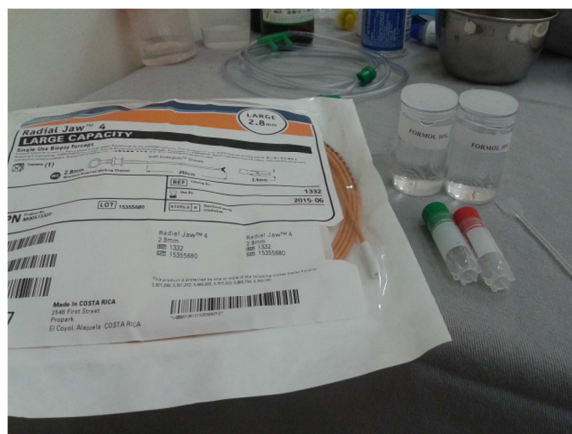


Figura 3 - Material utilizado na EDA para coleta de amostra biológica para o projeto: Pinça endoscópica, frascos contendo formol 4% e criotubos para congelamento do tecido em nitrogênio líquido, sendo a tampa vermelha padronizada para coleta de amostra tumoral e tampa verde para amostra de tecido endoscopicamente normal.

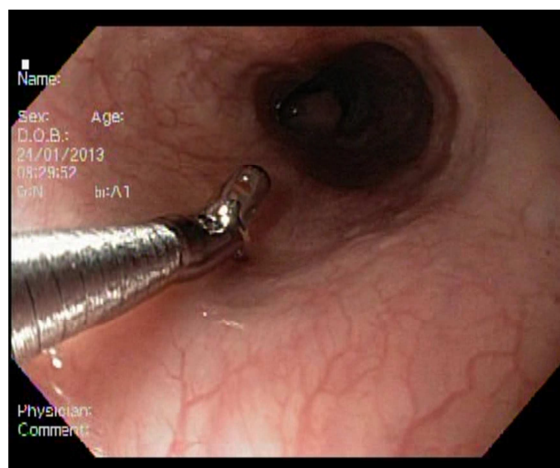


Figura 4 - Imagem de procedimento endoscópico: A pinça está localizada em área normal adjacente ao tumor onde o fragmento será coletado.

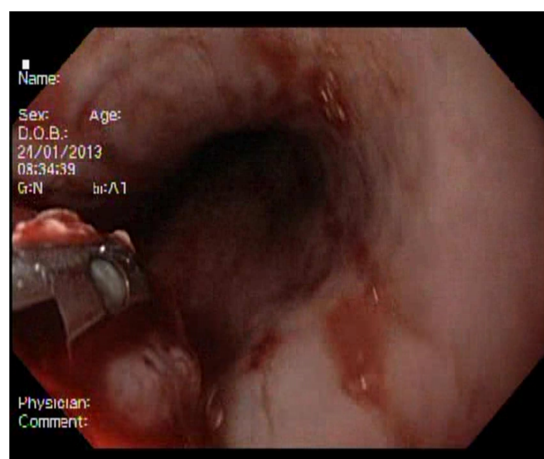


Figura 5 - Imagem de procedimento endoscópico na área tumoral: A pinça localizada na área tumoral coletou fragmento tecidual representativo da região.

3.5 Detecção de HPV

Essa etapa foi executada para identificar o DNA HPV nas amostras obtidas. Resumidamente, o protocolo segue as seguintes etapas:

Desparafinização e extração de DNA

O DNA das amostras incluídas em parafina foi extraído à partir de 3 a 5 cortes de 10 micras cada. Para evitar contaminação das amostras, um bloco vazio foi cortado

entre cada bloco de paciente. Inicialmente, as lâminas contendo os cortes foram coradas com Hematoxilina & Eosina (HE, Merck KGaA, GE) de acordo com o protocolo de rotina do Departamento de Patologia do HCB e avaliadas por um patologista experiente para a seleção microscópica da área de interesse representativa da neoplasia, livre de necrose ou calcificações, no caso de tecido tumoral e, aquela livre de alterações (neoplasia ou calcificações) para os tecidos normais, tanto adjacente quanto de indivíduos controle.

As lâminas contendo os cortes foram submetidas à etapa de desparafinização por aquecimento (70°C – 15min), seguido de lavagens sequenciais em xilol (Merck KGaA, GE) (2 vezes de 5 min), etanol (Merck KGaA, GE) (1 vez de 1 min - 100%/ 70%/ 50%) e água mili Q (1 vez de 1 min). Em seguida, o material contido na área demarcada pelo patologista foi rigorosamente raspado com uma agulha (40 mm x 120mm) e colocado em tubo de polipropileno de 1,5mL, livre de RNase e DNase (Axygen, USA) contendo tampão ATL e RNA carrier, de acordo com o protocolo *DNA QIAamp Micro Kit* (Qiagen, USA). Após dissecação macroscópica, as amostras foram submetidas à etapa de digestão enzimática com o tampão ATL e proteinase K por uma noite à 56°C e 700 rpm. Posteriormente, o material lisado foi aplicado à coluna *QIAamp Mini spin* e submetido à várias etapas de centrifugação para lavagem do material nucléico aderido a membrana. O DNA ligado à coluna foi eluído em 30-50µL de água livre de RNase e DNase (Qiagen, USA) e estocado em freezer à -20°C até o momento do uso.

Análise do DNA extraído

A quantidade do DNA extraído das biópsias foi avaliada por espectrometria (NanoDrop 2000 - ThermoScientific), de acordo com as instruções do fabricante. A integridade do DNA obtido pelo processamento anteriormente descrito foi confirmada por PCR convencional utilizando *primers* PCO3 (5'-ACACAACTGTGTTCACTAGC-3') e PCO4 (5'-CAACTTCATCCACGTTACC-3') para detecção de um fragmento pequeno de 110pb do gene da β -globina humana. A mistura da PCR foi composta por 20mM de Tris-HCl pH 8,4 (Invitrogen, USA), 50mM de KCl (Invitrogen, USA), 4mM de MgCl₂ (Invitrogen, USA), 200µM de dNTP mix (Invitrogen, USA), 200nM dos iniciadores⁸⁶, 1,25U de Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen, USA) e água DNase RNase free (Gibco/BRL, Life Technologies, USA) para volume final de 25 µL. Como fita molde foram

utilizados 5 µL do DNA extraído. A amplificação em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf, Germany) foi realizada de acordo com o protocolo: 94°C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos (94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto) e extensão final de 72°C por 10 minutos. Após reação, a eletroforese em gel de agarose 2,0% com *Gel Red* (Biotium, Hayward, CA) foi feita a 90V por 10 min e 110V por 70 min em Electrophoresis Power Supply-EPS 301 GE. Após término da corrida, a presença de banda foi avaliada no ImageQuant LAS 4000 mini GE. Somente as amostras positivas para β-globina foram utilizadas no ensaio de detecção de HPV.

3.5.1 Detecção de HPV-16 por PCR em tempo real específico

Esta etapa foi realizada utilizando TaqMan Universal PCR Master Mix 1x (Applied Biosystems, Inc., EUA), 400nM de cada iniciador para a região E7 do vírus, *forward* (5'-GATGAAATAGATGGTCCAGC-3') e *reverse* (5'-GCTTTGTACGCACAACCGAAGC-3')⁸⁷, 200nM da sonda (5'-6FAM-CAAGCAGAACCGGACAG-MGBNFQ-3') e água DNase RNase free (Gibco/BRL, Life Technologies, USA) para volume final de 25µL. Como fita molde, foram utilizados 5µL de DNA extraído de cada amostra. Em todas as reações de PCR em tempo real específica para HPV-16 foram adicionados controles positivo (DNA extraído de célula Caski) e negativo (água). Todas as amostras e controles foram testados em duplicata, sendo consideradas positivas aquelas amostras cujo *threshold cycle* (Ct) foi inferior a 38 nas duas replicatas.

As reações de PCR em tempo real são caracterizadas pelo aumento da fluorescência da sonda a cada ciclo de polimerização das moléculas, atingindo um limiar (*threshold*) em que todas as amostras podem ser comparadas. O ciclo exato no qual o limiar de fluorescência é definido denomina-se Ct; as amostras mais concentradas (com maior número de fitas molde iniciais) atingem o limiar mais precocemente e mostram valores de Ct mais baixos.

3.5.2 Detecção de α-HPV de alto risco por PCR multiplex (Luminex)

Condições para a reação

As reações de PCR foram realizadas conforme previamente descrito⁶², utilizando-se uma mistura de iniciadores específicos para a amplificação de um fragmento do gene *E7* de um amplo espectro de tipos de HPV do gênero *α-papillomavirus*. Esta mistura contém iniciadores capazes de amplificar os seguintes tipos: HPV-16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82, considerados alto ou provável alto risco; HPV-6, 11, 70, considerados como baixo risco oncogênico⁸⁸. Assim, este ensaio possibilitou a detecção simultânea e genotipagem de 21 tipos de HPV por amostra.

Dois iniciadores para a amplificação de um fragmento do gene da β -globina humana foram também adicionados ao ensaio para controlar a qualidade do DNA molde. As reações de PCR, em unicata, fizeram uso do QIAGEN Multiplex PCR *kit* (Qiagen, Dusseldorf, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. Para um volume de reação de 25 μ L, foram utilizados 10 μ L do DNA extraído. Foram efetuados 45 ciclos de amplificação; cada ciclo incluiu 30 segundos de desnaturação a 94°C, 3 minutos de anelamento a 63°C e 1,5 minutos de alongamento da cadeia a 72°C. O primeiro ciclo é precedido por 15 minutos de desnaturação a 95°C e o último ciclo é estendido por 10 minutos de alongamento a 72°C. Como controle negativo da reação de PCR, foi incluído um tubo com a mistura de reação sem DNA.

Ensaio de hibridização

As sondas α -HPV tipo-específicas foram acopladas às microesferas de poliestireno pelo Dr. Tarik Gheit no Laboratório de Infecção e Biologia do Câncer do IARC, em Lyon, na França. Para a genotipagem dos α -HPV pela tecnologia de Luminex, foram utilizados 10 μ L dos produtos de PCR⁸⁹.

Resumidamente, os produtos amplificados foram adicionados a 40 μ L da solução de microesferas-sondas em placas de 96 poços. Estima-se que este volume de solução microesferas-sondas contenha em torno de 200 microesferas acopladas a cada sonda α -HPV tipo-específica. Em seguida, as misturas foram desnaturadas por aquecimento a 95°C por 15 minutos. Após incubação em gelo por 1 minuto, a placa foi agitada a 500rpm a 40°C por 30 minutos, no escuro. As misturas foram então transferidas para uma placa com filtro que permite lavagem a vácuo (Multiscreen Filter Plates, Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) utilizando-se 100 μ L de solução de

lavagem (PBS 1X, Tween 20 0,02%) a 5mmHg. Em seguida, foram adicionados 50µL de uma solução de estreptavidina-R-ficoeritrina (Bio-rad, Hercules, CA, EUA) diluída 1:750 em solução de coloração (Sarcozyl 20%, Tris HCl 1mM, EDTA 0,5mM, 4,5M TMAC). Após incubação por 30 minutos a 600rpm e temperatura ambiente, foram realizadas duas lavagens com 100µL de solução de lavagem. As microesferas-sondas hibridizadas ao produto de PCR foram finalmente ressuspensas em 100µL de solução de lavagem por incubação a 600rpm por 5 minutos para então, seguir à análise no equipamento Luminex 200 (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha).

Este leitor contém dois *lasers*: um para identificar o conjunto de esferas coradas internamente (ensaio qualitativo) e outro para quantificar a fluorescência reportada pela esfera (ensaio semi-quantitativo). As leituras foram realizadas utilizando-se o programa xPONENT 3.1 (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha), configurado para discriminar microesferas individuais de duplas no intervalo de 8.000-15.000 (*Doublet Discriminator Gate*, D.D.Gate) num período de 60 segundos (*time-out*). Os resultados foram expressos através da intensidade de fluorescência média (MFI) de pelo menos 100 esferas de cada analito (sonda tipo-específica).

Análise do teste Luminex

Para cada sonda α -HPV tipo-específica, os valores de MFI obtidos quando nenhum produto de PCR é adicionado à mistura de hibridação, são considerados os valores de fundo (*background*). Os valores finais foram calculados adicionando-se 5 MFI para 1.1X ao valor de fundo mediano. Foram considerados valores positivos aqueles que apresentaram mais que 20 MFI.

3.6 Detecção de marcadores moleculares relacionados à infecção por HPV e carcinogênese esofágica por imunohistoquímica

3.6.1 p53

Os espécimes tumorais conservados em parafina foram analisados por IHC para a expressão da proteína p53 através de sistema automatizado Ventana Benchmark ULTRA. Resumidamente, lâminas contendo cortes de 4 µm foram submetidas à

aquecimento (75°C por 4 minutos) e desparafinização (72°C). A seguir, foi efetuada a recuperação antigênica em tampão Cell conditioning 1 (CC1) à 95°C por 64 min. O anticorpo primário p53 (Cell Marque, Rocklin, CA, USA) foi adicionado na diluição sugerida pelo fabricante e aplicado nas amostras por 32 min. Para detecção da reação imune, foi utilizado o sistema de amplificação por polímero UltraView Universal DAB Detection Kit (Ventana Medical Systems) e a contra coloração foi realizada utilizando Hematoxilina II por 12 min e Bluing reagent por 4 min, de acordo com as especificações do fabricante. Como controle positivo foi utilizado tecido de carcinoma de cólon com expressão nuclear positiva de p53 e, como controle negativo, foi utilizado tecido de carcinoma de mama sem expressão nuclear de p53.

As lâminas foram avaliadas quanto à expressão nuclear, sendo consideradas positivas para a expressão de p53, aquelas amostras que possuíam pelo menos 10% de marcação nuclear forte⁹⁰.

3.6.2 p16 e Ki67

A IHC para a expressão da dupla marcação de p16/Ki-67 foi analisada através do sistema automatizado Ventana Benchmark ULTRA. Resumidamente, lâminas contendo cortes de 4 µm foram submetidas à aquecimento (75°C por 4 minutos) e desparafinização (72°C). A seguir, foi efetuada a recuperação antigênica em tampão Cell conditioning 1 (CC1) à 95°C por 64 min. O primeiro anticorpo p16 (Roche diagnóstica, Brasil) foi adicionado por 20 min à 36°C, seguido de 4 minutos de aquecimento à 95°C para a desnaturação do anticorpo excedente. Finalmente, o segundo anticorpo Ki-67 (Cell Marque, Rocklin, CA, USA) foi adicionado por 32 minutos à temperatura ambiente. Para detecção da reação imune, foram utilizados os sistemas de amplificação por polímero UltraView Universal DAB Detection Kit (Ventana Medical Systems) e UltraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit (Ventana Medical Systems), de acordo com as especificações do fabricante. A contra coloração foi realizada utilizando Hematoxilina II por 4 minutos e Bluing reagent por 4 minutos. Como controle positivo foi utilizado tecido de adenocarcinoma de colo uterino com dupla marcação para p16/Ki-67. O controle negativo foi tratado identicamente, mas com omissão do anticorpo primário. Para a proteína p16, as amostras com marcação forte e difusa em mais de 70% do tecido foram consideradas positivas. Para a

expressão de Ki-67, as lâminas foram avaliadas usando escore de porcentagem de células marcadas (0, 0% de células imunoreativas; 1, 1-25% de células imunoreativas; 2, 26-75% de células imunoreativas; e 3, >75% de células imunoreativas).

As características dos anticorpos utilizados na IHC estão resumidamente demonstradas na tabela 3 e os critérios para a análise das marcações estão resumidos na tabela 4.

Tabela 3 - Características dos anticorpos utilizados no estudo

Proteína de interesse	Clone	Origem	Tipo de anticorpo	Diluição
p53	DO-7	Camundongo	Monoclonal	1:1200
p16	E6H4™	Camundongo	Monoclonal	Pronto para uso
Ki67	SP6	Coelho	Monoclonal	1:100

Tabela 4 - Critérios para resultado da imunohistoquímica dos marcadores investigados

Antígeno	Classificação	Escore final
p53	Negativo	< 10% de marcação forte
	Positivo	≥ 10% de marcação forte
p16	Negativo	< 69% de marcação forte e difusa
	Positivo	≥ 70% de marcação forte e difusa
Ki-67	Negativo	0% de marcação
	Positivo	≥ 1% de marcação

3.7 Análises estatísticas

A descrição da população do estudo foi realizada a partir de tabelas de frequências e, para a comparação entre os grupos descritos nos objetivos específicos, foram utilizados os teste do Qui-quadrado, teste exato de Fisher, teste de Mc Nemar e teste de Q-Cochran. Para a valiação da concordância entre as técnicas de detecção de HPV foi utilizado o teste de concordância de Kappa.

O nível de significância adotado foi de 0,05 (5%). Para a tabulação e análise estatística foi utilizado o software IBM® SPSS® Statistics 21.0 para Windows (IBM Corporation, Route 100, Somers NY 10589).

4 RESULTADOS

4.1. Inclusão dos indivíduos de pesquisa

No período entre janeiro de 2013 a agosto de 2014, aproximadamente 1098 pacientes foram admitidos pela primeira vez no Departamento do Digestivo Alto do HCB com as principais suspeitas de câncer de estômago, fígado, pâncreas e esôfago.

Aqueles pacientes com suspeita de CEC de esôfago que possuíam indicação de EDA foram considerados elegíveis para o estudo. Destes, pacientes foram incluídos consecutivamente no estudo até atingir o tamanho amostral de 101.

Para os controles, 101 pacientes com indicação de EDA agendados no departamento de endoscopia do AME Clínico de Barretos foram recrutados para o estudo, por terem sexo e idade (± 3 anos) pareados com os casos, durante os meses de abril de 2013 a outubro de 2014.

Antes de realizar a identificação de HPV por diferentes técnicas, foi feita a caracterização da população (caso x controle) e somente do tecido tumoral, objetos de estudo deste projeto.

4.2 Caracterização da população de estudo

Com intuito de verificar os principais fatores de risco para o desenvolvimento do CE e também para a infecção por HPV, foi feita uma caracterização da população de ambos os grupos do estudo, caso e controle.

A população do estudo foi composta, em sua maioria, por homens com idade superior a 60 anos para os dois grupos. Como já esperado, após o pareamento dos grupos, não houve diferença estatisticamente significativa entre caso e controle para as variáveis sexo e idade (Tabela 5).

Em relação às variáveis consumo de álcool ($p=0,001$), tabaco ($p=0,035$) e álcool + tabaco, foi encontrada diferença estatística ($p=0,001$) entre os grupos caso e controle, sendo que os indivíduos do grupo caso fizeram mais consumo de álcool e tabaco, separados e concomitantemente, em relação aos indivíduos do grupo controle (Tabela 5).

Tabela 5 - Caracterização da população de estudo

Variável * / Categoria	Casos		Controles		p
	n	(%)	n	(%)	
Sexo					
Masculino	80	79,2	80	79,2	1,000
Feminino	21	20,8	21	20,8	
Idade					
≤ 60 anos	53	52,5	50	49,5	0,673
>60 anos	48	47,5	51	50,5	
Álcool					
Não	10	9,9	28	27,7	0,001
Sim	91	90,1	73	72,3	
Tabaco					
Não	19	18,8	32	31,7	0,035
Sim	82	81,2	69	68,3	
Álcool + Tabaco					
Nunca bebeu nem fumou	3	3,0	19	18,8	0,001
Bebe e fuma	75	74,3	60	59,4	
Bebe ou fuma	23	22,8	22	21,8	

4.3 Caracterização do tecido tumoral

A análise do tecido de tumor de esôfago quanto às variáveis anteriormente citadas, mostrou que o grau de diferenciação mais frequentemente encontrado foi o moderado, com predomínio de tumores localizados no terço médio do esôfago e estadiamento TNM avançado. Além disso, a revisão de prontuários realizada em março de 2014 forneceu a informação de que 54,5% dos pacientes incluídos no estudo foram à óbito devido à doença e somente 18,8% permanecem vivos sem CE (Tabela 6).

Tabela 6 - Caracterização do tecido tumoral

Variável	Categoria	n	%
Grau de diferenciação	Bem	13	13,4
	Moderado	56	57,7
	Pouco	28	28,9
Topografia	Terço superior	3	3,0
	Terço médio	57	56,4
	Terço inferior	8	7,9
	Mais de uma localização	33	32,7
Estadiamento TNM	I e II	23	22,4
	III e IV	72	75,8
T	T1/T2	10	11,2
	T3/T4	79	88,8
N	N0	26	37,1
	N positivo	44	62,9
M	M0	76	80,0
	M1	19	20,0
Status do paciente	Óbito por câncer	55	54,5
	Vivo com doença	27	26,7
	Vivo sem doença	19	18,8

4.4 Identificação de HPV

Após conhecimento das características dos pacientes e do tecido tumoral analisados no estudo, iniciou-se a etapa de identificação de DNA HPV.

Extração de DNA

Para a identificação de HPV nas amostras coletadas, o DNA foi cuidadosamente extraído da região de interesse delimitada pelo patologista e, de acordo com o protocolo de coleta de material biológico anteriormente descrito, os 101 casos originaram 202 amostras de DNA: uma oriunda do tecido normal adjacente ao tumor e outra do tecido tumoral. Os 101 controles originaram 202 amostras, uma correspondente à região distal e outra à proximal do esôfago. Diante disto, para evitar contaminação entre as amostras obtidas de diferentes locais e grupos, cada uma das regiões anatômicas foi processada em dias distintos.

Análise do DNA extraído

Com intuito de observar a integridade do DNA obtido após etapas de desparafinização, o material eluído da coluna foi utilizado em concentração padronizada na reação de PCR com iniciadores para uma sequência de β -globina humana de tamanho (110pb) semelhante aquele da sequencia consenso para HPV analisada a seguir. A presença de banda com tamanho de 110pb em todas as amostras analisadas (figura 6) e obtidas de diversas preparações indicou que o DNA tem a integridade mínima exigida para a realização dos próximos experimentos.

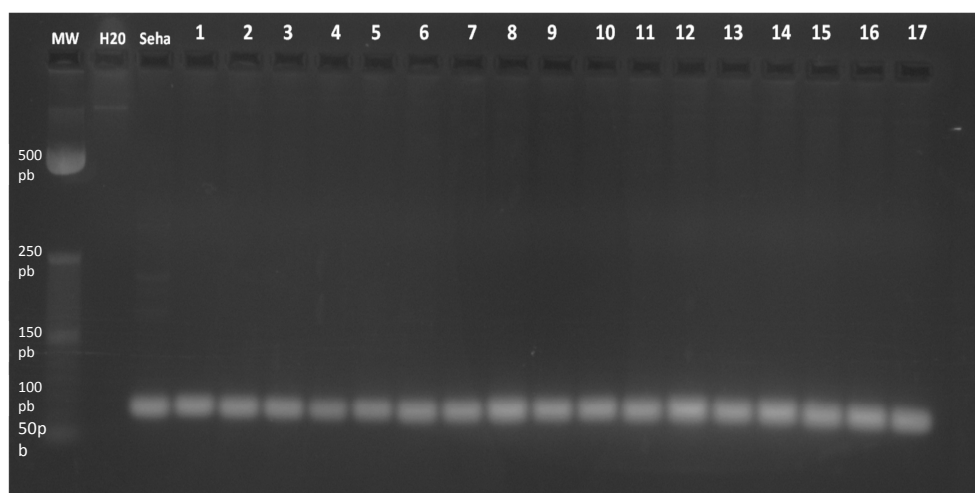


Figura 6 - Gel de agarose 1,5% após amplificação usando *primer* β -globina.
 MW: marcador de peso molecular (50pb); H₂O: controle negativo substituindo DNA por água; Seha: controle positivo, linhagem de colo uterino que expressa constitutivamente HPV; Amostras de 1-17: tecido esofágico proximal. Amplificação de DNA em todas as amostras.

4.4.1 Detecção de HPV-16 por PCR em tempo real específico

De acordo com a literatura, o HPV de alto risco mais frequente em CEC de esôfago e câncer do colo útero identificado na maioria das regiões do mundo é o HPV-16. Sendo assim, reações de PCR em tempo real utilizando iniciadores e sonda específicos para HPV-16 foram desenvolvidas, a fim de determinar a frequência de HPV-16 na população estudada.

Tendo como referência o valor de Ct da Caski e o número de ciclos para cada reação, foi estabelecido que amostras apresentando Ct<38 nos dois poços seriam consideradas positivas para HPV-16 e, obteve-se que as amostras de tecido esofágico

normal adjacente analisadas não continham DNA HPV-16 (0/101), enquanto o DNA viral foi detectado em 3,0% (3/101) dos tecidos tumoral analisados (Tabela 7).

Tabela 7 – Casos analisados para presença do HPV-16 por PCR em tempo real

Variável	Categoria	n	%
Tecido normal adjacente	Negativo	101	100,0
	Positivo	0	0,0
Tecido tumoral	Negativo	98	97,0
	Positivo	3	3,0

Nas amostras obtidas dos controles, o DNA HPV-16 foi detectado em 13,9% (14/101) das amostras de esôfago proximal e em 11,9% (12/101) das amostras de esôfago distal (Tabela 8).

Tabela 8 - Controles analisados para presença do HPV-16 por PCR em tempo real

Variável	Categoria	n	%
Esôfago proximal	Negativo	87	86,1
	Positivo	14	13,9
Esôfago distal	Negativo	89	88,1
	Positivo	12	11,9

Comparando-se a frequência de HPV-16 entre os grupos caso e controle, observou-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) entre os grupos estudados, porque o grupo controle apresenta predomínio de amostras HPV-16 positivas (20,8%) comparado com o grupo caso (3,0%) (Tabela 9).

Tabela 9 – Comparação da frequência de HPV-16 entre os grupos caso e controle

Grupo	Controle		Caso		p
	n	(%)	n	(%)	
HPV-16 Negativo	80	79,2	98	97,0	<0,001
HPV-16 Positivo	21	20,8	3	3,0	
Total	101	100,0	101	100,0	

$p < 0,05$

Testes utilizados: Qui-quadrado

*Para os grupos caso e controle foram considerados positivos aqueles indivíduos que tivessem detecção de DNA HPV-16 em pelo menos uma das regiões anatómicas analisadas.

Após constatar a maior frequência de HPV-16 no grupo controle, decidimos então investigar quais características sócio-demográficas poderiam ser distintas entre as populações, de acordo com a presença de HPV-16 e independente do grupo (Tabela 10). Como pode ser observado, não houve diferença estatisticamente significativa entre as populações HPV-16 negativa e positiva em relação às variáveis sociais analisadas.

Tabela 10 - Caracterização da população do estudo em relação à presença de HPV-16 e às variáveis sociodemográficas

Variáveis / Categoria	HPV-16**				p
	Negativo		Positivo		
	n	(%)	n	(%)	
Sexo					
Feminino	37	20,8	5	20,8	1,000*
Masculino	141	79,2	19	79,2	
Idade					
≤ 60 anos	89	50,0	14	58,3	0,443
>60 anos	89	50,0	10	41,7	
Álcool					
Não	33	18,5	5	20,8	0,783*
Sim	145	81,5	19	79,2	
Tabaco					
Não	42	23,6	9	37,5	0,141
Sim	136	76,4	15	62,5	
Tabaco + Álcool					
Nunca bebeu nem fumou	18	10,1	4	16,7	0,544
Bebe e fuma	121	68,0	14	58,3	
Bebe ou fuma	39	21,9	6	25,0	

p<0,05

Teste utilizado: Qui-quadrado ou *Fisher

**HPV detectado por PCR tempo real utilizando sonda específica para HPV-16

4.4.2 Detecção de α -HPV de alto risco por PCR multiplex (Luminex)

Diante da baixa frequência de detecção de HPV-16 no grupo caso e tendo disponível uma técnica que permite a identificação de 18 tipos diferentes de HPV de alto risco, decidimos por aplicar esta técnica na mesma casuística analisada por PCR em tempo real para HPV-16.

Comparando-se a frequência da positividade de HPV de alto risco entre os grupos caso e controle, observamos que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para essa técnica (Tabela 11).

Tabela 11 – Frequência de HPV de alto risco nos grupos caso e controle através do Luminex

Grupo	Controle		Caso		p
	n	(%)	n	(%)	
HPV alto risco negativo	77	77,8	70	78,7	0,885
HPV alto risco positivo	22	22,2	19	21,3	
Total	99	100,0	89	100,0	

p<0,05

Testes utilizados: Qui-quadrado

Analisando a frequência de HPV de alto risco em cada grupo isoladamente, foi detectado DNA HPV de alto risco em 7,4% das amostras de tecido esofágico normal adjacente analisadas (4/54) e, em 22,1% das amostras de tecido tumoral (17/77) (Tabela 12).

Tabela 12 – Casos analisados para presença de HPV de alto risco por Luminex

Variável	Categoria	n	%
Tecido normal adjacente	Negativo	50	92,6
	Positivo	4	7,4
Tecido tumoral	Negativo	60	77,9
	Positivo	17	22,1

Para o grupo controle, DNA HPV de alto risco foi detectado em 20,7% (15/80) das amostras de esôfago proximal e em 10,4% (8/77) das amostras de esôfago distal (Tabela 13).

Tabela 13 - Controles analisados para presença de HPV de alto risco por Luminex

Variável	Categoria	n	%
Esôfago proximal	Negativo	65	79,3
	Positivo	15	20,7
Esôfago distal	Negativo	69	89,6
	Positivo	8	10,4

Após detectar a frequência de HPV de alto risco nos dois grupos do estudo, foi feita a análise detalhada dos tipos de HPV encontrados pela técnica de Luminex em cada região anatômica (Tabela 14). Como observado, para o tecido normal adjacente, quatro tipos diferentes de HPV de alto risco (HPV-51, 31, 66.1 e 53) foram detectados em igual proporção (1,9%). Para o tecido tumoral, foram detectados os tipos HPV-16 (1,3%), 18 (1,3%), 51 (1,3%) e, predomínio do tipo HPV-56 (18,2%). Nos tecidos obtidos de controles, os tipos HPV-16 (7,4%), 18 (1,2%), 31 (7,3%) e 56 (8,5%) foram detectados em esôfago proximal, enquanto no esôfago distal, foram encontrados os tipos HPV-16 (1,3%), 31 (7,8%), 53 (1,3%) e 56 (1,3%), com predomínio do HPV-31.

Tabela 14 – Frequência dos tipos de HPV de alto risco detectados pelo Luminex

Variável / Categoria	Casos				Controles			
	Normal adjacente		Tumor		Proximal		Distal	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
HPV 51								
Positivo	1	1,9	1	1,3	0	0,0	0	0,0
Negativo	53	98,1	76	98,7	0	0,0	0	0,0
HPV 31								
Positivo	1	1,9	0	0,0	6	7,3	6	7,8
Negativo	53	98,1	0	0,0	76	92,7	71	92,2
HPV 66.1								
Positivo	1	1,9	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Negativo	53	98,1	0	0,0	0	0,0	0	0,0
HPV 53								
Positivo	1	1,9	0	0,0	0	0,0	1	1,3
Negativo	53	98,1	0	0,0	0	0,0	76	98,7
HPV 56								
Positivo	0	0,0	14	18,2	7	8,5	1	1,3
Negativo	0	0,0	63	81,8	75	91,5	76	98,7
HPV 18								
Positivo	0	0,0	1	1,3	1	1,2	0	0,0
Negativo	0	0,0	76	98,7	81	98,8	0	0,0
HPV 16								
Positivo	0	0,0	1	1,3	6	7,4	1	1,3
Negativo	0	0,0	76	98,7	75	92,6	76	98,7

Com objetivo de caracterizar a população estudada em relação ao status de HPV de alto risco detectado por Luminex, foi realizada uma análise entre a frequência

do vírus e as características sociodemográficas dessa população (Tabela 15). Como observado, não houve diferença estatisticamente significativa para as variáveis analisadas.

Tabela 15 - Caracterização da população do estudo em relação à presença de HPV de alto risco e as variáveis sociodemográficas.

Variáveis / Categoria	HPV alto risco*				p
	Negativo		Positivo		
	n	(%)	n	(%)	
Sexo					
Feminino	33	22,4	7	17,1	0,457
Masculino	114	77,6	34	82,9	
Idade					
≤ 60 anos	74	50,3	23	56,1	0,514
>60 anos	73	49,7	18	43,9	
Álcool					
Não	28	19,0	7	17,1	0,774
Sim	119	81,0	34	82,9	
Tabaco					
Não	34	23,1	14	34,1	0,153
Sim	113	76,9	27	65,9	
Tabaco + Álcool					
Nunca bebeu nem fumou	16	10,9	6	14,6	0,758
Bebe e fuma	101	68,7	26	63,4	
Bebe ou fuma	30	20,4	9	22,0	

p<0,05

Teste utilizado: Qui-quadrado

*HPV de alto risco considerando o teste Luminex

Diante da divergência de resultados sobre a frequência de HPV na mesma casuística, porém por duas técnicas diferentes, foi proposto avaliar a concordância dessas metodologias.

Concordância entre os métodos de detecção de HPV

A tabela 16 descreve detalhadamente os resultados da detecção de HPV por cada uma das duas metodologias realizadas no estudo e para cada amostra. Como observado para o tecido normal adjacente, a detecção de HPV em 4 amostras foi feita somente com a técnica de Luminex. A mesma técnica também detectou DNA HPV de

alto risco em 17 amostras tumorais, sendo que 1 delas também foi positiva por PCR em tempo real para HPV-16.

Para os controles, 7 amostras foram positivas para DNA HPV-16 por PCR em tempo real e Luminex, porém observamos que 12 amostras foram positivas para HPV-16 por PCR tempo real e negativas para HPV-16 por Luminex.

Tabela 16 – Descrição detalhada dos métodos de detecção de HPV

	HPV-16 PCR tempo real	HPV Luminex	HPV-51 (Luminex)	HPV-31 (Luminex)	HPV-56 (Luminex)	HPV-66.1 (Luminex)	HPV-18 (Luminex)	HPV-53 (Luminex)	HPV-16 (Luminex)
Tecido normal	Negativo	positivo	Não	Não	-	Não	-	Sim	-
	Negativo	positivo	Não	Sim	-	Não	-	Não	-
	Negativo	positivo	Não	Não	-	Sim	-	Não	-
	Negativo	positivo	Sim	Não	-	Não	-	Não	-
Tecido tumoral	Negativo	positivo	Não	-	Sim	-	Não	-	Não
	Negativo	positivo	Não	-	Sim	-	Não	-	Não
	Negativo	positivo	Não	-	Sim	-	Não	-	Não
	Negativo	positivo	Não	-	Sim	-	Não	-	Não
	Negativo	positivo	Não	-	Sim	-	Não	-	Não
	Negativo	positivo	Não	-	Sim	-	Não	-	Não
	Negativo	positivo	Não	-	Sim	-	Não	-	Não
	Negativo	positivo	Não	-	Sim	-	Não	-	Não
	Negativo	positivo	Não	-	Não	-	Sim	-	Não
	Positivo	positivo	Não	-	Não	-	Não	-	Sim
	Negativo	positivo	Não	-	Sim	-	Não	-	Não
	Negativo	positivo	Não	-	Sim	-	Não	-	Não
	Negativo	positivo	Não	-	Sim	-	Não	-	Não
	Negativo	positivo	Não	-	Sim	-	Não	-	Não
	Negativo	positivo	Não	-	Sim	-	Não	-	Não
	Negativo	positivo	Não	-	Sim	-	Não	-	Não
	Negativo	positivo	Não	-	Sim	-	Não	-	Não
	Negativo	positivo	Sim	-	Não	-	Não	-	Não
	Positivo	negativo	Não	-	Não	-	Não	-	Não
	Positivo	negativo	Não	-	Não	-	Não	-	Não
Tecido proximal	Negativo	positivo	-	Não	Não	-	Não	-	Sim
	Positivo	positivo	-	Não	Não	-	Não	-	Sim
	Positivo	positivo	-	Não	Sim	-	Não	-	Não
	Negativo	positivo	-	Não	Sim	-	Não	-	Não
	Negativo	positivo	-	Sim	Não	-	Não	-	Não
	Positivo	positivo	-	Sim	Não	-	Não	-	Sim
	Negativo	positivo	-	Não	Não	-	Sim	-	Não
	Negativo	positivo	-	Sim	Não	-	Não	-	Não
	Positivo	positivo	-	Não	Não	-	Não	-	Sim
	Positivo	positivo	-	Não	Não	-	Não	-	Sim

continua

	HPV16 PCR tempo real	HPV Luminex	HPV51 (Luminex)	HPV31 (Luminex)	HPV56 (Luminex)	HPV66.1 (Luminex)	HPV18 (Luminex)	HPV53 (Luminex)	HPV16 (Luminex)
continuação									
Tecido proximal	Negativo	positivo	-	Não	Sim	-	Não	-	Não
	Negativo	positivo	-	Não	Sim	-	Não	-	Não
	Negativo	positivo	-	Não	Sim	-	Não	-	Não
	Positivo	positivo	-	Não	Sim	-	Não	-	Sim
	Negativo	positivo	-	Sim	Não	-	Não	-	Não
	Negativo	positivo	-	Sim	Não	-	Não	-	Não
	Negativo	positivo	-	Sim	Sim	-	Não	-	Não
	Positivo	negativo	-	Não	Não	-	Não	-	Não
	Positivo	negativo	-	Não	Não	-	Não	-	Não
	Positivo	negativo	-	Não	Não	-	Não	-	Não
	Positivo	negativo	-	Não	Não	-	Não	-	Não
	Positivo	negativo	-	Não	Não	-	Não	-	Não
	Positivo	-	-	-	-	-	-	-	-
	Positivo	-	-	-	-	-	-	-	-
	Positivo	-	-	-	-	-	-	-	-
Tecido Distal	Negativo	positivo	-	Sim	Sim	-	-	Não	Não
	Negativo	positivo	-	Não	Não	-	-	Sim	Não
	Positivo	positivo	-	Não	Não	-	-	Não	Sim
	Negativo	positivo	-	Sim	Não	-	-	Não	Não
	Negativo	positivo	-	Sim	Não	-	-	Não	Não
	Negativo	positivo	-	Sim	Não	-	-	Não	Não
	Negativo	positivo	-	Sim	Não	-	-	Não	Não
	Negativo	positivo	-	Sim	Não	-	-	Não	Não
	Positivo	negativo	-	Não	Não	-	-	Não	Não
	Positivo	negativo	-	Não	Não	-	-	Não	Não
	Positivo	negativo	-	Não	Não	-	-	Não	Não
	Positivo	negativo	-	Não	Não	-	-	Não	Não
	Positivo	negativo	-	Não	Não	-	-	Não	Não
	Positivo	negativo	-	Não	Não	-	-	Não	Não
	Positivo	negativo	-	Não	Não	-	-	Não	Não
	Negativo	negativo	-	Não	Não	-	-	Não	Não
	Positivo	negativo	-	Não	Não	-	-	Não	Não
	Positivo	-	-	-	-	-	-	-	-
	Positivo	-	-	-	-	-	-	-	-
	Positivo	-	-	-	-	-	-	-	-
	Positivo	-	-	-	-	-	-	-	-
Negativo			-	-	-	-	-	-	-

Para avaliar estatisticamente a concordância entre as diferentes técnicas empregadas para a detecção de DNA HPV, foi realizado um teste de concordância de Kappa entre os métodos PCR tempo real específico para HPV-16 e Luminex (considerando apenas a detecção de HPV-16) e esta resultou em um valor considerado

moderado (Kappa=0,461) (Tabela 18), de acordo com os valores de referência adotados (Tabela 17).

Tabela 17 – Valores de referência teste de concordância de Kappa⁹¹

Valor de Kappa	Interpretação
<0	Não há concordância
0 - 0,19	Concordância pobre
0,20 – 0,39	Concordância ligeira
0,40 – 0,59	Concordância moderada
0,60 – 0,79	Concordância substancial
0,80 – 1,00	Concordância quase perfeita

Tabela 18 - Concordância entre a detecção de HPV-16 por PCR tempo real e Luminex

	HPV-16 Luminex		Kappa
	Negativo	Positivo	
HPV-16 PCR tempo real			
Negativo	153	1	0,461
Positivo	15	8	
Total	168	9	

*Referência: Tabela 17

Ainda, foi avaliada a concordância geral entre as técnicas de detecção de DNA HPV, independente do grupo do estudo e da localização anatômica (Tabela 19). Como observado, a técnica Luminex apresentou capacidade estatisticamente maior ($p=0,012$) para fazer detecção do vírus (21,7%) quando comparada com o PCR em tempo real (12,2%).

Tabela 19 - Concordância entre as técnicas de detecção de HPV

Técnica					p
	Negativo		Positivo		
	n	(%)	n	(%)	
Luminex HPV Alto risco	148	78,3	41	21,7	0,012
PCR HPV16	166	87,8	23	12,2	

$p<0,05$

Teste utilizado: Cochran

Determinação da frequência geral de HPV de alto risco

Com intuito de obter uma frequência geral de HPV de alto risco na população estudada, foi feita análise unindo todos os indivíduos que foram positivos para DNA HPV em pelo menos uma técnica (Luminex ou PCR em tempo real para HPV-16). Deste modo, a frequência geral de HPV de alto risco detectada na população estudada foi fornecida pela somatória do número de amostras HPV-16 positivas por PCR tempo real e o número de amostras HPV alto risco positivas pelo Luminex, agrupando os resultados obtidos para cada região anatômica e considerando positivo aquele indivíduo positivo para HPV de alto risco em pelo menos uma localização. Assim, verificou-se diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,028$), com maior positividade de HPV de alto risco nas amostras do grupo controle (34,7%) comparadas com o grupo caso (20,8%) (Tabela 20).

Tabela 20 – Comparação da frequência de HPV de alto risco entre os grupos caso e controle

Grupo	Controle		Caso		p
	n	(%)	n	(%)	
HPV alto risco negativo*	66	65,3	80	79,2	0,028
HPV alto risco positivo*	35	34,7	21	20,8	
Total	101	100,0	101	100,0	

$p<0,05$

Testes utilizados: Qui-quadrado

*HPV de alto risco considerando os testes PCR em tempo real + Luminex

Analisando cada grupo separadamente, obteve-se para o grupo caso que a frequência geral de HPV alto risco foi significativamente maior no tecido tumoral (18,8%) comparado ao tecido normal adjacente (4,7%) ($p=0,001$) (Tabela 21).

Tabela 21 - Frequência geral de HPV de alto risco para os tecidos do grupo caso

Variável / Categoria	Grupo					P
	Tumor		Normal adjacente			
	n	(%)	n	(%)		
HPV de alto risco*						
Negativo	82	81,2	81	95,3	0,001	
Positivo	19	18,8	4	4,7		

$p<0,05$

Teste utilizado: McNemar

*HPV de alto risco considerando os testes PCR tempo real e Luminex

Em relação à análise descritiva da frequência geral de HPV de alto risco para os indivíduos do grupo controle (Tabela 22), encontramos que 24,8% das amostras de esôfago proximal foram positivas, enquanto 18,8% das amostras de esôfago distal analisadas foram positivas para HPV de alto risco.

Tabela 22 - Descrição da frequência geral de HPV de alto risco nos controles incluídos no estudo

Variável	Categoria	n	%
Esôfago proximal	Negativo	76	75,2
	Positivo	25	24,8
Esôfago distal	Negativo	82	81,2
	Positivo	19	18,8

Após analisar a frequência geral de HPV de alto risco entre caso e controle e, entre tecidos do grupo caso, comparamos também a positividade do tecido normal adjacente com o controle. Foi obtido que os controles apresentam frequência de HPV de alto risco significativamente maior (34,7%) ($p < 0,001$) que o tecido normal adjacente (4,7%) (Tabela 23).

Tabela 23 - Frequência de HPV de alto risco entre tecido normal adjacente e controle

Variável / Categoria	Grupo				p
	Normal adjacente		Controle		
	n	(%)	n	(%)	
HPV de alto risco*					
Negativo	81	95,3	66	65,3	<0,001
Positivo	4	4,7	35	34,7	

$p < 0,05$

Teste utilizado: Chi-quadrado

*HPV de alto risco considerando os testes PCR tempo real e Luminex

Após calcular a frequência geral de HPV de alto risco para os grupos e tecidos do estudo, decidimos caracterizar as amostras positivas para DNA HPV de alto risco, independente do grupo de estudo, em relação às variáveis sociodemográficas. Como demonstrado (Tabela 24), não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos HPV alto risco positivo e negativo, para as variáveis testadas.

Tabela 24 - Caracterização da população HPV de alto risco positiva e negativa em relação às variáveis sociodemográficas

Variável / Categoria	HPV alto risco*				P
	Negativo		Positivo		
	n	(%)	n	(%)	
Sexo					
Feminino	32	21,9	10	17,9	0,524
Masculino	114	78,1	46	82,1	
Idade					
≤ 60 anos	72	49,4	31	55,4	0,442
>60 anos	74	50,7	25	44,6	
Álcool					
Não	30	20,5	8	14,3	0,308
Sim	116	79,5	48	85,7	
Tabaco					
Não	33	22,6	18	32,1	0,162
Sim	113	77,4	38	67,9	
Tabaco + Álcool					
Nunca bebeu nem fumou	15	10,3	7	12,5	0,898
Bebe e fuma	98	67,1	37	66,1	
Bebe ou fuma	33	22,6	12	21,4	

Há valores ignorados

p<0,05

Teste utilizado: Qui-quadrado

*HPV de alto risco considerando os testes PCR tempo real + Luminex

Ainda com intuito de caracterizar a população positiva para DNA HPV de alto risco, relacionamos as variáveis sociodemográficas e clinicopatológicas somente com tecido tumoral (Tabela 25). Nota-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para as variáveis analisadas.

Tabela 25 - Caracterização da população HPV de alto risco positiva e negativa para tecido tumoral em relação às variáveis sociodemográficas e clinicopatológicas

Variável / Categoria	HPV alto risco (Tumor)**				P
	Negativo		Positivo		
	n	(%)	n	(%)	
Sexo					
Feminino	18	22,0	3	15,8	0,756*
Masculino	64	78,0	16	84,2	
Idade					
≤ 60 anos	44	53,7	9	47,4	0,621
>60 anos	38	46,3	10	52,6	
continua					

continua

Variável / Categoria	HPV alto risco (Tumor)**				P
	Negativo		Positivo		
	n	(%)	n	(%)	
continuação					
Álcool					
Não	8	9,8	2	10,5	1,000*
Sim	74	90,2	17	89,5	
Tabaco					
Não	13	15,9	6	31,6	0,188*
Sim	69	84,1	13	68,4	
Tabaco + Álcool					
Nunca bebeu nem fumou	1	1,2	2	10,5	0,149*
Bebe e fuma	62	75,6	13	68,4	
Bebe ou fuma	19	23,2	4	21,1	
Grau de diferenciação					
Bem	12	15,2	1	5,6	0,546
Moderado	45	57,0	11	61,1	
Pouco	22	27,8	6	33,3	
Topografia					
Terço superior	1	1,2	2	10,5	0,105*
Terço médio	49	59,8	8	42,1	
Terço inferior	7	8,5	1	5,3	
Mais de uma localização	25	30,5	8	42,1	
Estadiamento TNM					
I e II	21	27,3	2	11,1	0,224*
III e IV	56	72,7	16	88,9	
T					
T1/T2	10	13,9	0	0,0	0,198*
T3/T4	62	86,1	17	100,0	
N					
N0	21	36,8	5	38,5	1,000*
N positivo	36	63,2	8	61,5	
M					
M0	63	80,8	13	76,5	0,740*
M1	15	19,2	4	23,5	

p<0,05

Testes utilizados: Qui-quadrado ou *Fisher

**HPV de alto risco (tecido tumoral) considerando os testes PCR tempo real + Luminex

O fluxograma abaixo, mostra o número de amostras analisadas em cada uma das técnicas.

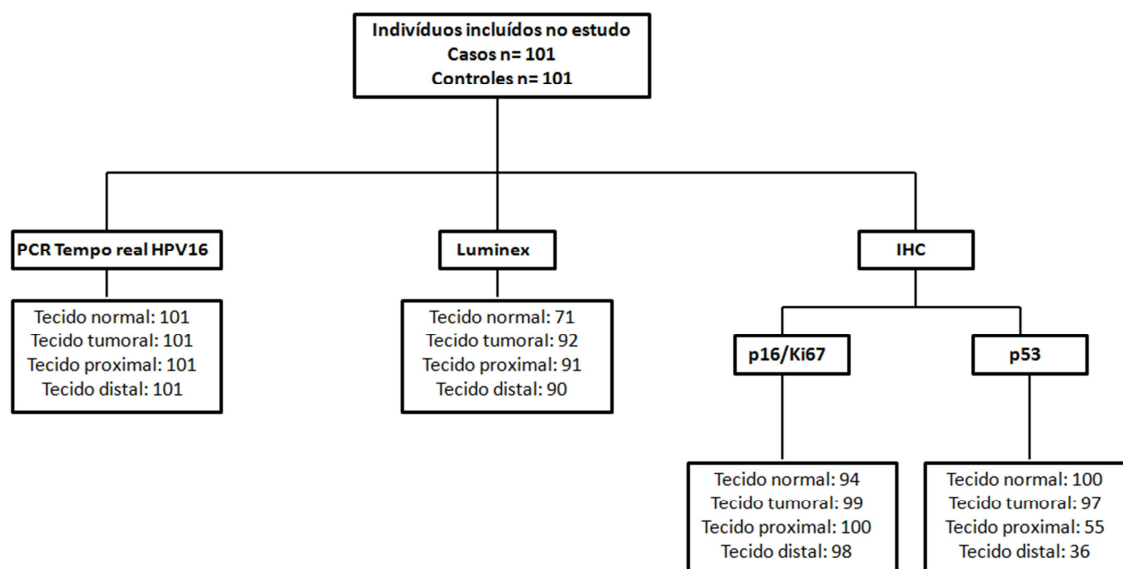


Figura 7 - Descrição do número de amostras analisadas em cada experimento

4.5. Imunohistoquímica

Os marcadores indiretos da infecção por HPV e relacionados com a carcinogênese esofágica, p53, p16 e Ki-67, foram avaliados por IHC.

4.5.1 Análise da expressão de p53

Inicialmente, o perfil de expressão de p53 em tecidos esofágicos dos dois grupos (Figura 8) foi avaliada e apresentou-se com padrão nuclear, comparando com os controles positivo (tecido de carcinoma de cólon com expressão nuclear positiva de p53) e negativo (tecido de carcinoma de mama sem expressão nuclear de p53). A expressão de p53 foi avaliada com o uso de escore previamente estabelecido (Tabela 4) e os resultados estão descritos detalhadamente nas próximas tabelas.

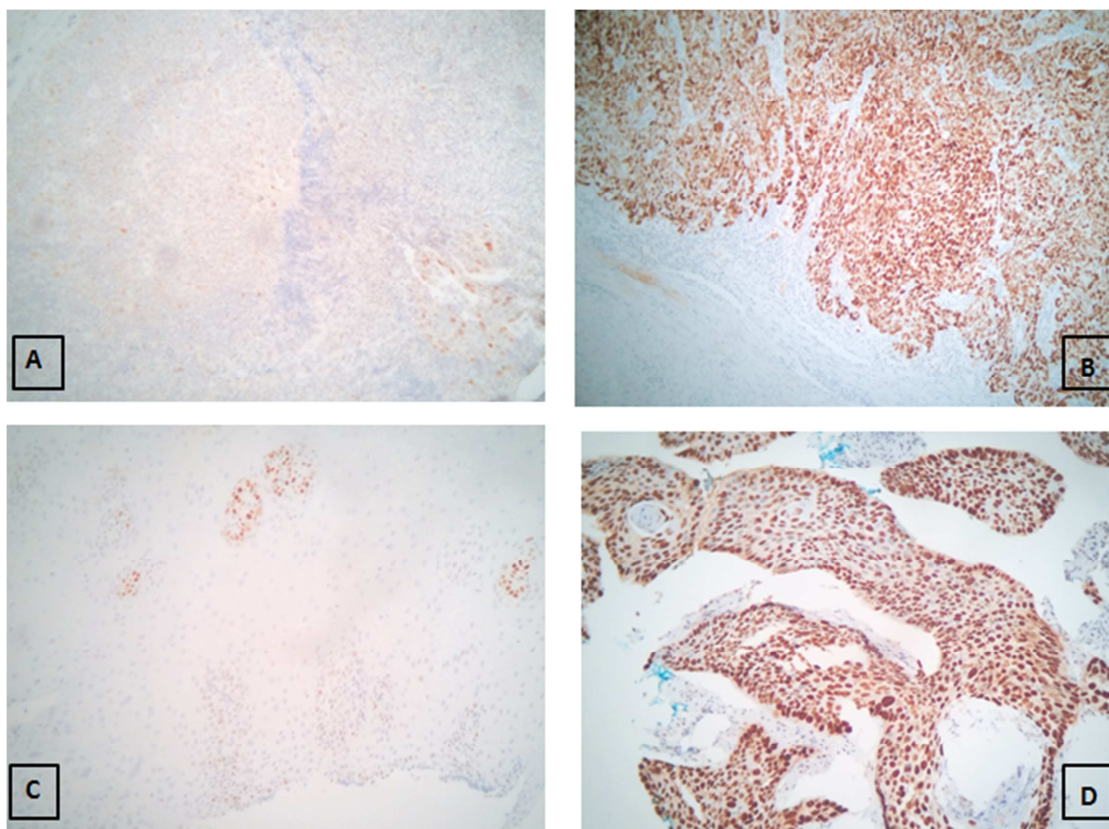


Figura 8 - Imunohistoquímica de p53 em CEC de esôfago. Visualização ao microscópio óptico de marcação IHC de p53 em CEC de esôfago (A) Controle negativo: tecido de carcinoma de mama sem expressão nuclear de p53 (magnificação original = 100 vezes). (B) Controle positivo: tecido de carcinoma de cólon com expressão nuclear positiva de p53 (magnificação original = 100 vezes). (C) Tecido de carcinoma epidermóide moderadamente diferenciado infiltrativo de esôfago sem expressão de p53 (magnificação original = 100 vezes). (D) Tecido de carcinoma epidermóide moderadamente diferenciado infiltrativo de esôfago com forte expressão nuclear de p53 (magnificação original = 100 vezes).

A expressão de p53 foi comparada entre os grupos caso e controle e, como demonstrado na tabela 26, a expressão da proteína no grupo caso foi estatisticamente maior (68,0%) que a observada no grupo controle (1,6%) ($p < 0,001$).

Tabela 26 - Expressão de p53 entre os grupos caso e controle

Variável * / Categoria	Grupo					p
	Caso*		Controle**			
	n	(%)	n	(%)		
p53						
Negativo	31	32,0	61	98,4	<0,001	
Positivo	66	68,0	1	1,6		
Total	97	100,0	62	100,0		

*Para o grupo caso foi considerado apenas o tecido tumoral.

**Para o grupo controle foram considerados os tecidos esofágicos proximal e distal, sendo positivo aquele indivíduo com expressão da proteína em pelo menos uma das regiões anatômicas (proximal ou distal).

$p < 0,05$

Teste utilizado: Qui-quadrado

À partir deste resultado significativo para a expressão de p53 entre os grupos, o perfil de marcação da proteína nos tecidos de cada grupo foi avaliado. Observou-se que 68,0% dos tecidos tumorais expressavam a proteína p53 enquanto somente 21,0% dos normais adjacentes eram positivos para a proteína, representando uma diferença estatisticamente significativa entre esses tecidos ($p < 0,001$) (Tabela 27).

Tabela 27 - Expressão de p53 nos tecidos obtidos dos casos

Variável / Categoria	Grupo				P
	Tumor		Normal adjacente		
	n	(%)	n	(%)	
p53					
Negativo	31	32,0	79	79,0	<0,001
Positivo	66	68,0	21	21,0	
Total	97	100	100	100	

$p < 0,05$

Teste utilizado: McNemar

Em relação às imunorreações para o grupo controle, foi observado que a marcação da proteína foi de 1,8% para o tecido esofágico proximal e ausente para o tecido esofágico distal (Tabela 28).

Tabela 28 - Descrição da expressão de p53 nos tecidos obtidos de controles

Variável	Categoria	n	%
Esôfago proximal	Negativo	54	98,2
	Positivo	1	1,8
Esôfago distal	Negativo	36	100,0
	Positivo	0	0,0

Em seguida, a expressão de p53 nos tecidos normal adjacente e grupo controle (Tabela 29) foi avaliada. Análise demonstrou que a expressão da proteína foi significativamente maior ($p < 0,001$) no tecido normal adjacente (21,0%) comparada com a do controle (1,6%).

Tabela 29 - Expressão de p53 nos tecidos normal adjacente e controle

Variável * / Categoria	Grupo				P
	Normal adjacente		Controle*		
	n	(%)	n	(%)	
p53					
Negativo	79	79,0	61	98,4	<0,001
Positivo	21	21,0	1	1,6	
Total	100	100	62	100	

*Para o grupo controle foram considerados os tecidos esofágicos proximal e distal, sendo positivo aquele indivíduo com expressão da proteína em pelo menos uma das regiões anatômicas (proximal e distal).

p<0,05

Teste utilizado: Qui-quadrado

Após análise da expressão de p53 nas amostras esofágicas, as amostras positivas para a proteína foram caracterizadas, independentemente dos grupos (caso e controle) e tecidos (Tabela 30). De acordo com as variáveis sociais analisadas, observou-se que a população p53 positiva é estatisticamente diferente da população que não expressa a proteína, quanto à ingestão de álcool e álcool + tabaco, pois os indivíduos do grupo com expressão positiva de p53 relataram maior consumo de álcool (91,0%) e álcool + tabaco (73,1%) concomitantemente, que o grupo com expressão negativa da proteína.

De acordo com o status de HPV, tanto para as análises que consideraram os resultados de HPV por testes independentes, como a análise que utilizou a frequência geral de HPV de alto risco (Luminex e Tempo real), não observou relação estatisticamente significativa entre expressão de p53 e o status de HPV na população estudada.

Tabela 30 - Caracterização das amostras em relação à expressão p53

Tabela 30 - Caracterização das amostras em relação à expressão p53						
Variáveis * / Categoria	p53*				p	
	Negativo		Positivo			
	n	(%)	n	(%)		
Sexo						
Feminino	21	22,8	15	22,4	0,948	
Masculino	71	77,2	52	77,6		
Idade						
≤ 60 anos	43	46,7	41	61,2	0,071	
>60 anos	49	53,3	26	38,8		
continua						

Variáveis * / Categoria	p53*				p
	Negativo		Positivo		
	n	(%)	n	(%)	
continuação					
Álcool					
Não	23	25,0	6	9,0	0,010
Sim	69	75,0	61	91,0	
Tabaco					
Não	26	28,3	13	19,4	0,200
Sim	66	71,7	54	80,6	
Tabaco + Álcool					
Nunca bebeu nem fumou	16	17,4	1	1,5	0,005
Bebe e fuma	59	64,1	49	73,1	
Bebe ou fuma	17	18,5	17	25,4	
HPV alto risco (Luminex)					
Negativo	71	81,6	48	80,0	0,807
Positivo	16	18,4	12	20,0	
HPV16 (Tempo real)					
Negativo	81	88,0	64	95,5	0,100
Positivo	11	12,0	3	4,5	
HPV alto risco (Luminex + Tempo real)					
Negativo	70	76,1	52	77,6	0,822
Positivo	22	23,9	15	22,4	

p<0,05

Teste utilizado: Qui-quadrado

*Para o grupo caso foi considerado apenas tecido tumoral e, para o grupo controle foram considerados os tecidos esofágicos proximal e distal, sendo positivo aquele indivíduo com expressão da proteína em pelo menos uma das regiões anatómicas (proximal e distal).

Posteriormente, foi realizada a caracterização das amostras tumorais em relação a expressão de p53, variáveis sociais, clinicopatológicas e presença de HPV (Tabela 31). Como pode ser visto, a expressão de p53 em tecido tumoral foi caracterizada como sendo significativamente predominante (60,6%) em indivíduos com idade igual ou inferior a 60 anos (p=0,044). Já para o grupo de tecido tumoral com expressão negativa da proteína, houve predomínio significativo (61,3%) de pacientes mais velhos (idade >60 anos).

Em relação ao hábitos de consumo de álcool e tabaco, não houve diferença estatisticamente significativa entre os indivíduos com expressão positiva e negativa de p53.

Ainda, os resultados da expressão IHC de p53 foram analisados com o status de HPV de alto risco (analisado por Luminex), HPV-16 (analisado por PCR em tempo real) e HPV de alto risco geral (considerando as detecções por Luminex e PCR em tempo real). Como visualizado, 12 amostras (20,3%) positivas para HPV de alto risco (Luminex) possuem expressão positiva de p53; 2 amostras (3,0%) HPV-16 positivas têm expressão positiva de p53 e; 14 amostras (21,2%) positivas para HPV de alto risco geral (Luminex + PCR tempo real) expressam p53. Além disso, pode-se observar que há um número grande de amostras com expressão positiva de p53 e negativas para HPV. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre o status de HPV e a expressão de p53 para as análises realizadas (Tabela 31).

Tabela 31 - Caracterização das amostras tumorais em relação a expressão de p53 e variáveis sociais, clinicopatológicas e presença de HPV

Variável / Categoria	Tumor				p
	p53 negativo		p53 positivo		
	n	(%)	n	(%)	
Sexo					
Feminino	6	19,4	15	22,7	0,707
Masculino	25	80,6	51	77,3	
Idade					
≤ 60 anos	12	38,7	40	60,6	0,044
>60 anos	19	61,3	26	39,4	
Álcool					
Não	4	12,9	6	9,1	0,722*
Sim	27	87,1	60	90,9	
Tabaco					
Não	7	22,6	12	18,2	0,611
Sim	24	77,4	54	81,8	
Tabaco + Álcool					
Nunca bebeu nem fumou	2	6,5	1	1,5	*0,425
Bebe e fuma	22	71,0	49	74,2	
Bebe ou fuma	7	22,6	16	24,2	
Grau de diferenciação					
Bem	6	19,4	7	11,3	0,567
Moderado	16	51,6	36	58,1	
Pouco	9	29,0	19	30,6	
Topografia					
Terço superior	0	0,0	2	3,0	0,505*
Terço médio	18	58,1	36	54,5	
Terço inferior	4	12,9	4	6,1	
Mais de uma localização	0	29,0	24	36,4	
continua					

continua

Variável / Categoria	Tumor				p
	p53 negativo		p53 positivo		
	n	(%)	n	(%)	
continuação					
Estadiamento TNM					
I e II	4	13,3	18	29,0	0,098
III e IV	26	86,7	44	71,0	
T					
T1/T2	2	6,9	7	12,3	*0,712
T3/T4	27	93,1	50	87,7	
N					
N0	10	43,5	16	35,6	0,525
N positivo	13	56,5	29	64,4	
M					
M0	26	89,7	47	74,6	0,098
M1	3	10,3	16	25,4	
HPV alto risco (Luminex)					
Negativo	20	76,9	47	79,7	0,776
Positivo	6	23,1	12	20,3	
HPV16 (Tempo real)					
Negativo	30	96,8	64	97,0	1,000*
Positivo	1	3,2	2	3,0	
HPV alto risco (Luminex + Tempo real)					
Negativo	25	80,6	52	78,8	0,833
Positivo	6	19,4	14	21,2	

p<0,05

Testes utilizados: Qui-quadrado ou *Fisher

Na sequência, os tecidos normal adjacente e controle foram caracterizados para expressão de p53 em relação às variáveis sociais e ao status de HPV (Tabela 32). Como pode ser observado, das amostras de tecido normal adjacente com expressão positiva de p53, houve predomínio (66,7%) estatisticamente significativo de pacientes mais velhos (idade >60 anos), enquanto para o grupo de tecido normal adjacente com expressão negativa da proteína, houve predomínio (58,2%) de pacientes mais jovens (≤ 60 anos).

Em relação ao grupo controle, não houve diferença significativamente estatística das variáveis sociodemográficas analisadas entre as populações negativa e positiva para expressão de p53 (Tabela 32).

Quando o status de HPV foi analisado, não foi possível constatar diferença estatisticamente significativa em relação à expressão de p53 nos tecidos normal adjacente e controle (Tabela 32).

No entanto, vale ressaltar que para os controles, todas as amostras com expressão positiva de p53 foram HPV positivas, tanto para HPV de alto risco (Luminex), HPV-16 por PCR em tempo real ou HPV de alto risco geral (Luminex e PCR tempo real). Porém, há amostras HPV positivas com expressão negativa de p53 (16,4%, HPV alto risco Luminex; 16,4%, HPV-16 PCR tempo real; 26,2%, HPV alto risco geral Luminex + PCR tempo real).

Tabela 32 - Caracterização da expressão de p53 em tecidos normal adjacente e controle em relação às variáveis sociais e status de HPV

Controle em relação às variáveis sociais e status de HIV											
Variável / Categoria		Normal adjacente					Controle**				
		p53 negativo		p53 positivo		p	p53 negativo		p53 positivo		p
		n	(%)	n	(%)		n	(%)	n	(%)	
Sexo											
Feminino		18	22,8	3	14,3	0,551	15	24,6	0	0,0	1,000
Masculino		61	77,2	18	85,7		46	75,4	1	100,0	
Idade											
≤ 60 anos		46	58,2	7	33,3	0,042*	31	50,8	1	100,0	1,000
>60 anos		33	41,8	14	66,7		30	49,2	0	0,0	
Álcool											
Não		9	11,4	1	4,8	0,648	19	31,1	0	0,0	1,000
Sim		70	88,6	20	95,2		42	68,9	1	100,0	
Tabaco											
Não		16	20,3	4	14,3	0,756	19	31,1	1	100,0	0,323
Sim		63	79,7	18	86,7		42	68,9	0	0,0	
Tabaco + Álcool											
Nunca bebeu nem fumou		2	2,5	1	4,8	0,239	14	23,0	0	0,0	0,177
Bebe e fuma		56	70,9	18	85,7		37	60,7	0	0,0	
Bebe ou fuma		21	26,6	2	9,5		10	16,4	1	100,0	
HPV alto risco (Luminex)											
Negativo		55	78,6	14	77,8	1,000*	51	83,6	1	100,0	1,000*
Positivo		15	21,4	4	22,2		10	16,4	0	0,0	
HPV16 (Tempo real)											
Negativo		77	97,5	20	95,5	0,511*	51	83,6	0	0,0	0,177*
Positivo		2	2,5	1	4,8		10	16,4	1	100,0	
continua											

continua

Variável / Categoria	Normal adjacente					Controle**				
	p53 negativo		p53 positivo		p	p53 negativo		p53 positivo		p
	n	(%)	n	(%)		n	(%)	n	(%)	
continuação										
HPV alto risco (Luminex + Tempo real)										
Negativo	63	79,7	16	76,2	0,766*	45	73,8	0	0,0	0,274*
Positivo	16	20,3	5	23,8		16	26,2	1	100,0	

p<0,05

Testes utilizados: Teste de Fisher ou *Qui-quadrado

**Para o grupo controle foram considerados os tecidos esofágicos proximal e distal, sendo positivo aquele indivíduo com expressão da proteína em pelo menos uma das regiões anatômicas (proximal e distal).

4.5.2 Análise da expressão de p16/Ki-67

Ainda com o intuito de avaliar a expressão de marcadores indiretos da infecção por HPV e relacionados à carcinogênese em amostras esofágicas, foram realizadas imunomarcações para a proteína supressora tumoral p16 e para o marcador de proliferação celular Ki-67 concomitante e isoladamente. O anticorpo p16 é marcado com diaminobenzidina que resulta em uma coloração marrom/acastanhada que pode ser nuclear e/ou citoplasmática e o anticorpo Ki-67 é marcado com fosfatase alcalina que resulta numa coloração rósea/avermelhada nuclear.

De acordo com a figura 9, observa-se a dupla marcação de p16/Ki-67 nas amostras esofágicas, comparando-se com os controles positivo (tecido de adenocarcinoma de colo uterino com expressão positiva da dupla marcação p16/Ki-67) e negativo.

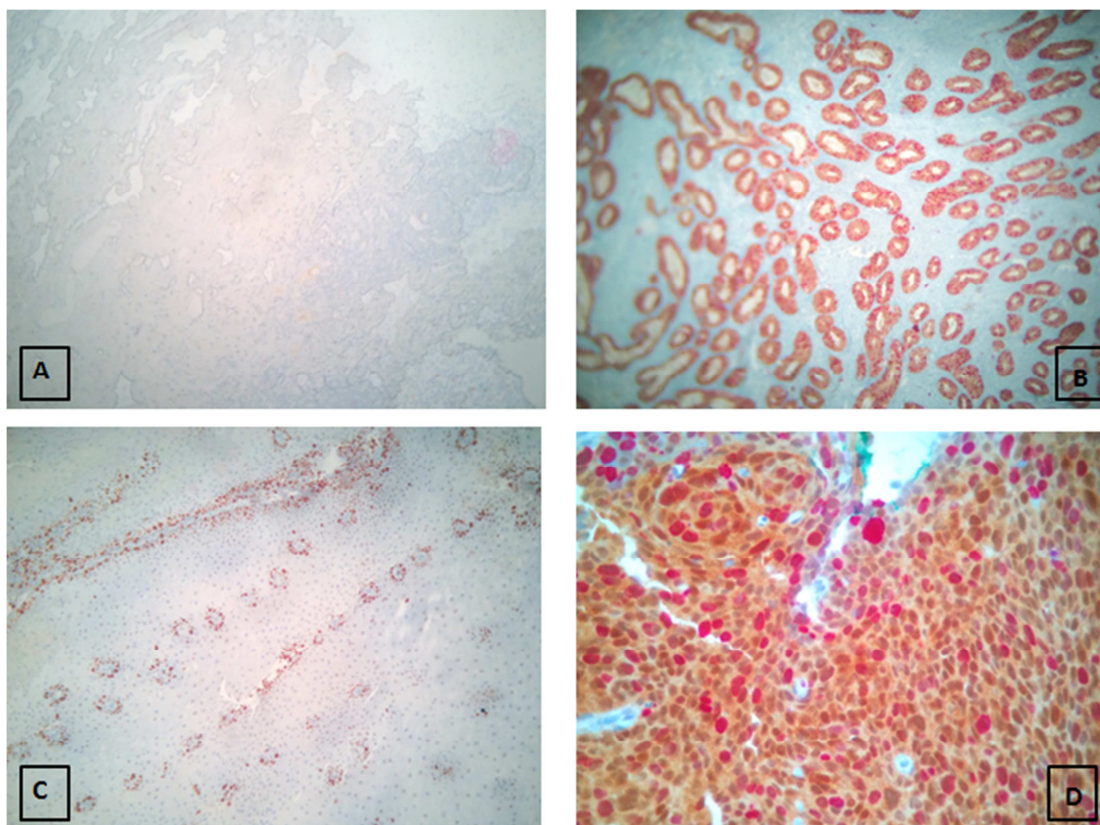


Figura 9 - Imunohistoquímica de p16/Ki-67 em CEC de esôfago e esôfago saudável. Visualização ao microscópio óptico de dupla marcação IHC de p16/Ki-67 em CEC e esôfago saudável **(A)** Controle negativo: Tecido de adenocarcinoma de colo uterino com omissão do anticorpo primário (magnificação original = 100 vezes). **(B)** Controle positivo: Tecido de adenocarcinoma de colo uterino (magnificação original = 400 vezes). **(C)** Tecido de mucosa esofágica proximal sem atipias, com expressão negativa da dupla marcação p16/Ki-67 (magnificação original = 100 vezes). **(D)** Tecido de carcinoma epidermóide moderadamente diferenciado infiltrativo de esôfago com forte expressão de dupla marcação de p16/Ki-67 (magnificação original = 400 vezes).

Após visualizar as imunomarcações nas amostras caso e controle, a caracterização dos grupos quanto a expressão destes marcadores, isolado ou concomitantemente (Tabela 33) foi realizada. Observou-se que a positividade para p16 ocorreu de modo exclusivo nos tumores (12%), sendo estatisticamente diferente do grupo controle ($p < 0,001$). Em relação à imunomarkação isolada do marcador de proliferação celular Ki-67, foram realizadas 2 análises com escores diferentes. Na análise 1, a expressão de Ki-67 foi considerada positiva quando houve marcação em mais de 1% do tecido avaliado e, de acordo com essa análise, observamos que ambos os grupos apresentaram 100% de positividade para a expressão de Ki-67, não apresentando diferença estatisticamente significativa.

A análise 2 considerou como expressão positiva de Ki-67, aqueles tecidos com mais de 25% de marcação e, como resultados, obtivemos que há diferença

estatisticamente significativa entre os grupos ($p < 0,001$), sendo que para o grupo caso há maior frequência de positividade para a expressão de Ki-67 (66,3%) em comparação ao grupo controle (6,9%) (Tabela 36).

Em relação à análise da dupla marcação, p16/Ki-67 encontramos diferença estatisticamente significativa entre os grupos caso e controle ($p = 0,014$), sendo que a expressão de p16/Ki-67 foi maior nos tecidos do grupo caso (41,4%) em relação ao grupo controle (25,5%).

Tabela 33 - Caracterização da expressão de p16 e Ki-67 nos grupos caso e controle

Variável / Categoria	Grupo				p
	Caso*		Controle**		
	n	(%)	n	(%)	
p16					
Negativo	88	88,0	101	100,0	<0,001
Positivo	12	12,0	0	0,0	
Ki-67 (Análise 1)					
Negativo	0	0,0	0	0,0	NA***
Positivo (+, ++, +++)	99	100,0	101	100,0	
Ki-67 (Análise 2)					
Negativo (0, +)	32	31,7	94	93,1	<0,001****
Positivo (++, +++)	67	66,3	7	6,9	
p16/Ki-67					
Negativo	58	58,6	75	75,0	0,014
Positivo	41	41,4	25	25,0	

*Para o grupo caso foi considerado apenas tecido esofágico tumoral

**Para o grupo controle foram considerados os tecidos esofágicos proximal e distal, sendo positiva a amostra com positividade em pelo menos uma das regiões anatômicas

***NA = Não analisado pela falta de informação suficiente.

$p < 0,05$

Teste utilizado: Qui-quadrado ou ****Fisher

Como a expressão de p16, marcador indireto de infecção por HPV, foi detectada somente nas amostras tumorais, a marcação nos tecidos tumoral e normal adjacente foi avaliada separadamente (Tabela 34). Não houve diferença estatisticamente significativa, apesar de haver uma maior frequência de positividade da expressão de p16 em tecido tumoral (13,2%), quando comparado ao tecido normal adjacente (3,9%). Em relação à expressão de Ki-67, a análise 1 mostrou que não há diferença estatística entre os tecidos esofágicos tumoral e normal adjacente. Em relação à análise 2, podemos observar que houve diferença significativamente

estatística entre os tecidos ($p < 0,001$), pois a positividade de expressão de Ki-67 foi maior em tecido tumoral (68,8%), quando comparado ao tecido normal adjacente (12,5%) (Tabela 34).

A expressão da dupla marcação p16/Ki-67 foi estatisticamente diferente ($p = 0,014$) entre os tecidos analisados, sendo que há maior expressão no tecido tumoral (42,4%), comparado ao tecido normal adjacente (25,0%).

Tabela 34 - Expressão de p16 e Ki-67 em tecidos tumoral e normal adjacente

Variável * / Categoria	Grupo				p
	Tumor		Normal adjacente		
	n	(%)	n	(%)	
p16					
Negativo	66	86,8	63	82,9	0,092**
Positivo	10	13,2	3	3,9	
Ki-67 (Análise 1)					
Negativo	0	0,0	1	1,0	0,497*
Positivo (+, ++, +++)	99	100,0	97	99,0	
Ki-67 (Análise 2)					
Negativo (0, +)	30	31,2	83	86,5	<0,001**
Positivo (++, +++)	66	68,8	13	12,5	
p16/Ki-67					
Negativo	53	57,6	69	75,0	0,014**
Positivo	39	42,4	23	25,0	

$p < 0,05$

Teste utilizado: Qui-quadrado, *Fisher ou **McNemar

Ainda com intuito de caracterizar a expressão de p16, a marcação em tecidos esofágicos normal adjacente e controle foi avaliada (Tabela 35). Observou-se que a marcação positiva para a proteína foi significativamente maior no tecido normal adjacente (5,2%) comparado com o tecido controle que não apresentou amostra positiva. Ainda comparando estes dois grupos, a expressão do marcador de proliferação celular Ki-67 foi analisada considerando dois escores diferentes e, diferença significativamente estatística entre os tecidos não foi detectada para ambas as análises (Tabela 35). Porém, quando a intensidade de marcação de Ki-67 entre os tecidos normal adjacente e controles foi avaliada (Tabela 36), observou-se que há maior intensidade de expressão de Ki-67 em tecido normal adjacente (12,0%, ++; 2,0%, +++) quando comparado aos tecidos esofágicos proximal (++, 5,0%) e distal (++, 2,0%).

Entre os tecidos do grupo controle, o perfil de expressão de Ki-67 se manteve semelhante nos tecidos esofágicos proximal e distal.

Em relação à expressão da dupla marcação p16/Ki-67, diferença estatisticamente significativa entre os grupos não foi obtida.

Tabela 35 - Caracterização da expressão de p16 e Ki-67 entre tecidos esofágicos normal adjacente e controle.

Variável / Categoria	Grupo				p
	Normal adjacente		Controle*		
	n	(%)	n	(%)	
p16					
Negativo	73	94,8	101	100,0	0,033
Positivo	4	5,2	0	0,0	
Ki-67 (Análise 1)					
Negativo	1	1,0	0	0,0	0,492
Positivo (+, ++, +++)	97	99,0	101	100,0	
Ki-67 (Análise 2)					
Negativo (0, +)	94	93,1	84	85,7	0,091**
Positivo (++, +++)	7	6,9	14	14,3	
p16/Ki-67					
Negativo	69	73,4	75	75,0	0,800**
Positivo	25	26,6	25	25,0	

p<0,05

Teste utilizado: Fisher ou **Qui-quadrado

*Para o grupo controle foram considerados os tecidos esofágicos proximal e distal, sendo positiva a amostra com positividade em pelo menos uma das regiões anatômicas

Tabela 36 – Perfil de expressão de Ki-67 nos tecidos dos grupos caso e controle

Variável / Categoria	Casos				Controles			
	Tumor		Normal Adjacente		Proximal		Distal	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Negativo	0	0,0	1	1,0	3	3,0	0	0,0
+	32	32,3	83	84,8	93	92,0	99	98,0
++	28	28,3	12	12,2	5	5,0	2	2,0
+++	39	39,4	2	2,0	0	0,0	0	0,0
Total	99	100	98	100	101	100	101	100

Negativo: nenhuma célula com marcação

+: 1-25% de marcação

++: 26-75% de marcação

+++ : mais de 75% de marcação

Após analisar a expressão de p16 e Ki-67 nos tecidos de ambos os grupos, foi realizada a caracterização da população de acordo com a expressão destes marcadores, independente do grupo e localização anatômica, em relação às variáveis social e status de HPV. Como pode ser observado, a expressão de p16 não correlacionou com as variáveis analisadas (Tabela 37).

De acordo com o status de HPV, tanto para as análises que consideraram os resultados de HPV por testes independentes, como a análise que utilizou a frequência geral de HPV de alto risco (Luminex e Tempo real), não houve relação estatisticamente significativa entre expressão de p16 e o status de HPV na população (Tabela 37).

Tabela 37 - Caracterização da população positiva para p16 em relação as variáveis sociais e status de HPV

Variável / Categoria	p16**				P
	Negativo		Positivo		
	n	(%)	n	(%)	
Sexo					
Feminino	37	19,6	5	41,7	0,134
Masculino	152	80,4	7	58,3	
Idade					
≤ 60 anos	96	50,8	6	50,0	0,957*
>60 anos	93	49,2	6	50,0	
Álcool					
Não	37	19,6	1	8,3	0,470
Sim	152	80,4	11	91,7	
Tabaco					
Não	50	26,5	1	8,3	0,302
Sim	139	73,5	11	91,7	
Tabaco + Álcool					
Nunca bebeu nem fumou	22	11,6	0	0,0	0,532
Bebe e fuma	124	65,6	10	83,3	
Bebe ou fuma	43	22,8	2	16,7	
HPV alto risco (Luminex)					
Negativo	136	77,7	10	83,3	1,000
Positivo	39	22,3	2	16,7	
HPV16 (Tempo real)					
Negativo	167	88,4	10	83,3	0,640
Positivo	22	11,6	2	16,7	
continua					

continua

Variável / Categoria	p16**				P
	Negativo		Positivo		
	n	(%)	n	(%)	
continuação					
HPV alto risco (Luminex + Tempo real)					
Negativo	136	72,0	9	75,0	1,000
Positivo	53	28,0	2	25,0	

p<0,05

Teste utilizado: Fisher ou *Qui-quadrado

**Para o grupo caso foi considerado apenas tecido tumoral e, para o grupo controle foram considerados os tecidos esofágicos proximal e distal, sendo positivo aquele indivíduo com expressão da proteína em pelo menos uma das regiões anatômicas (proximal e distal).

Posteriormente, foi feita a caracterização das amostras tumorais em relação a expressão de p16 e variáveis sociais, clinicopatológicas e presença de HPV (Tabela 38). Como pode-se notar, a expressão de p16 em tumores não foi significativamente relacionada com as variáveis sociais e clinicopatológicas.

De acordo com o status de HPV, diferença estatisticamente significativa (p=0,037) para a variável que caracteriza o status de HPV-16 detectado por PCR em tempo real foi encontrada; há maior positividade de HPV-16 no grupo com expressão positiva de p16 (16,7%), comparado ao grupo com expressão negativa da proteína (1,1%). Para as variáveis que consideraram o resultado de HPV de alto risco por Luminex e Luminex + PCR em tempo real, observou-se que não há relação estatisticamente significativa entre expressão de p16 e o status de HPV na população estudada (Tabela 38).

Tabela 38 - Caracterização da expressão de p16 em tecido tumoral em relação às variáveis sociais, clinicopatológicas e status de HPV

Variável / Categoria	Tumor				p
	p16 negativo		p16 positivo		
	n	(%)	n	(%)	
Sexo					
Feminino	12	18,2	5	41,7	0,122
Masculino	72	82,8	7	58,3	
Idade					
≤ 60 anos	46	52,3	6	50,0	0,882*
>60 anos	42	47,7	6	50,0	
Álcool					
Não	9	10,2	1	8,3	1,000
Sim	79	89,8	11	91,7	
continua					

Variável / Categoria	Tumor				
	p16 negativo		p16 positivo		P
	n	(%)	n	(%)	
continuação					
Tabaco					
Não	18	20,5	1	8,3	0,454
Sim	70	79,5	11	91,7	
Tabaco + Álcool					
Nunca bebeu nem fumou	3	3,4	0	0,0	0,814
Bebe e fuma	64	72,7	10	83,3	
Bebe ou fuma	21	23,9	2	16,7	
Grau de diferenciação					
Bem	12	14,3	1	8,3	1,000
Moderado	48	57,1	7	58,3	
Pouco	24	28,6	4	33,3	
Topografia					
Terço superior	3	3,4	0	0,0	0,149
Terço médio	46	52,3	10	83,3	
Terço inferior	7	8,0	1	8,3	
Mais de uma localização	32	36,4	1	8,3	
Estadiamento TNM					
I e II	20	24,1	3	27,3	1,000*
III e IV	63	75,9	8	72,7	
T					
T1/T2	8	10,3	2	20,0	0,317
T3/T4	70	89,7	8	80,0	
N					
N0	23	37,7	3	37,5	1,000
N positivo	38	62,3	5	62,5	
M					
M0	66	79,5	9	81,8	1,000
M1	17	20,5	2	18,2	
HPV alto risco (Luminex)					
Negativo	59	77,6	10	83,3	1,000
Positivo	12	22,4	2	16,7	
HPV16 (Tempo real)					
Negativo	87	98,9	10	83,3	0,037
Positivo	1	1,1	2	16,7	
HPV alto risco (Luminex + Tempo real)					
Negativo	70	79,5	9	75,0	0,712
Positivo	18	20,5	3	25,0	

Há valores ignorados

p<0,05

Testes utilizados: Fisher ou *Qui-quadrado

Quando a caracterização da expressão de p16 nas amostras de tecidos normal adjacente e controles foi feita em relação às variáveis sociais e status de HPV (Tabela 39), não foi encontrada qualquer diferença estatisticamente significativa, sendo que, para o grupo controle, a não correlação se deu por falta de resultados para análise estatística.

Tabela 39 - Caracterização da expressão de p16 em tecidos normal adjacente e controles em relação às variáveis sociais e status de HPV

Variável / Categoria	Normal adjacente					Controle**				
	p16 negativo		p16 positivo		p	p16 negativo		p16 positivo		p
	n	(%)	n	(%)		n	(%)	n	(%)	
Sexo										
Feminino	17	23,3	1	25,0	1,000	21	20,8	0	0,0	NA*
Masculino	56	76,7	3	75,0		80	79,2	0	0,0	
Idade										
≤ 60 anos	42	57,5	1	25,0	0,316	50	49,5	0	0,0	NA*
>60 anos	31	42,5	3	75,0		51	50,5	0	0,0	
Álcool										
Não	9	12,3	0	0,0	1,000	28	27,7	0	0,0	NA*
Sim	64	87,7	4	100,0		73	72,3	0	0,0	
Tabaco										
Não	11	15,1	1	25,0	0,500	32	31,7	0	0,0	NA*
Sim	62	84,9	3	75,0		69	68,3	0	0,0	
Tabaco + Álcool										
Nunca bebeu nem fumou	2	2,7	0	0,0	1,000	19	18,8	0	0,0	NA*
Bebe e fuma	55	75,3	3	75,0		60	59,4	0	0,0	
Bebe ou fuma	16	21,9	1	25,0		22	21,8	0	0,0	
HPV alto risco (Luminex)										
Negativo	51	79,7	2	66,7	0,511	77	77,8	0	0,0	NA*
Positivo	13	20,3	1	33,3		22	22,2	0	0,0	
HPV16 (Tempo real)										
Negativo	70	95,9	4	100,0	1,000	80	79,2	0	0,0	NA*
Positivo	3	4,1	0	0,0		21	20,8	0	0,0	
HPV alto risco (Luminex + Tempo real)										
Negativo	58	79,5	3	75,0	1,000	66	65,3	0	0,0	NA*
Positivo	15	20,5	1	25,0		35	34,7	0	0,0	

p<0,05

Teste utilizado: Teste de Fisher

*NA = Não analisado pela falta de informação suficiente.

**Para o grupo controle foram considerados os tecidos esofágicos proximal e distal, sendo positiva a amostra com positividade em pelo menos uma das regiões anatômicas

Abaixo mostramos o número de amostras que apresentaram concordância e discordância em relação à expressão de p16 e a presença de HPV de alto risco. Como pode ser visto, apenas 3 amostras (1,5%) apresentam dupla positividade para a expressão de p16 e presença de HPV de alto risco. Além disso, um grande número de amostras (26,4%) HPV positivas, não expressam p16 e, o contrário também pode ser observado, ou seja, 4,5% das amostras com expressão positiva de p16, não possuem DNA HPV de alto risco (Tabela 40).

Tabela 40 – Concordância entre a expressão de p16 e positividade para DNA HPV de alto risco em amostras esofágicas

Concordância	Amostras	
	n	(%)
p16- HPV -	136	67,7
p16+ HPV +	3	1,5
p16+ HPV -	9	4,5
p16- HPV +	53	26,4

Buscando esclarecer se a proteína p16 possui papel significativo em relação ao status de HPV de alto risco em amostras de tecido esofágico, as características de indivíduos p16+/HPV+ foram comparadas com o restante da população, em relação às características sociodemográficas e, como descrito, não houve diferença estatisticamente significativa para as comparações realizadas (Tabela 41).

Tabela 41 – Caracterização dos indivíduos incluídos no estudo de acordo com a função combinada do status de p16 e HPV

Variável / Categoria	p16+ HPV+		p16- HPV-		p ^a	p16+ HPV-		p ^b	p16- HPV+		p ^c
	n	(%)	n	(%)		n	(%)		n	(%)	
Sexo											
Feminino	0	0,0	27	19,9	1,000	5	55,6	0,205	10	18,9	1,000
Masculino	3	100,0	109	80,1		4	44,4		43	81,1	
Idade											
≤ 60 anos	1	33,3	66	48,5	1,000	5	55,6	1,000	30	56,6	0,581
>60 anos	2	66,7	70	51,5		4	44,4		23	43,4	
Álcool											
Não	0	0,0	29	21,3	1,000	1	11,1	1,000	8	15,1	1,000
Sim	3	100,0	107	78,7		8	88,9		45	84,9	
Tabaco											
Não	0	0,0	32	23,5	1,000	1	11,1	1,000	18	34,0	0,544
Sim	3	100,0	104	76,5		8	88,9		35	66,0	
Tabaco + Álcool											
Nunca bebeu nem fumou	0	0,0	15	11,0	0,697	0	0,0	1,000	7	13,2	0,712
Bebe e fuma	3	100,0	90	66,2		7	77,8		34	64,2	
Bebe ou fuma	0	0,0	31	22,8		2	22,2		12	22,6	

^a Comparação p16+ HPV+ vs. p16- HPV-^b Comparação p16+ HPV+ vs. p16+ HPV-^c Comparação p16+ HPV+ vs. p16- HPV+

A seguir, foi feita a caracterização da população segundo a expressão da dupla marcação p16/Ki-67, independente do grupo e localização anatômica, em relação às variáveis social e status de HPV. Como pode ser observado, a expressão da dupla marcação p16/Ki-67 não correlacionou com as variáveis analisadas (Tabela 42).

De acordo com o status de HPV, tanto para as análises que consideraram os resultados de HPV por testes independentes, como a análise que utilizou a frequência geral de HPV de alto risco (Luminex e Tempo real), não houve relação estatisticamente significativa entre expressão de p16/Ki-67 e o status de HPV nesta população (Tabela 42).

Tabela 42 - Caracterização da população positiva para dupla marcação p16/Ki-67 em relação as variáveis sociais e status de HPV

Variável / Categoria	p16/Ki-67*				p
	Negativo		Positivo		
	n	(%)	n	(%)	
Sexo					
Feminino	28	21,1	14	21,2	0,979
Masculino	105	78,9	52	78,8	
Idade					
≤ 60 anos	69	51,9	32	48,5	0,652
>60 anos	64	48,1	34	51,5	
Álcool					
Não	25	18,8	12	18,2	0,916
Sim	108	81,2	54	81,8	
Tabaco					
Não	36	27,1	15	22,7	0,509
Sim	97	72,9	51	77,3	
Tabaco + Álcool					
Nunca bebeu nem fumou	18	13,5	4	6,1	0,119
Bebe e fuma	90	67,7	43	65,2	
Bebe ou fuma	25	18,8	19	28,8	
HPV alto risco (Luminex)					
Negativo	100	78,1	46	78,0	0,981
Positivo	28	21,9	13	22,0	
HPV16 (Tempo real)					
Negativo	120	90,2	55	83,3	0,160
Positivo	13	9,8	11	16,7	
HPV alto risco (Luminex + Tempo real)					
Negativo	97	72,9	46	69,7	0,633
Positivo	36	27,1	20	30,3	

p<0,05

Teste utilizado: Qui-quadrado

*Para o grupo caso foi considerado apenas tecido tumoral e, para o grupo controle foram considerados os tecidos esofágicos proximal e distal, sendo positivo aquele indivíduo com expressão da proteína em pelo menos uma das regiões anatômicas (proximal e distal).

Posteriormente, a caracterização das amostras tumorais em relação a expressão de p16/Ki-67, variáveis sociais, clinicopatológicas e presença de HPV foi realizada (Tabela 43). Nota-se que a expressão da dupla marcação em tumores não foi significativamente relacionada com as variáveis analisadas.

De acordo com o status de HPV, não foi possível relacionar a expressão de p16/Ki-67 em tecido tumoral com o status de HPV.

Tabela 43 - Caracterização da expressão da dupla marcação p16/Ki-67 em tecido tumoral em relação às variáveis sociais, clinicopatológicas e status de HPV

Variável / Categoria	Tumor				p
	p16/Ki-67 negativo		p16/Ki-67 positivo		
	N	(%)	n	(%)	
Sexo					
Feminino	12	20,7	9	22,0	0,880
Masculino	46	79,3	32	78,0	
Idade					
≤ 60 anos	31	53,4	21	51,2	0,827
>60 anos	27	46,6	20	48,8	
Álcool					
Não	4	6,9	6	14,6	0,311*
Sim	54	93,1	35	85,4	
Tabaco					
Não	13	22,4	6	14,6	0,333
Sim	45	77,6	35	85,4	
Tabaco + Álcool					
Nunca bebeu nem fumou	3	5,2	0	0,0	0,241*
Bebe e fuma	44	75,9	29	70,7	
Bebe ou fuma	11	19,0	12	29,3	
Grau de diferenciação					
Bem	10	18,2	3	7,5	0,175
Moderado	32	58,2	22	55,0	
Pouco	13	23,6	15	37,5	
continua					

continua

Variável / Categoria	Tumor				p
	p16/Ki-67 negativo		p16/Ki-67 positivo		
	n	(%)	n	(%)	
continuação					
Topografia					
Terço superior	3	5,2	0	0,0	0,173*
Terço médio	28	48,3	28	68,3	
Terço inferior	5	8,6	3	7,3	
Mais de uma localização	22	37,9	10	24,4	
Estadiamento TNM					
I e II	14	25,9	9	23,1	0,753
III e IV	40	74,1	30	76,9	
T					
T1/T2	5	9,8	5	13,9	0,735*
T3/T4	46	90,2	31	86,1	
N					
N0	16	40,0	9	32,1	0,508
N positivo	24	60,0	19	67,9	
M					
M0	42	77,8	32	82,1	0,614
M1	12	22,2	7	17,9	
HPV alto risco (Luminex)					
Negativo	42	77,8	27	79,4	0,856
Positivo	12	22,2	7	20,6	
HPV16 (Tempo real)					
Negativo	57	98,3	39	95,1	0,568*
Positivo	1	1,7	2	4,9	
HPV alto risco (Luminex + Tempo real)					
Negativo	45	77,6	33	80,5	0,728
Positivo	13	22,4	8	19,5	

p<0,05

Testes utilizados: Qui-quadrado ou *Fisher

Quando a caracterização da expressão da dupla marcação p16/Ki-67 nas amostras de tecidos normal adjacente foi feita em relação às variáveis sociais e status de HPV (Tabela 44), não foi encontrada qualquer diferença estatisticamente significativa.

Em relação à expressão de p16/Ki-67 em tecidos de controles, não há diferença estatisticamente significativa com nenhuma das variáveis sociais analisadas.

De acordo com o status de HPV, diferença estatisticamente significativa ($p=0,033$) foi encontrada para a variável que caracteriza o status de HPV-16 detectado por PCR em tempo real; há maior positividade de HPV-16 no grupo com expressão positiva de p16/Ki-67 (36,0%), comparado ao grupo com expressão negativa da dupla marcação (16,0%). Para as variáveis que consideraram o resultado de HPV de alto risco por Luminex e Luminex + PCR em tempo real, não há relação estatisticamente significativa entre expressão de p16/Ki-67 e o status de HPV na população estudada (Tabela 44).

Tabela 44 - Caracterização da expressão da dupla marcação p16/Ki-67 em tecidos normal adjacente controles em relação às variáveis sociais e status de HPV

Variável / Categoria			Normal adjacente				Controle*					
			p16/Ki-67 negativo		p16/Ki-67 positivo		p	p16/Ki-67 negativo		p16/Ki-67 positivo		p
			n	(%)	n	(%)		n	(%)	n	(%)	
Sexo												
Feminino			15	21,7	6	24,0	0,816	16	21,3	5	20,0	0,887
Masculino			54	78,3	19	76,0		59	78,7	20	80,0	
Idade												
≤ 60 anos			35	50,7	15	60,0	0,426	38	50,7	11	44,0	0,564
>60 anos			34	49,3	10	40,0		37	49,6	14	56,0	
Álcool												
Não			8	11,6	2	8,0	1,000*	21	28,0	6	24,0	0,696
Sim			61	88,4	23	91,0		54	72,0	19	76,0	
Tabaco												
Não			11	15,9	6	24,0	0,377*	23	30,7	9	36,0	0,621
Sim			58	84,1	19	76,0		52	69,3	16	64,0	
Tabaco + Álcool												
Nunca bebeu nem fumou			3	4,3	0	0,0	0,389*	15	20,0	4	16,0	0,599
Bebe e fuma			53	76,8	17	68,0		46	61,3	14	56,0	
Bebe ou fuma			13	18,8	8	32,0		14	18,7	7	28,0	
HPV alto risco (Luminex)												
Negativo			49	80,3	17	81,0	1,000*	58	78,4	19	76,0	0,805
Positivo			12	19,7	4	19,0		16	21,6	6	24,0	
HPV16 (Tempo real)												
Negativo			68	98,6	24	96,0	0,463*	63	84,0	16	64,0	0,033
Positivo			1	1,4	1	4,0		12	16,0	9	36,0	
continua												

continua

Variável / Categoria	Normal adjacente					Controle*				
	p16/Ki-67 negativo		p16/Ki-67 positivo		p	p16/Ki-67 negativo		p16/Ki-67 positivo		p
	n	(%)	n	(%)		n	(%)	n	(%)	
continuação										
HPV alto risco (Luminex + Tempo real)										
Negativo	56	81,2	20	80,0	1,000*	52	69,3	13	52,0	0,116
Positivo	13	18,8	5	20,0		23	30,7	12	48,0	

p<0,05

Teste utilizado: Qui-quadrado ou *Fisher

*Para o grupo controle foram considerados os tecidos esofágicos proximal e distal, sendo positiva a amostra com positividade em pelo menos uma das regiões anatômicas

Buscamos esclarecer se a expressão da dupla marcação p16/Ki-67 possui papel significativo em relação ao status de HPV de alto risco em amostras de tecido esofágico. Para isso comparamos as características de indivíduos p16/Ki-67+ / HPV+ com o restante da população, em relação às características sociodemográficas e, como observado, não houve diferença estatisticamente significativa para as comparações realizadas (Tabela 45).

Tabela 45 – Caracterização dos indivíduos incluídos no estudo de acordo com a função combinada do status de p16/Ki-67 e HPV

Variável / Categoria	p16/Ki-67+ HPV+		p16/Ki-67- HPV-		p ^a	p16/Ki-67+ HPV-		p ^b	p16/Ki-67- HPV+		p ^c
	n	(%)	n	(%)		n	(%)		n	(%)	
Sexo											
Feminino	3	15,5	21	21,6	0,761*	11	23,9	0,524*	7	19,4	1,000*
Masculino	17	85,0	76	78,4		35	76,1		29	80,6	
Idade											
≤ 60 anos	8	40,0	46	47,4	0,544	24	52,2	0,363	23	63,9	0,085
>60 anos	12	60,0	51	52,6		22	47,8		13	36,1	
Álcool											
Não	1	5,0	18	18,6	0,190*	11	23,9	0,088*	7	19,4	0,236*
Sim	19	95,0	79	81,4		35	76,1		29	80,6	
Tabaco											
Não	7	35,0	25	25,8	0,399	8	17,4	0,199*	11	30,6	0,733
Sim	13	65,0	72	74,2		38	82,6		25	69,4	
Tabaco + Álcool											
Nunca bebeu nem fumou	1	5,0	12	12,4	0,473*	3	6,5	1,000*	6	16,7	0,314*
Bebe e fuma	13	65,0	66	68,0		30	65,2		24	66,7	
Bebe ou fuma	6	30,0	19	19,6		13	28,4		6	16,7	

^a Comparação p16+ HPV+ vs. p16- HPV-^b Comparação p16+ HPV+ vs. p16+ HPV-^c Comparação p16+ HPV+ vs. p16- HPV+

Ainda em relação ao status de HPV e os marcadores p16, Ki-67 e p53, foi proposto descrever a frequência de amostras com simultânea expressão das proteínas e positividade para HPV, considerando tanto a frequência geral (unindo as metodologias) como separadamente, para cada metodologia realizada e cada tipo de HPV detectado.

Observou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre a expressão das proteínas e o status de HPV. De maneira geral (considerando frequência de HPV pelas metodologias Luminex e PCR tempo real), 15 amostras (22,4%) foram p53+/HPV+, 3 amostras (25%) p16+/HPV+ e, 20 amostras (30,3%) p16/Ki-67+ / HPV+.

Considerando a positividade de HPV por metodologias independentes, a frequência de amostras p53+/HPV+ (20% por Luminex e, 4,5% para PCR tempo real) manteve-se baixa assim como para p16+/HPV+ (16,7% por Luminex e, 16,7% PCR tempo real) e para p16/Ki-67+ / HPV+ (22,0% por Luminex e, 16,7% PCR tempo real).

Ao discriminar a frequência de amostras p53+/HPV+ para cada tipo de HPV detectado, observou-se predomínio de amostras p53+/HPV56+ (16,7%) em relação aos demais tipos de HPV detectados. Em relação ao p16, predomínio de amostras p16+/HPV65+ e HPV16+ (ambos com frequência de 9,1%) foi observado e, em relação ao p16/Ki-67, predomínio de amostras p16/Ki-67+ / HPV16 (detectado por PCR tempo real) (16,7%) e p16/Ki-67+ / HPV56+ (10,5%) foi constatado.

Além disso, observou-se que, de maneira geral, 23,9% de amostras são HPV+/p53-, 28% de amostras são HPV+/p16- e, 27,1% de amostras são HPV+/p16/Ki-67-.

Estes resultados estão detalhadamente descritos na tabela 46.

Tabela 46 – Descrição da concordância entre a expressão dos marcadores p53, p16, p16/Ki-67 e status de HPV

HPV		p53			p16			p16/Ki-67		
		Negativo	Positivo	p	Negativo	Positivo	p	Negativo	Positivo	p
		n (%)	n (%)		n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	
HPV Geral (Luminex + Tempo real)	Sim	22 (23,9)	15 (22,4)	0,822*	53 (28,0)	3 (25,0)	1,000	36 (27,1)	20 (30,3)	0,633
	Não	70 (76,1)	52 (77,6)		136 (72,0)	9 (75,0)		97 (72,9)	46 (69,7)	
HPV Alto risco (Luminex)	Sim	16 (81,6)	12 (20,0)	0,807*	39 (22,3)	2 (16,7)	1,000	28 (21,9)	13 (22,0)	0,981
	Não	71 (81,6)	48 (80,0)		136 (77,7)	10 (83,3)		100 (78,1)	46 (78,0)	
HPV 16 (Tempo real)	Sim	11 (12,00)	3 (4,5)	0,100*	22 (11,6)	2 (16,7)	0,640	13 (9,8)	11 (16,7)	0,160
	Não	81 (88,0)	64 (95,5)		167 (88,4)	10 (83,3)		120 (90,9)	55 (83,3)	
HPV 51 (Luminex)	Sim	0 (0,0)	1 (1,7)	1,000	1 (1,3)	0 (0,0)	1,000	1 (1,9)	0 (0,0)	1,000*
	Não	26 (100,0)	58 (98,3)		75 (98,7)	12 (100,0)		53 (98,1)	34 (100,0)	
HPV 31 (Luminex)	Sim	5 (6,1)	0 (0,0)	0,320	11 (7,5)	0 (0,0)	1,000	7 (6,5)	4 (9,1)	0,731*
	Não	77 (93,9)	32 (100,0)		136 (92,5)	5 (100,0)		101 (93,5)	40 (90,9)	
HPV 66.1 (Luminex)	Sim	0 (0,0)	1 (3,2)	1,000	1 (2,1)	0 (0,0)	1,000	1 (2,9)	0 (0,0)	1,000*
	Não	21 (100,0)	30 (96,8)		47 (97,9)	5 (100,0)		33 (97,1)	19 (100,0)	
HPV 53 (Luminex)	Sim	0 (0,0)	1 (3,1)	0,320	2 (1,6)	0 (0,0)	1,000	1 (1,1)	1 (2,6)	0,512*
	Não	68 (100)	31 (96,9)		123 (98,4)	5 (100,0)		90 (98,9)	38 (97,4)	
HPV 56 (Luminex)	Sim	7 (8,4)	9 (16,7)	0,142*	21 (12,7)	1 (9,1)	1,000	16 (13,4)	6 (10,5)	0,584
	Não	76 (91,6)	45 (83,3)		144 (87,3)	10 (90,9)		103 (86,6)	51 (89,5)	

HPV		p53			p16			p16/Ki-67		
		Negativo	Positivo	p	Negativo	Positivo	p	Negativo	Positivo	p
		n (%)	n (%)		n (%)	n (%)		n (%)	n (%)	
continuação										
HPV 18 (Luminex)	Sim	1 (1,4)	0 (0,0)	1,000	2 (1,4)	0 (0,0)	1,000	2 (1,9)	0 (0,0)	1,000*
	Não	72 (98,6)	54 (100,0)		146 (98,6)	11 (100,0)		105 (98,1)	52 (100,0)	
HPV 16 (Luminex)	Sim	4 (4,8)	0 (0,0)	0,153	7 (4,2)	1 (9,1)	0,410	5 (4,2)	3 (5,3)	0,715*
	Não	79 (95,2)	54 (100,0)		158 (95,8)	10 (90,9)		114 (95,8)	54 (94,7)	

5 DISCUSSÃO

A participação do HPV na carcinogênese esofágica ainda é assunto controverso descrito com importantes divergências de resultados que, em grande parte, pode ser atribuído às diferentes metodologias utilizadas para detecção do vírus e as muitas formas de coleta e preservação das amostras⁶¹. Nesse sentido, esse estudo, até onde sabemos, é o primeiro a ter um desenho prospectivo e controlado no Brasil, o que confere importante confiabilidade aos resultados. O objetivo deste projeto foi obter dados brasileiros que ajudassem a esclarecer a frequência de HPV no CEC de esôfago e as vias moleculares envolvidas neste processo; além de buscar evidências que pudessem auxiliar na avaliação prognóstica de pacientes com essa neoplasia maligna.

Para isso, inicialmente, buscou-se determinar a frequência de HPV-16 na população atendida no HCB e AME clínico de Barretos, utilizando-se a metodologia de PCR em tempo real com primer específico para HPV-16, que é o tipo de HPV mais frequentemente detectado nas diferentes regiões do mundo e em diferentes sítios anatômicos^{37, 92}.

Surpreendentemente, os resultados obtidos foram contraditórios àqueles encontrados pelos outros estudos brasileiros^{41, 64-66}. A população com CE apresentou uma frequência de 3,0% de HPV-16, enquanto a população saudável obteve uma frequência significativamente maior, 20,8% de HPV-16.

Analisando os estudos anteriormente realizados com a população brasileira, o primeiro deles que objetivou identificar a frequência de HPV na população do sul do país, encontrou uma frequência de 2,5% de HPV de baixo risco nas amostras de indivíduos com CE e, 10,0% de HPV de alto risco nas amostras do grupo controle (sem CE) através de ensaios por captura híbrida⁶⁴. Ainda na mesma região do país, porém utilizando metodologia diferente (Nested PCR), a frequência de HPV-16 e 18 nos tecidos de CE foi de 15,75% enquanto em tecido normal, DNA HPV não foi detectado⁶⁵. Mais recentemente, com objetivo de detectar a frequência de HPV na população das regiões sul e sudeste do país através de PCR seguido por sequenciamento e hibridização *in situ*, frequência de 13,0% de HPV foi encontrada, sendo que o principal tipo detectado foi o HPV-16⁴¹. Finalmente, em 2013, o último estudo brasileiro

publicado, utilizando metodologia de Nested PCR, não detectou DNA HPV em nenhuma das amostras de indivíduos com e sem CE da região sul do país⁶⁶.

Como descrito, há grande divergência de resultados entre os estudos brasileiros. No entanto, é notável que, de maneira geral, maior frequência de HPV foi encontrada no grupo de indivíduos com CE e o principal tipo detectado foi o HPV-16. Vale ressaltar que o atual estudo encontrou frequência significativamente maior de HPV-16 na população sem CE, diferentemente do que havia sido descrito pelos demais estudos brasileiros.

Para esclarecer a divergência de resultados em relação aos estudos anteriormente publicados sobre a frequência HPV na população estudada mais realista em relação aos dados de diversas publicações, optou-se pela técnica Luminex, que permite a detecção de 18 tipos de HPV de alto risco, baseada em um PCR multilex.

Os ensaios de Luminex foram realizados a partir das mesmas amostras analisadas anteriormente por PCR em tempo real e, os resultados foram muito estimulantes, isto que lança novas perspectivas no potencial papel do HPV no epitélio esofágico. Para ambas situações, casos e controles, a frequência de HPV foi similar e, para os padrões brasileiros, alta. Obtivemos que a frequência de HPV de alto risco no grupo de indivíduos com CE foi de 21,3% e para os indivíduos sem câncer, a frequência foi de 22,2%, diferentemente não apenas do resultado obtido anteriormente por PCR em tempo real para HPV-16, bem como dos demais trabalhos publicados com séries nacionais. Isso ratifica de forma inequívoca que as frequências de HPV em tecido esofágico neoplásico e normal são tão variáveis não apenas por eventuais diferenças regionais, mas também, e muito importantemente, por diferenças metodológicas.

Em relação aos tipos de HPV de alto risco detectados por Luminex, observou-se que a ordem decrescente de frequência de HPV foi HPV-56 (12,5%), HPV-31 (7,2%), HPV-16 (4,5%), HPV-66.1 (1,9%), HPV-53 (1,5%), HPV-18 (1,3%) e HPV-51 (1,1%), justificando a baixa frequência de HPV-16 detectada inicialmente por PCR em tempo real nas amostras de indivíduos com CE. Esses resultados são inéditos em relação à tipagem de HPV de alto risco na população brasileira e a baixa frequência do HPV-16 identificado pelo Luminex justifica a baixa ou ausente frequência de HPV relatada anteriormente^{64, 66} como consequência da análise de HPV 16, 18 ou 31. Por outro lado, esses tipos virais detectados no presente estudo também são pouco reconhecidos pela

literatura mundial que tem se dedicado a pesquisar a presença dos HPV dos tipos 16 e 18. Quando os principais tipos de HPV detectados em CEC esofágico nas diferentes regiões do mundo são comparados, os tipos HPV-16 (11,4%), 18 (2,9%), 52 (1,1%), 33 (0,8%) e 31 (0,6%) são os mais prevalentes³⁷. Traçando-se um paralelo com lesões cervicais, a frequência de HPV em mulheres saudáveis de diferentes regiões do mundo evidenciou que o HPV-56 baixa e pouco frequente, mas relatado na Ásia (0,8%). Na América do Sul, os tipos de HPV mais frequentemente detectados em colo uterino são HPV-16, 58, 18, 45 e 31, sendo que, apenas os tipos HPV-16, 18 e 31 são citados como frequentes em câncer cervical e esofágico. A partir dessas informações, acredita-se que os principais tipos de HPV que infectam a mucosa esofágica na população brasileira, são diferentes daqueles que infectam a mucosa do colo uterino e esôfago nas demais regiões do mundo⁹².

Assim, a hipótese de que a divergência de resultados sobre a frequência de HPV em esôfago nas diferentes regiões do mundo seja consequência da origem das amostras e das diferentes metodologias utilizadas para detecção do vírus, ganha uma nova abordagem, pois a real causa dessa divergência de resultados possa ser os diferentes tipos de HPV que infectam a mucosa esofágica nas diferentes populações estudadas.

Analisando estatisticamente os resultados de frequência de HPV-16 pelas duas técnicas, foi demonstrado que a concordância entre o PCR em tempo real e o Luminex (Kappa = 0,461) foi moderada e que a escolha de apenas uma das técnicas não seria suficiente para definir a real frequência de HPV de alto risco na população brasileira, já que o HPV-16, neste caso, não foi o tipo mais frequentemente detectado nesta população.

Apesar de haver concordância em alguns resultados, observamos que 14 amostras (2 de tecido tumoral e 12 de controles) que foram positivas para HPV-16 por PCR em tempo real e negativas para Luminex. Entretanto, não há amostras positiva para Luminex e negativa para PCR em tempo real.

Na tentativa de explicar a diferença de detecção de HPV-16 por ambas as técnicas, observamos que a sequência de primers e sondas utilizados nas duas técnicas são diferentes. Para o PCR em tempo real, a sonda complementar ao DNA do HPV-16 apresenta a sequência 5'- 6FAM-CAAGCAGAACCGGACAG-MGBNFQ-3', enquanto a

sonda complementar ao DNA HPV-16 por Luminex é a seguinte: 5'TACCTACGACATGGGGAG-3'⁸⁹, havendo possibilidade de divergência entre os resultados.

O clássico estudo de Walboomers *et al* (1999) mostrou que uma alta porcentagem de casos de infecção por HPV em colo uterino poderia ser subestimada devido à inadequação de amostras ou à eventos de integração afetando o gene L1 HPV, que é um alvo muito frequente dos testes baseados em PCR. Os autores reanalisaram casos que inicialmente foram considerados HPV negativos com PCR específico para a região E7 de 14 tipos de HPV de alto risco e detectaram DNA HPV em 69,0% das amostras inicialmente negativas⁸⁷. Segundo os autores, há duas causas principais para os resultados falso-negativos: a desregulação de sequências alvo de PCR devido à integração viral, e inadequação das amostras⁸⁷. No presente estudo, as duas técnicas utilizadas para detecção de HPV de alto risco são baseadas em E6 e E7, e como podemos observar, a utilização de sequências diferentes para as duas técnicas resultou na divergência de resultados encontrados; portanto, um resultado positivo não pode ser anulado por outro.

A reprodutibilidade da técnica Linear Array para genotipagem de HPV foi testada e evidenciou que somente 67,2% das amostras apresentaram os mesmos resultados. Tal resultado foi justificado pela classificação de intensidade de sinal da hibridização, pois as principais mudanças de resultados (de positivo para negativo e, vice versa) entre o primeiro e segundo teste ocorreram quando a intensidade do sinal foi classificado como fraco; sendo que, nesses casos, a concordância foi menor do que 50%⁹³.

De acordo com o exposto acima, as técnicas utilizadas nesse estudo para identificação de HPV não puderam ser plenamente reprodutíveis e, por isso, optou-se por unir os resultados gerados pelas duas técnicas para estabelecer uma frequência geral de HPV de alto risco na população atendida no HCB e AME Clínico de Barretos.

Dessa forma, a frequência geral de DNA HPV de alto risco detectada nos indivíduos do grupo com câncer (20,8%) do nosso estudo assemelha-se com os dados de revisão sistemática e meta-análise realizada em 2014 que constataram a prevalência de 22,2% de HPV³⁷ em CEC de esôfago. Além disso, essa frequência se enquadra aos valores detectados por outra revisão recente, sendo que, segundo os

autores, a taxa de infecção de HPV em CEC de esôfago no mundo varia de 11,7 a 38,9%⁹⁴.

Quando a frequência de HPV de alto risco obtida em nosso estudo é comparada com aquela demonstrada por estudos brasileiros^{41, 64-66}, observa-se que a frequência de HPV obtida é maior o que pode ser decorrente da metodologia utilizada (Luminex) que nos permitiu a detecção de mais tipos de HPV com maior sensibilidade do que as metodologias utilizadas nos demais estudos (captura híbrida, PCR convencional utilizando primer genérico GP5+/GP6+ e, nested PCR seguido por sequenciamento). Além disso, deve-se ressaltar que a origem das populações avaliadas nos estudos é divergente da nossa, a qual é muito heterogênea, de acordo com estudo prévio de nosso grupo (Costa AM, dissertação). Quando a frequência geral de HPV de alto risco foi avaliada em indivíduos saudáveis, foi obtido 34,7% de HPV, semelhante aquelas relatadas por revisão sistemática e meta-análise, variando de 6 a 57%³⁷.

Outro tecido analisado em nosso estudo foi o normal adjacente ao tumor que apresentou frequência geral de 4,7% de DNA HPV de alto risco dentro da faixa encontrada por revisão sistemática e meta-análise, de 0 a 66%³⁷.

Segundo recente revisão da literatura, os dados de estudos compilados indicam que o HPV não possui papel etiológico significativo na grande maioria dos casos de CEC de esôfago⁶¹, e esta conclusão se aplica aos resultados demonstrados pelo presente estudo, já que tivemos uma frequência significativamente maior de DNA HPV de alto risco no grupo de pacientes sem CE, quando comparado ao grupo com CE.

Além de detectar a incidência de HPV de alto risco em esôfago de indivíduos com e sem câncer, avaliamos também a expressão de proteínas envolvidas com a tumorigênese, pois sabe-se que a expressão alterada (reduzida ou aumentada) de algumas proteínas como p53 e p16 está diretamente relacionada com a progressão tumoral em diversos tipos de cânceres.

A proteína supressora tumoral, p53, está envolvida no controle do ciclo celular e tem como função proteger as células expostas a danos no DNA, tais como fumaça de cigarro⁹⁵. Além disso, estudos recentes têm demonstrado que mutações no gene *TP53* podem levar ao aumento da expressão nuclear da proteína p53 e isto estaria relacionado com pior prognóstico em tumores gástricos, de pulmão e outros tipos de cânceres⁷¹. No entanto, essa relação ainda não está bem definida para tumor de

esôfago e sugere que o pequeno número de amostras testadas, as diferentes populações estudadas, os parâmetros prognósticos avaliados e até técnicas laboratoriais e anticorpos utilizados, sejam os motivos da falta de consenso neste assunto⁷¹.

Com a perspectiva de ajudar na elucidação do papel de p53 na tumorigênese esofágica, foi encontrado em nosso estudo que a expressão da proteína p53 aumenta progressivamente com a gravidade da lesão esofágica, pois tecidos de indivíduos controles apresentaram marcação positiva para p53 em apenas 1,6% das amostras, enquanto para tecido normal adjacente ao tumor, 18,8% de amostras foram positivas; e, em tecido tumoral, a expressão foi de 68,8% nas amostras analisadas. Esses resultados corroboram resultado prévio de marcação para p53 e aumento progressivo nas situações de megaesôfago chagásico (26,1%), esofagite crônica (52,2%) e CEC de esôfago (100%)⁹⁶. Além disso, foi demonstrado que a positividade para p53 em tecidos normais adjacentes ao tumor pode ser considerada um fator de risco para a recorrência tumoral e auxilia na avaliação de recorrência tumoral em pacientes que tiveram o tumor primário ressecado⁹⁵.

A análise da expressão da proteína p53 e o status de HPV de alto risco mostrou que não há relação estatisticamente significativa entre eles. Resultado semelhante de frequência mais alta de p53 na população sem HPV de alto risco (16 e 18) foi encontrado por outros estudos⁹⁷. Um estudo brasileiro também não encontrou relação entre mutação no gene TP53 e o status de HPV, mostrando 33% de frequência de mutação em TP53 em amostras negativas para HPV e 28% de mutação em amostras positivas para HPV⁴¹.

A relação inversa entre expressão de p53 e infecção por HPV também foi observada, sendo que identificou-se 23,9% de amostras HPV positivas com expressão negativa de p53; esse resultado corrobora aqueles encontrados por Katiyar *et al.* (2005)⁹⁷ e Furihata *et al.* (1993)⁹⁸. Além disso, a presença de mutação de p53 em CE HPV positivos ou negativos sugere que a infecção por HPV e as mutações em p53 não são mutuamente exclusivas e que o papel principal na oncogênese talvez seja desempenhado por outros fatores do que pela interação entre HPV e proteína p53 em CE, como por exemplo carcinógenos ambientais⁹⁷.

A partir da conclusão de que a expressão de p53 não está relacionada à infecção por HPV em esôfago, avaliamos a participação dessa proteína no CE, independentemente do HPV.

Em relação aos hábitos de vida dos indivíduos e a expressão de p53, o presente estudo demonstrou que os indivíduos que fazem consumo de álcool e, álcool e tabaco concomitantes, apresentam maior frequência de expressão positiva de p53, comparado aos indivíduos que não possuem hábito de fumar e beber. Sabe-se que a exposição contínua à componentes carcinogênicos do tabaco causam mutações em alguns genes importantes do ciclo celular, como o p53, levando à superexpressão e acúmulo anormal dessa proteína. Essas mutações resultam na formação de uma proteína disfuncional que é sequestrada e acumula-se na célula, permitindo o desenvolvimento do câncer⁹⁵. No entanto, há poucos estudos detalhados que esclarece a relação entre eles⁹⁹. Corroborando com os nossos achados, estudo em população masculina de japoneses também encontrou níveis altos de acúmulo de p53 em carcinoma *in situ* de esôfago e mucosa de CEC esofágico invasivo de indivíduos que faziam consumo de álcool¹⁰⁰. Também, Kato *et al.* (2001)⁹⁹, Mizobuchi *et al.* (2000)¹⁰¹, Taghavi *et al.* (2010)⁹⁵, Szyman'ska *et al.* (2010)¹⁰², obtiveram resultados semelhantes. Além disso, estudos demonstraram que o consumo concomitante de álcool e tabaco estão correlacionados com o aumento de expressão da proteína p53^{99, 103}.

Entretanto, esses resultados são contrários aos encontrados por Murata *et al.* (2013)⁷¹ e Rossini *et al.* (2010)¹⁰⁴, que não encontraram relação entre a superexpressão da proteína p53 ou mutação em TP53 e consumo de álcool e tabaco.

Ainda, de modo semelhante aos nossos achados, alguns autores⁷¹ não encontraram correlação com sexo, idade, estágio TNM e, grau histológico, concluindo que a expressão de p53 não estaria relacionada com sobrevida global ou livre de doença, não tendo impacto no prognóstico do câncer de esôfago⁷¹. No entanto, outros⁷⁰ descreveram que a expressão aumentada de p53 possui correlação com o grau patológico e o estágio N.

A outra proteína avaliada no presente estudo, p16, é comumente utilizada para mensurar a atividade oncogênica do HPV. A proteína E7 do HPV de alto risco inibe a pRb, liberando o fator de transcrição E2F, que promove a progressão do ciclo celular e

expressão de p16. Sendo assim, a marcação IHC dessa proteína é assumida por alguns como um marcador de atividade oncogênica de HPV em câncer cervical e displasia⁶¹.

Observamos que há maior expressão da proteína em tecido tumoral (13,2%), quando comparado aos tecidos normal adjacente (3,9%) e controles (0,0%). Em câncer cervical foi demonstrado que a expressão de p16 aumenta gradativamente com o grau da lesão^{105, 106} e, uma meta análise estimou que há expressão de p16 em cerca de 2% dos tecidos normais, 38% de CIN1, 65% de CIN2 e, 82% de CIN3¹⁰⁷.

Baseado na hipótese de que a marcação imunohistoquímica para p16 é utilizada como técnica de detecção (indireta) de HPV em tumores de cabeça e pescoço, independente ou associado à outras técnicas de detecção de HPV, como por exemplo PCR, buscamos avaliar o papel dessa proteína em amostras esofágicas relacionadas ou não à infecção por HPV. Esse método de detecção de HPV baseado em IHC seria de grande relevância, já que se trata de um teste de fácil execução e com a possibilidade de se relacionar alteração morfológica e expressão protéica, concomitantemente¹⁰⁸.

Não foi observada relação estatisticamente significativa entre a expressão da proteína p16 e o status de HPV nas amostras esofágicas de pacientes com e sem CE, tendo sido detectadas 3 amostras (1,5%) com resultados concordantes p16+/HPV+. Esse resultado corrobora recente revisão sistemática, onde é mostrado que, diferentemente dos resultados para câncer cervical e orofaringe, em CE há pouca ou nenhuma concordância entre a superexpressão de p16 e a positividade de HPV. Ao reunir estudos em CE, os autores concluíram que a taxa de dupla positividade (HPV+/p16+) fica abaixo de 5% dos casos⁶¹. Apesar de alguns estudos em cabeça e pescoço mostrarem forte relação entre a expressão de p16 e presença de DNA HPV, foi demonstrado que os testes para detecção de DNA HPV e IHC para p16 não são aceitavelmente concordantes, e que o uso de apenas um desses testes é inadequado para confirmar a origem viral em CEC de orofaringe¹⁰⁸.

Foi observado que 9 amostras esofágicas (4,5%) foram p16+/HPV- , resultado esse semelhante ao obtido por Fonmarty *et al* (2015), que analisaram a expressão de p16 e o status de HPV em tumores de orofaringe. Os autores identificaram 11 amostras discordantes (p16+/HPV PCR-) e, segundo eles, a superexpressão de p16 detectada por IHC reflete uma função alterada de pRb induzida pela oncoproteína viral E7; e, esta função alterada pode ser secundária à mutação do gene Rb

independentemente da infecção persistente por HPV¹⁰⁸. Uma outra hipótese para explicar esses resultados, pode ser atribuída a falha do PCR em detectar o DNA viral, que pode ser explicado pelo não reconhecimento da sequência L1 do genoma viral pelos primers complementares usados no PCR¹⁰⁸. Kawakami *et al* (2003) obtiveram 11% de amostras p16+/HPV- e sugeriram que esse resultado reflete uma desregulação na via de sinalização de Rb não relacionado ao HPV, como foi observado, por exemplo, em linfomas e câncer de pulmão de pequenas células¹⁰⁹.

Thomas e Primeaux (2005) também detectaram cerca de 20,0% de amostras de CEC de cabeça e pescoço p16+/HPV-, e sugeriram que existe ou um mecanismo alternativo de superexpressão de p16, ou uma inativação mutacional do gene do retinoblastoma relacionado ao HPV, ou ainda tipos de HPV não detectáveis pelos testes disponíveis¹¹⁰.

Ainda em cabeça e pescoço, Robinson *et al* (2010)¹¹¹ e Schache *et al* (2011)¹¹² obtiveram 5% e 8% de amostras p16+/HPV-, respectivamente. E, em recente revisão sistemática da literatura observou-se que 10-20% dos casos de cabeça e pescoço p16-positivos são HPV negativos⁶¹.

A relação inversa p16-/HPV+ também é questionada por alguns autores que buscam desvendar se há possibilidade do HPV desempenhar seu papel carcinogênico em esôfago, sem a indução de superexpressão de p16. Dentre as hipóteses sugeridas, uma delas é a de que a carcinogênese esofágica pode envolver uma alta taxa de promotores de metilação de p16, inibindo, assim, a sua expressão na infecção por HPV oncogênico⁶¹. Demonstrou-se que há perda da expressão de p16 secundária ao promotor de metilação em 72% dos casos de CEC de esôfago¹¹³, assim como foi demonstrado para outros tipos tumorais¹¹⁴.

O corrente estudo também encontrou resultados semelhantes, onde 53 amostras (26,4%) foram p16-/HPV+. Kawakami *et al* (2013) relataram que 20% de tumores esofágicos de sua população era p16-/HPV+, e que a maioria desses tumores manifestaram metilação do gene promotor de p16¹⁰⁹. Resultados semelhantes em carcinomas de cabeça e pescoço também demonstraram casos p16-/HPV+, embora em menores frequências^{112, 115, 116}.

Baseado no fato de que pode haver detecção IHC de p16 em tecidos normais, alguns estudos têm proposto avaliar a detecção IHC simultânea desse biomarcador de

infecção por HPV, juntamente com o marcador de proliferação celular Ki-67, sendo que a dupla expressão p16/Ki-67 pela mesma célula poderia ser mutuamente exclusiva e designar especificamente células desreguladas que estão caminhando para a transformação maligna. Sendo assim, a detecção IHC simultânea de p16/Ki-67 foi estabelecida em programas de prevenção de câncer cervical e, é mundialmente utilizado na rotina em ginecologia. Além disso, estudos em cabeça e pescoço, têm corroborado também que dupla marcação p16/Ki-67 combinada à detecção de HPV, por PCR por exemplo, pode ser altamente eficiente em amostras citológicas⁷⁷.

Entretanto, para amostras de material parafinado, não há estudos que demonstrem a mesma eficiência de detecção da dupla marcação p16/Ki-67 e, além disso, para CE não há estudos que demonstrem essa relação da dupla marcação p16/Ki-67 e a presença de DNA HPV. Sendo assim, decidimos avaliar se há relação entre a expressão da dupla marcação p16/Ki-67 e o status de HPV de alto risco em amostras de biópsias esofágicas e, os resultados obtidos demonstraram que não há relação dessa dupla marcação IHC p16/Ki-67 e a presença de DNA HPV de alto risco na série analisada. Considerando-se o que já foi discutido sobre a expressão de p16 em material esofágico, esse resultado não chega a surpreender posto que não há correlação direta da positividade de p16 e HPV.

6 CONCLUSÕES

1. A frequência de HPV-16 obtida pela técnica de PCR em tempo real específica para o tipo viral foi de 3,0% para o grupo caso e 20,8% para o controle. Ainda, dentro do grupo caso, frequências de 3,0% e 20,8% foram obtidas para tecidos tumoral e normal adjacente coletados. Para o grupo controle, frequências de 20,7% e 10,5% foram obtidas para tecidos proximal e distal coletados de esôfago saudável.

2. A frequência de HPV de alto risco determinada por PCR multiplex foi de 21,3% nas amostras de carcinoma esofágico e 22,2% nas amostras de esôfago saudável. Para os tecidos coletados de casos, frequências de 22,1% e 7,4% foram encontradas em tecidos tumoral e normal adjacente, respectivamente. Para os controles, frequências de 20,7% e 10,4% foram obtidas para os tecidos proximal e distal coletados de esôfago saudável.

3. A expressão das proteínas p53, p16 e p16/Ki-67 por imunohistoquímica foi significativamente maior no grupo caso comparada com a do grupo controle. Além disso, observou-se aumento progressivo da expressão da proteína do tecido de controles, para o tecido normal adjacente e, tecido tumoral, respectivamente. Em relação à expressão das proteínas por imunohistoquímica, detectou-se que p53 estava presente em 68,0% das amostras do grupo caso e 1,6% nos controles saudáveis. Para os tecidos de cada grupo, a expressão de p53 foi de 68,0%, 21,0% e 1,6% em tecidos tumoral, normal adjacente e esôfago saudável, respectivamente. A expressão de p16 foi detectada em 12,0% dos tecidos coletados de casos e não houve expressão da proteína em tecidos coletados de controles. Dentro do grupo caso, houve expressão de 100,0% e 99,0% nos tecidos tumoral e normal adjacente, respectivamente. A primeira análise de Ki-67 mostrou que houve expressão desse marcador em mais de 1% das células de 100,0% dos tecidos dos grupos caso e controle. Entretanto, análise posterior mostrou que, considerando como expressão positiva a marcação em mais de 25% do tecido, há expressão do marcador de proliferação celular em 66,3% dos tecidos do grupo casos e 6,9% dos tecidos do grupo controle analisados. Para tecidos de cada grupo, a expressão de Ki-67 foi de 68,8%, 12,5% e 6,9% em tecidos tumoral, normal

adjacente e controles. Em relação à expressão da dupla marcação p16/Ki-67, houve marcação positiva em 41,4% dos tecidos do grupo casos e 25,0% dos controles. Além disso, para os tecidos de cada grupo, frequências de 42,4%, 25,0% e 25,0% foram obtidas para os tecidos tumoral, normal adjacente e controles analisados.

4. Foi demonstrado que as proteínas p53, p16 e p16/Ki-67 não relacionam com HPV de alto risco nos tecidos esofágicos analisados. Relação significativa foi observada entre a expressão de p53 e hábitos de consumo de álcool e tabaco, onde os indivíduos com expressão positiva da proteína fazem mais consumo de álcool e álcool e tabaco concomitantes, o que nos permite concluir que a ingestão de tabaco e álcool interferem na via de sinalização de p53, alterando sua expressão.

De modo geral, conclui-se que a frequência geral de HPV de alto risco nos casos de câncer esofágico é de 20,8% e 34,7% nos indivíduos saudáveis e não há relação de HPV com os marcadores moleculares indiretos da infecção e relacionados com a carcinogênese esofágica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ferlay J SI, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. *GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]*. [Internet] Lyon, France 2013 [cited 12/04/2014]; Available from: <http://globocan.iarc.fr>.
2. Chang F, Syrjanen S, Wang L, Syrjanen K. *Infectious agents in the etiology of esophageal cancer*. **Gastroenterology**. 1992;103(4):1336-48.
3. Benamouzig R, Rautureau J, Jullian E, Pompidou A. *Human papillomavirus and esophageal squamous cell carcinoma*. **Gastroenterology**. 1995;108(5):1605; author reply 6.
4. Togawa Z, Rustgi AK. *Human papillomavirus and esophageal squamous cell carcinoma*. **Gastroenterology**. 1995;108(5):1605-6.
5. Franceschi S, Munoz N, Bosch XF, Snijders PJ, Walboomers JM. *Human papillomavirus and cancers of the upper aerodigestive tract: a review of epidemiological and experimental evidence*. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. 1996;5(7):567-75.
6. 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(3):266-71.
7. Sur M, Cooper K. *The role of the human papilloma virus in esophageal cancer*. **Pathology**. 1998;30(4):348-54.
8. zur Hausen H. *Papillomaviruses in human cancers*. **Proc Assoc Am Physicians**. 1999;111(6):581-7.
9. Asamoto M, Toriyama-Baba H, Ohnishi T, Naito A, Ota T, Ando A, et al. *Transgenic rats carrying human c-Ha-ras proto-oncogene are highly susceptible to N-nitrosomethylbenzylamine induction of esophageal tumorigenesis*. **Jpn J Cancer Res**. 2002;93(7):744-51.
10. Matsha T, Erasmus R, Kafuko AB, Mugwanya D, Stepien A, Parker MI. *Human papillomavirus associated with oesophageal cancer*. **J Clin Pathol**. 2002;55(8):587-90.
11. Shen ZY, Xu LY, Li EM, Shen J, Zheng RM, Cai WJ, et al. *Immortal phenotype of the esophageal epithelial cells in the process of immortalization*. **Int J Mol Med**. 2002;10(5):641-6.
12. Shen ZY, Xu LY, Chen MH, Li EM, Li JT, Wu XY, et al. *Upregulated expression of Ezrin and invasive phenotype in malignant transformed esophageal epithelial cells*. **World J Gastroenterol**. 2003;9(6):1182-6.

13. Cervantes J. *Update on the pathogenesis and immunotherapy of esophageal squamous cell carcinoma*. **Rev Gastroenterol Peru**. 2004;24(2):165-70.
14. Gillison ML, Shah KV. *Chapter 9: Role of mucosal human papillomavirus in nongenital cancers*. **J Natl Cancer Inst Monogr**. 2003(31):57-65.
15. Syrjänen K CF, Syrjänen S. . *Infectious agents as etiological factors in esophageal carcinogenesis*. In: Tahara E SK, Oohara T, editor. *Recent advances in gastroenterological carcinogenesis I*. **Bologna**1996. p. 29-43.
16. Snijders PJ, Steenbergen RD, Meijer CJ, Walboomers JM. *Role of human papillomaviruses in cancer of the respiratory and upper digestive tract*. **Clin Dermatol**. 1997;15(3):415-25.
17. Zhang H, Xia J, Wang K, Zhang J. *Serum autoantibodies in the early detection of esophageal cancer: a systematic review*. **Tumour Biol**. 2014.
18. Zamanian-Azodi M, Rezaei-Tavirani M, Hasanzadeh H, Rahmati Rad S, Dalilan S. *Introducing biomarker panel in esophageal, gastric, and colon cancers; a proteomic approach*. **Gastroenterol Hepatol Bed Bench**. 2015;8(1):6-18.
19. Steffen A, Schulze MB, Pischon T, Dietrich T, Molina E, Chirlaque MD, et al. *Anthropometry and esophageal cancer risk in the European prospective investigation into cancer and nutrition*. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. 2009;18(7):2079-89.
20. INCA. *Estimativa 2012: Incidência de câncer no Brasil*. . [Internet] 2011;Available from: www.inca.gov.br/estimativa/2014/.
21. INCA. *"INCA. Estimativa 2014: Incidência de câncer no Brasil."*. [Internet] 2014 [cited 05/05/2014];Available from: www.inca.gov.br/estimativa/2014/.
22. 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(12):2893-917.
23. K. S. *HPV and esophageal cancer. Papillomavirus Research: From Natural History to Vaccines and Beyond*. **Norwich, UK**2006. p. 229-53.
24. K. S. *Human papillomavirus (HPV) involvement on esophageal carcinogenesis*. In: Publishing NS, editor. **New York, USA**2010.
25. Xibib S, Meilan H, Moller H, Evans HS, Dixin D, Wenjie D, et al. *Risk factors for oesophageal cancer in Linzhou, China: a case-control study*. **Asian Pac J Cancer Prev**. 2003;4(2):119-24.

26. Syrjanen K SS. *Papilomavirus infections in human payhology*. In: Sons JW, editor. **New York, USA**2000.
27. K. S. *HPV et tumeurs épidermoïdes bénignes et malignes de l'æsophag*. In: Aubin F PJ, Mougin C, editor. *Papillomavirus Humains Biologie et pathologie tumorale*. **Paris: TEC & DOC**; 2003.
28. Sharp L, Chilvers CE, Cheng KK, McKinney PA, Logan RF, Cook-Mozaffari P, et al. *Risk factors for squamous cell carcinoma of the oesophagus in women: a case-control study*. **Br J Cancer**. 2001;85(11):1667-70.
29. Chitra S, Ashok L, Anand L, Srinivasan V, Jayanthi V. *Risk factors for esophageal cancer in Coimbatore, southern India: a hospital-based case-control study*. **Indian J Gastroenterol**. 2004;23(1):19-21.
30. Baehr PH, McDonald GB. *Esophageal infections: risk factors, presentation, diagnosis, and treatment*. **Gastroenterology**. 1994;106(2):509-32.
31. 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(4):291-6.
32. Syrjanen KJ. *Human papillomavirus (HPV) infections and their associations with squamous cell neoplasia*. **Arch Geschwulstforsch**. 1987;57(6):417-44.
33. Cancer WHOIAFRoC. *Smokeless Tobacco and Some Tobacco-Specific N-Nitrosamines*. **Lyon, France**2007.
34. Zhang SK, Guo LW, Chen Q, Zhang M, Liu SZ, Quan PL, et al. *Prevalence of Human Papillomavirus 16 in Esophageal Cancer Among the Chinese Population: a Systematic Review and Meta-analysis*. **Asian Pac J Cancer Prev**. 2014;15(23):10143-9.
35. Hardefeldt HA, Cox MR, Eslick GD. *Association between human papillomavirus (HPV) and oesophageal squamous cell carcinoma: a meta-analysis*. **Epidemiol Infect**. 2014;142(6):1119-37.
36. Petrick JL, Wyss AB, Butler AM, Cummings C, Sun X, Poole C, et al. *Prevalence of human papillomavirus among oesophageal squamous cell carcinoma cases: systematic review and meta-analysis*. **Br J Cancer**. 2014;110(9):2369-77.
37. Li X, Gao C, Yang Y, Zhou F, Li M, Jin Q, et al. *Systematic review with meta-analysis: the association between human papillomavirus infection and oesophageal cancer*. **Aliment Pharmacol Ther**. 2014;39(3):270-81.
38. Liyanage SS, Segelov E, Garland SM, Tabrizi SN, Seale H, Crowe PJ, et al. *Role of human papillomaviruses in esophageal squamous cell carcinoma*. **Asia Pac J Clin Oncol**. 2013;9(1):12-28.

39. Castellsague X, Munoz N, De Stefani E, Victora CG, Castelletto R, Rolon PA. *Influence of mate drinking, hot beverages and diet on esophageal cancer risk in South America.* **Int J Cancer.** 2000;88(4):658-64.
40. Islami F, Malekshah AF, Kimiagar M, Pourshams A, Wakefield J, Gogiani G, et al. *Patterns of food and nutrient consumption in northern Iran, a high-risk area for esophageal cancer.* **Nutr Cancer.** 2009;61(4):475-83.
41. Herbster S, Ferraro CT, Koff NK, Rossini A, Kruel CD, Andreollo NA, et al. *HPV infection in Brazilian patients with esophageal squamous cell carcinoma: interpopulational differences, lack of correlation with surrogate markers and clinicopathological parameters.* **Cancer Lett.** 2012;326(1):52-8.
42. Baseman JG, Koutsky LA. *The epidemiology of human papillomavirus infections.* **J Clin Virol.** 2005;32 Suppl 1:S16-24.
43. *Genital human papillomavirus infections and cancer: memorandum from a WHO meeting.* **Bull World Health Organ.** 1987;65(6):817-27.
44. Zandberg DP, Bhargava R, Badin S, Cullen KJ. *The role of human papillomavirus in nongenital cancers.* **CA Cancer J Clin.** 2013;63(1):57-81.
45. Schmitt M, de Koning MN, Eekhof JA, Quint WG, Pawlita M. *Evaluation of a novel multiplex human papillomavirus (HPV) genotyping assay for HPV types in skin warts.* **J Clin Microbiol.** 2011;49(9):3262-7.
46. zur Hausen H. *Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account.* **Virology.** 2009;384(2):260-5.
47. zur Hausen H. *Yohei Ito Memorial Lecture: Papillomaviruses in human cancers.* **Leukemia.** 1999;13(1):1-5.
48. Syrjanen KJ. *HPV infections and oesophageal cancer.* **J Clin Pathol.** 2002;55(10):721-8.
49. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. *Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group.* **J Natl Cancer Inst.** 1995;87(11):796-802.
50. Pinto AP, Degen M, Villa LL, Cibas ES. *Immunomarkers in gynecologic cytology: the search for the ideal 'biomolecular Papanicolaou test'.* **Acta Cytol.** 2012;56(2):109-21.
51. Clarke B, Chetty R. *Cell cycle aberrations in the pathogenesis of squamous cell carcinoma of the uterine cervix.* **Gynecol Oncol.** 2001;82(2):238-46.

52. White E. *Tumour biology. p53, guardian of Rb.* **Nature.** 1994;371(6492):21-2.
53. Havre PA, Yuan J, Hedrick L, Cho KR, Glazer PM. *p53 inactivation by HPV16 E6 results in increased mutagenesis in human cells.* **Cancer Res.** 1995;55(19):4420-4.
54. Bahnassy AA, Zekri AR, Saleh M, Lotayef M, Moneir M, Shawki O. *The possible role of cell cycle regulators in multistep process of HPV-associated cervical carcinoma.* **BMC Clin Pathol.** 2007;7:4.
55. Chung CH, Gillison ML. *Human papillomavirus in head and neck cancer: its role in pathogenesis and clinical implications.* **Clin Cancer Res.** 2009;15(22):6758-62.
56. El Hamdani W, Amrani M, Attaleb M, Laantri N, Ennaji MM, Khyatti M, et al. *EGFR, p16INK4a and E-cadherin immuno-histochemistry and EGFR point mutations analyses in invasive cervical cancer specimens from Moroccan women.* **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).** 2010;56 Suppl:OL1373-84.
57. Sahasrabuddhe VV, Luhn P, Wentzensen N. *Human papillomavirus and cervical cancer: biomarkers for improved prevention efforts.* **Future Microbiol.** 2011;6(9):1083-98.
58. Zappacosta R, Colasante A, Viola P, D'Antuono T, Lattanzio G, Capanna S, et al. *Chromogenic in situ hybridization and p16/Ki67 dual staining on formalin-fixed paraffin-embedded cervical specimens: correlation with HPV-DNA test, E6/E7 mRNA test, and potential clinical applications.* **Biomed Res Int.** 2013;2013:453606.
59. Doorbar J. *Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer.* **Clin Sci (Lond).** 2006;110(5):525-41.
60. Westra WH. *Detection of human papillomavirus (HPV) in clinical samples: evolving methods and strategies for the accurate determination of HPV status of head and neck carcinomas.* **Oral Oncol.** 2014;50(9):771-9.
61. Ludmir EB, Stephens SJ, Palta M, Willett CG, Czito BG. *Human papillomavirus tumor infection in esophageal squamous cell carcinoma.* **Journal of Gastrointestinal Oncology.** 2015;6(3):287-95.
62. Gheit T, Billoud G, de Koning MN, Gemignani F, Forslund O, Sylla BS, et al. *Development of a sensitive and specific multiplex PCR method combined with DNA microarray primer extension to detect Betapapillomavirus types.* **J Clin Microbiol.** 2007;45(8):2537-44.
63. Bogusiak K, Kobos J. *The role of human papillomavirus infection in the head and neck region and methods for its detection.* **Pol J Pathol.** 2014;65(1):1-14.

64. Weston AC, Prolla JC. *Association between esophageal squamous cell carcinoma and human papillomavirus detected by Hybrid Capture II assay.* **Dis Esophagus.** 2003;16(3):224-8.
65. Souto Damin AP, Guedes Frazzon AP, de Carvalho Damin D, Beck Biehl H, Abruzzi de Oliveira L, Auler R, et al. *Detection of human papillomavirus DNA in squamous cell carcinoma of the esophagus by auto-nested PCR.* **Dis Esophagus.** 2006;19(2):64-8.
66. Antunes LC, Prolla JC, de Barros Lopes A, da Rocha MP, Fagundes RB. *No evidence of HPV DNA in esophageal squamous cell carcinoma in a population of Southern Brazil.* **World J Gastroenterol.** 2013;19(39):6598-603.
67. Gaur P, Kim MP, Dunkin BJ. *Esophageal cancer: Recent advances in screening, targeted therapy, and management.* **J Carcinog.** 2014;13:11.
68. Chen M, Huang J, Zhu Z, Zhang J, Li K. *Systematic review and meta-analysis of tumor biomarkers in predicting prognosis in esophageal cancer.* **BMC Cancer.** 2013;13:539.
69. Shibata-Kobayashi S, Yamashita H, Okuma K, Shiraishi K, Igaki H, Ohtomo K, et al. *Correlation among 16 biological factors [p53, p21(waf1), MIB-1 (Ki-67), p16(INK4A), cyclin D1, E-cadherin, Bcl-2, TNF-alpha, NF-kappaB, TGF-beta, MMP-7, COX-2, EGFR, HER2/neu, ER, and HIF-1alpha] and clinical outcomes following curative chemoradiation therapy in 10 patients with esophageal squamous cell carcinoma.* **Oncol Lett.** 2013;5(3):903-10.
70. Huang K, Chen L, Zhang J, Wu Z, Lan L, Wang L, et al. *Elevated p53 expression levels correlate with tumor progression and poor prognosis in patients exhibiting esophageal squamous cell carcinoma.* **Oncol Lett.** 2014;8(4):1441-6.
71. Murata A, Baba Y, Watanabe M, Shigaki H, Miyake K, Karashima R, et al. *p53 immunohistochemical expression and patient prognosis in esophageal squamous cell carcinoma.* **Med Oncol.** 2013;30(4):728.
72. Rao X, Huang D, Sui X, Liu G, Song X, Xie J. *Overexpression of WRAP53 is associated with development and progression of esophageal squamous cell carcinoma.* **PLoS One.** 2014;9(3):e91670.
73. Akcay NI, Bashirov R, Tuzmen S. *Validation of signalling pathways: Case study of the p16-mediated pathway.* **J Bioinform Comput Biol.** 2014:1550007.
74. Chung CH, Zhang Q, Kong CS, Harris J, Fertig EJ, Harari PM, et al. *p16 Protein Expression and Human Papillomavirus Status As Prognostic Biomarkers of Nonoropharyngeal Head and Neck Squamous Cell Carcinoma.* **J Clin Oncol.** 2014;32(35):3930-8.

75. Cao F, Zhang W, Zhang F, Han H, Xu J, Cheng Y. *Prognostic significance of high-risk human papillomavirus and p16(INK4A) in patients with esophageal squamous cell carcinoma.* **Int J Clin Exp Med.** 2014;7(10):3430-8.
76. Li LT, Jiang G, Chen Q, Zheng JN. *Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review).* **Mol Med Rep.** 2015;11(3):1566-72.
77. Linxweiler M, Bochen F, Wemmert S, Lerner C, Hasenfus A, Bohle RM, et al. *Combination of p16 -Ki67 immunocytology and hpv polymerase chain reaction for the noninvasive analysis of HPV involvement in head and neck cancer.* **Cancer Cytopathol.** 2014.
78. Jin Y, Guan S, Liu L, Sun S, Lee KH, Wei J. *Anti-p16 autoantibodies may be a useful biomarker for early diagnosis of esophageal cancer.* **Asia Pac J Clin Oncol.** 2014.
79. Motoyama S, Ladines-Llave CA, Luis Villanueva S, Maruo T. *The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis.* **Kobe J Med Sci.** 2004;50(1-2):9-19.
80. Villa LL. *Pesquisa Básica Envolvendo HPV e Doenças Relacionadas. Atualização em HPV - Abordagem Científica e Multidisciplinar.* **São Paulo: J. J. M. Carvalho;** 2012.
81. Guo F, Liu Y, Wang X, He Z, Weiss NS, Madeleine MM, et al. *Human papillomavirus infection and esophageal squamous cell carcinoma: a case-control study.* **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 2012;21(5):780-5.
82. Boffetta P, Garfinkel L. *Alcohol drinking and mortality among men enrolled in an American Cancer Society prospective study.* **Epidemiology.** 1990;1(5):342-8.
83. Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Limite da OMS para o álcool é de 30 g.* [Internet]: Diário de São Paulo; 2003;Available from: <http://www.cardiol.br/imprensa/jornais/impreso/118.htm>.
84. Boffetta P, Pershagen G, Jockel KH, Forastiere F, Gaborieau V, Heinrich J, et al. *Cigar and pipe smoking and lung cancer risk: a multicenter study from Europe.* **J Natl Cancer Inst.** 1999;91(8):697-701.
85. Tisiologia SBdPe. *Consenso Brasileiro sobre Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica.* **Publicação Oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia.** 2004.
86. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.* **Science.** 1985;230(4732):1350-4.
87. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. *Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide.* **J Pathol.** 1999;189(1):12-9.

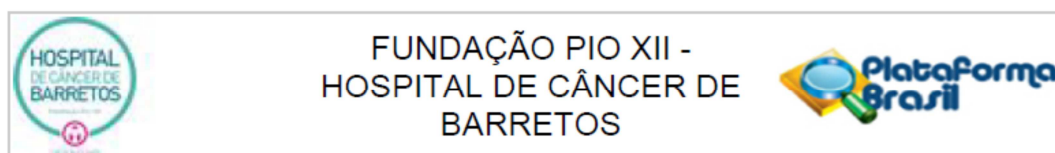
88. Munoz N, Castellsague X, de Gonzalez AB, Gissmann L. *Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. Vaccine.* 2006;24 Suppl 3:S3/1-10.
89. Schmitt M, Bravo IG, Snijders PJ, Gissmann L, Pawlita M, Waterboer T. *Bead-based multiplex genotyping of human papillomaviruses. J Clin Microbiol.* 2006;44(2):504-12.
90. Keswani RN, Noffsinger A, Waxman I, Bissonnette M. *Clinical use of p53 in Barrett's esophagus. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15(7):1243-9.
91. Landis JR, Koch GG. *The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics.* 1977;33(1):159-74.
92. Crow JM. *HPV: The global burden. Nature.* 2012;488(7413):S2-3.
93. Koshiol J, Dunn ST, Walker JL, Zuna RE, Schiffman M, Sherman ME, et al. *Reproducibility of linear array for human papillomavirus genotyping. J Clin Microbiol.* 2013;51(2):625-8.
94. Ludmir EB, Palta M, Zhang X, Wu Y, Willett CG, Czado BG. *Incidence and prognostic impact of high-risk HPV tumor infection in cervical esophageal carcinoma. J Gastrointest Oncol.* 2014;5(6):401-7.
95. Taghavi N, Biramijamal F, Sotoudeh M, Moaven O, Khademi H, Abbaszadegan MR, et al. *Association of p53/p21 expression with cigarette smoking and prognosis in esophageal squamous cell carcinoma patients. World J Gastroenterol.* 2010;16(39):4958-67.
96. Bellini MF, Cadamuro AC, Succi M, Proenca MA, Silva AE. *Alterations of the TP53 gene in gastric and esophageal carcinogenesis. J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:891961.
97. Katiyar S, Hedau S, Jain N, Kar P, Khuroo MS, Mohanta J, et al. *p53 gene mutation and human papillomavirus (HPV) infection in esophageal carcinoma from three different endemic geographic regions of India. Cancer Lett.* 2005;218(1):69-79.
98. Furihata M, Ohtsuki Y, Ogoshi S, Takahashi A, Tamiya T, Ogata T. *Prognostic significance of human papillomavirus genomes (type-16, -18) and aberrant expression of p53 protein in human esophageal cancer. Int J Cancer.* 1993;54(2):226-30.
99. Kato H, Yoshikawa M, Miyazaki T, Nakajima M, Fukai Y, Tajima K, et al. *Expression of p53 protein related to smoking and alcoholic beverage drinking habits in patients with esophageal cancers. Cancer Lett.* 2001;167(1):65-72.

100. Yokoyama A, Omori T, Tanaka Y, Yokoyama T, Sugiura H, Mizukami T, et al. *p53 Protein accumulation, cancer multiplicity, and aldehyde dehydrogenase-2 genotype in Japanese alcoholic men with early esophageal squamous cell carcinoma.* **Cancer Lett.** 2007;247(2):243-52.
101. Mizobuchi S, Furihata M, Sonobe H, Ohtsuki Y, Ishikawa T, Murakami H, et al. *Association between p53 immunostaining and cigarette smoking in squamous cell carcinoma of the esophagus.* **Jpn J Clin Oncol.** 2000;30(10):423-8.
102. Szymanska K, Levi JE, Menezes A, Wunsch-Filho V, Eluf-Neto J, Koifman S, et al. *TP53 and EGFR mutations in combination with lifestyle risk factors in tumours of the upper aerodigestive tract from South America.* **Carcinogenesis.** 2010;31(6):1054-9.
103. Saeki H, Ohno S, Miyazaki M, Araki K, Egashira A, Kawaguchi H, et al. *p53 protein accumulation in multiple oesophageal squamous cell carcinoma: relationship to risk factors.* **Oncology.** 2002;62(2):175-9.
104. Rossini A, de Almeida Simao T, Marques CB, Soares-Lima SC, Herbster S, Rapozo DC, et al. *TP53 mutation profile of esophageal squamous cell carcinomas of patients from Southeastern Brazil.* **Mutat Res.** 2010;696(1):10-5.
105. Murphy N, Ring M, Heffron CC, King B, Killalea AG, Hughes C, et al. *p16INK4A, CDC6, and MCM5: predictive biomarkers in cervical preinvasive neoplasia and cervical cancer.* **J Clin Pathol.** 2005;58(5):525-34.
106. Wang SS, Trunk M, Schiffman M, Herrero R, Sherman ME, Burk RD, et al. *Validation of p16INK4a as a marker of oncogenic human papillomavirus infection in cervical biopsies from a population-based cohort in Costa Rica.* **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 2004;13(8):1355-60.
107. Tsoumpou I, Arbyn M, Kyrgiou M, Wentzensen N, Koliopoulos G, Martin-Hirsch P, et al. *p16(INK4a) immunostaining in cytological and histological specimens from the uterine cervix: a systematic review and meta-analysis.* **Cancer Treat Rev.** 2009;35(3):210-20.
108. Fonmarty D, Cherriere S, Fleury H, Eimer S, Majoufre-Lefebvre C, Castetbon V, et al. *Study of the concordance between p16 immunohistochemistry and HPV-PCR genotyping for the viral diagnosis of oropharyngeal squamous cell carcinoma.* **Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis.** 2015.
109. Kawakami H, Okamoto I, Terao K, Sakai K, Suzuki M, Ueda S, et al. *Human papillomavirus DNA and p16 expression in Japanese patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma.* **Cancer Med.** 2013;2(6):933-41.
110. Thomas J, Primeaux T. *Is p16 immunohistochemistry a more cost-effective method for identification of human papilloma virus-associated head and neck squamous cell carcinoma?* **Ann Diagn Pathol.** 2012;16(2):91-9.

111. Robinson M, Sloan P, Shaw R. *Refining the diagnosis of oropharyngeal squamous cell carcinoma using human papillomavirus testing.* **Oral Oncol.** 2010;46(7):492-6.
112. Schache AG, Liloglou T, Risk JM, Filia A, Jones TM, Sheard J, et al. *Evaluation of human papilloma virus diagnostic testing in oropharyngeal squamous cell carcinoma: sensitivity, specificity, and prognostic discrimination.* **Clin Cancer Res.** 2011;17(19):6262-71.
113. Salam I, Hussain S, Mir MM, Dar NA, Abdullah S, Siddiqi MA, et al. *Aberrant promoter methylation and reduced expression of p16 gene in esophageal squamous cell carcinoma from Kashmir valley: a high-risk area.* **Mol Cell Biochem.** 2009;332(1-2):51-8.
114. Rocco JW, Sidransky D. *p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression.* **Exp Cell Res.** 2001;264(1):42-55.
115. Weinberger PM, Yu Z, Haffty BG, Kowalski D, Harigopal M, Brandsma J, et al. *Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus--associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis.* **J Clin Oncol.** 2006;24(5):736-47.
116. Reimers N, Kasper HU, Weissenborn SJ, Stutzer H, Preuss SF, Hoffmann TK, et al. *Combined analysis of HPV-DNA, p16 and EGFR expression to predict prognosis in oropharyngeal cancer.* **Int J Cancer.** 2007;120(8):1731-8.

ANEXOS

Anexo 1 - Carta de aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: O papel do Papilomavírus humano (HPV) no câncer esofágico. Um estudo no Hospital de Câncer de Barretos.

Pesquisador: Adhemar Longatto Filho

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 05880312.2.0000.5437

Instituição Proponente: Fundação Pio XII

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 134.471

Data da Relatoria: 23/10/2012

Apresentação do Projeto:

A apresentação do projeto de pesquisa está em conformidade, apresentando os subtítulos adequados bem como os anexos necessários para o desenvolvimento do estudo. O TCLE é descrito com linguagem de fácil entendimento e com as informações necessárias.

Objetivo da Pesquisa:

1) Avaliar a prevalência de HPV no ESCC na região de Barretos (Brasil). 2) Elucidar a distribuição genotípica de HPV. 3) Estimar as co-variáveis de HPV na patogênese do ESCC, através da recolha de um extenso conjunto de dados epidemiológicos sobre os fatores de risco conhecidos e os possivelmente relacionados ao ESCC. 4) Executar metódicos estudos caso-controle em toda a coorte, para comparar i) fumantes e não fumantes, ii) usuários de álcool e não-usuários, bem como iii) pacientes HPV+ e HPV-, pareados por idade e sexo, para divulgar as co-variáveis importantes (moleculares e fatores de risco) de tabagismo, consumo de álcool e HPV, respectivamente, na carcinogênese esofágica usando efeitos fixos (condicional) multivariados de modelagem de regressão logística. 5) Executar um estudo molecular com extenso painel de biomarcadores dirigidos para as diferentes vias moleculares da carcinogênese (incluindo os conhecidos reguladores de HPV), utilizando microarrays de cDNA, IHC e PCR. 6) Fazer a caracterização de células imunológicas presentes nas amostras de pacientes com EC e nos controles, HPV+ e HPV-, bem como a imunodeteção de citocinas antivirais.

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331

Bairro: Dr. Paulo Prata

CEP: 14.784-400

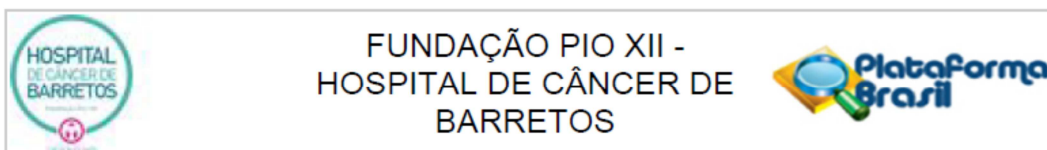
UF: SP

Município: BARRETOS

Telefone: (17)3321-6600

Fax: (17)3321-6629

E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não há nenhum risco. O material de estudo é proveniente da rotina de diagnóstico do hospital.

Benefícios:

Se conseguirmos definir que há, como nos carcinomas de cabeça-e-pescoço, pacientes com carcinoma de células escamosas do esôfago originados pela ação do HPV e/ou características da resposta inflamatória gerada, a conduta terapêutica poderá ser diferenciada para reduzir o tempo de tratamento e aumentar a chance de cura. Geralmente as neoplasias associadas ao HPV são mais responsivas a radioterapia e portanto o

tratamento poderá ser menos invasivo e mais eficaz.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não há considerações a serem feitas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não há considerações a serem feitas.

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O pesquisador esclareceu as dúvidas e pendências do estudo e de acordo com a análise das mesmas considera-se o projeto aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII e Hospital do Câncer de Barretos ANALISOU as pendências do referido projeto e decidindo que o mesmo encontra-se APROVADO.

Solicitamos que sejam encaminhados ao CEP:

1. Relatórios parciais previstos para Outubro/2013.
2. Comunicar toda e qualquer alteração do Projeto.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos, após conclusão da pesquisa, para possível auditoria dos órgãos competentes.

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331

Bairro: Dr. Paulo Prata

CEP: 14.784-400

UF: SP

Município: BARRETOS

Telefone: (17)3321-6600

Fax: (17)3321-6629

E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br

Anexo 2 - Termo de consentimento livre e esclarecido - Casos



Identificação do paciente

Prezado (a) _____

Esta pesquisa irá avaliar a presença do *Papilomavírus humano* (HPV), inflamação e de uma seleção de moléculas no desenvolvimento do câncer de esôfago. O (A) senhor (a) não será submetido a algum tipo de exame diferente daquele que o médico solicitou para diagnóstico do caso. Caso o (a) senhor (a) aceite participar da pesquisa, o (a) senhor (a) terá que responder um questionário com informações sobre diferentes aspectos de sua vida que podem contribuir para o entendimento das causas de câncer de esôfago. Quando a endoscopia for solicitada, além da coleta de fragmentos tumorais para o diagnóstico da doença, o (a) senhor (a) será submetido a um processo indolor em que uma escova será utilizada para captar as células da superfície do esôfago e assim permitir o diagnóstico. Em caso de cirurgia para retirada do tumor esofágico, será feita uma raspagem na peça retirada para a obtenção de células que serão analisadas na pesquisa em pauta. Todas as informações serão mantidas em segredo pelos pesquisadores.

Garantia de esclarecimento, liberdade de recusa e garantia de sigilo: o Senhor/Senhora será esclarecido sobre esta pesquisa em tudo que desejar. O Senhor/Senhora é livre para recusar participar deste estudo e poderá retirar o seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. Isto não acarretará em qualquer alteração ou prejuízo no tratamento médico no Hospital de Câncer de Barretos. Sua identidade será mantida em sigilo completo e absoluto, não sendo revelado o seu nome (ou qualquer informação que possa identificá-lo publicamente) em hipótese alguma. Uma cópia deste consentimento informado será enviada aos arquivos do estudo e a outra será de sua posse.

Custos da participação, ressarcimento e indenização por eventuais danos: a participação no estudo não acarretará custos e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional. Não há indenização monetária para este estudo.

DECLARAÇÃO DO PARTICIPANTE OU DO RESPONSÁVEL PELO PARTICIPANTE:

Eu, _____ fui informado dos objetivos da pesquisa acima, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e motivar minha decisão se assim o desejar.

O (A) _____ me explicou o estudo, respondeu minhas dúvidas e me certificou de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as todas as minhas dúvidas. Para sugestões, reclamações ou dúvidas, poderei contatar: 17-3321-6600, com Dr. Adhemar Longatto Filho, pesquisadores responsáveis pelo projeto no Hospital de Barretos (RAMAL 7075 e 7069), ou com o presidente do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos (RAMAL 6894).

Nome do (a) voluntário (a)

Assinatura do (a) voluntário (a)

Data: ____ / ____ / ____

Nome do Aplicador do Termo de Consentimento

Assinatura do Aplicador do Termo de Consentimento

Data: ____ / ____ / ____

Nome do (a) representante legal (grau de parentesco)

Assinatura do (a) representante legal

Data: ____ / ____ / ____

Quando esse termo for assinado pelo representante legal, precisará assinar também uma testemunha.

Nome da Testemunha

Assinatura da Testemunha

Data: ____ / ____ / ____

Anexo 3 - Termo de consentimento livre e esclarecido – Controles**Identificação do paciente**

Prezado (a) _____

Esta pesquisa irá avaliar a presença do *Papilomavírus humano* (HPV), inflamação de uma seleção de moléculas no desenvolvimento do câncer de esôfago. O (A) senhor (a) não será submetido a algum tipo de exame diferente daquele que o médico solicitou para diagnóstico do caso. Caso o (a) senhor (a) aceite participar da pesquisa, o (a) senhor (a) terá que responder um questionário com informações sobre diferentes aspectos de sua vida que podem contribuir para o entendimento das causas de câncer de esôfago. Quando a endoscopia for solicitada, além da coleta de fragmentos para o diagnóstico da doença, o (a) senhor (a) será submetido a um processo indolor em que uma escova será utilizada para captar as células da superfície do esôfago e assim permitir o diagnóstico. Todas as informações serão mantidas em segredo pelos pesquisadores. **Garantia de esclarecimento, liberdade de recusa e garantia de sigilo:** o Senhor/Senhora será esclarecido sobre esta pesquisa em tudo que desejar. O Senhor/Senhora é livre para recusar participar deste estudo e poderá retirar o seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. Isto não acarretará em qualquer alteração ou prejuízo no tratamento médico no Hospital de Câncer de Barretos. Sua identidade será mantida em sigilo completo e absoluto, não sendo revelado o seu nome (ou qualquer informação que possa identificá-lo publicamente) em hipótese alguma. Uma cópia deste consentimento informado será enviada aos arquivos do estudo e a outra será de sua posse. **Custos da participação, ressarcimento e indenização por eventuais danos:** a participação no estudo não acarretará custos e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional. Não há indenização monetária para este estudo.

DECLARAÇÃO DO PARTICIPANTE OU DO RESPONSÁVEL PELO PARTICIPANTE:

Eu, _____ fui informado dos objetivos da pesquisa acima, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e motivar minha decisão se assim o desejar.

O (A) _____ me explicou o estudo, respondeu minhas dúvidas e me certificou de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as todas as minhas dúvidas. Para sugestões, reclamações ou dúvidas, poderei contatar: 17-3321-6600, com Dr. Adhemar Longatto Filho, pesquisadores responsáveis pelo projeto no Hospital de Barretos (RAMAL 7075 e 7069), ou com o presidente do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos (RAMAL 6894).

Nome do (a) voluntário (a)

Assinatura do (a) voluntário (a)

Data: ____ / ____ / ____

Nome do Aplicador do Termo de Consentimento

Assinatura do Aplicador do Termo de Consentimento

Data: ____ / ____ / ____

Nome do (a) representante legal (grau de parentesco)

Assinatura do (a) representante legal

Data: ____ / ____ / ____

Quando esse termo for assinado pelo representante legal, precisará assinar também uma testemunha.

Nome da Testemunha

Assinatura da Testemunha

Data: ____ / ____ / ____

Anexo 4 - Instrumento de coleta de dados

1	Identificação	
2	Nome	
3	Registro hospitalar	
4	Grupo 1- Caso; 2- Controle	
INFORMAÇÕES GERAIS		
5	Data de nascimento DD-MM-AAAA	
6	Sexo 1- Feminino; 2- Masculino	
7	Qual a sua raça (cor da pele)? 1- Branco; 2- Negro; 3- Pardo ou Mulato; 4- Amarelo (Asiático); 5- Indígena	
8	Estado civil 1- Solteiro; 2- Casado / Amasiado; 3- Separado / Divorciado; 4- Viúvo	
9	Escolaridade 0- Analfabeto; 1- Sabe ler e escrever; 2- Ensino fundamental incompleto; 3- Ensino fundamental completo; 4- Ensino médio incompleto; 5- Ensino médio completo; 6- Ensino superior incompleto; 7- Ensino superior completo	
10	Ocupação / Profissão exercida por mais tempo ESPECIFICAR	
11	Ocupação / Profissão - Tempo ANOS	
12	Morou/Mora em zona rural 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	
13	Se sim, por quanto tempo? ANOS	
14	Exposição a pesticidas e inseticidas 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	
15	Morou/Mora em zona urbana 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	
16	Se sim, por quanto tempo? ANOS	
ESTILO DE VIDA		
17	<u>Álcool</u> 0- Nunca; 1- Sim, ainda bebe (se parou nos últimos 12 meses); 3- Só no passado	
18	<u>Cerveja</u> 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	
19	Idade de início ANOS	
20	Idade que parou ANOS	
21	Unidade 1- Copo pequeno – 50 ml; 2- Copo médio – 100 ml; 3- Copo grande – 250 ml½ ou garrafa pequena – 330 ml; 4- Garrafa – 700-750 ml; 5- Garrafa – 1 L	
22	Quantas unidades consome	
23	Por 1- Dia; 2- Semana; 3- Mês; 4- Ano	
24	<u>Vinho</u> 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	
25	Idade de início ANOS	
26	Idade que parou ANOS	
27	Unidade 1- Copo pequeno – 50 ml; 2- Copo médio – 100 ml; 3- Copo grande – 250 ml½ ou garrafa pequena – 330 ml; 4- Garrafa – 700-750 ml; 5- Garrafa – 1 L	
28	Quantas unidades consome	
29	Por 1- Dia; 2- Semana; 3- Mês; 4- Ano	

30	<u>Cachaça</u>	0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
31	Idade de início	ANOS	
32	Idade que parou	ANOS	
33	Unidade	1- Copo pequeno – 50 ml; 2- Copo médio – 100 ml; 3- Copo grande – 250 ml½ ou garrafa pequena – 330 ml; 4- Garrafa – 700-750 ml; 5- Garrafa – 1 L	
34	Quantas unidades consome		
35	Por	1- Dia; 2- Semana; 3-Mês; 4-Ano	
36	<u>Tabaco</u>	0- Não; 1- Sim, atualmente, 2- Sim, passado	
37	<u>Cigarro de filtro</u>	0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
38	Número por dia	NÚMERO	
39	Idade de início	ANOS	
40	Idade que parou	ANOS	
41	<u>Cigarro de palha</u>	0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
42	Número por dia	NÚMERO	
43	Idade de início	ANOS	
44	Idade que parou	ANOS	
45	<u>Cachimbo</u>	0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
46	Número por dia	NÚMERO	
47	Idade de início	ANOS	
48	Idade que parou	ANOS	
49	<u>Charuto</u>	0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
50	Número por dia	NÚMERO	
51	Idade de início	ANOS	
52	Idade que parou	ANOS	
EXPOSIÇÃO PASSIVA À FUMAÇA DE CIGARRO			
53	Você esteve casado (ou vivendo junto) com um fumante?	0- Não; 1- Sim; 2- Não lembra; 99-Ignorado	
54	Idade quando cônjuge iniciou		
55	Idade quando o cônjuge parou		
56	Número de horas que estava exposto durante a semana		
57	Número de horas que estava exposto aos fins de semanas		
58	Você trabalhou em um lugar fechado onde as pessoas fumassem?	0- Não; 1- Sim; 2- Não lembra; 99-Ignorado	
59	Idade quando iniciou o trabalho com fumantes		
60	Idade quando parou de trabalhar com fumantes		
61	Número de horas/dia que estava exposto		
62	Número de horas que fumava em sua presença		

63	Quando criança, seu pai ou sua mãe fumavam? 0- Não; 1- Sim; 2- Não lembra; 99-Ignorado	
64	Por quanto tempo foi exposto? ANOS	
65	<u>Pratica atividade física?</u> 0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
66	Se sim, qual a frequência por semana? 1 - 7	
67	Quanto tempo por dia? 0- Menos de 30'; 1- pelo menos 30'; 2- pelo menos 60'; 3- não lembra; 99-Ignorado	
68	<u>Faz exposição ao sol entre 10 da manhã e 16 h?</u> 0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
69	Se sim, usa roupa apropriada e protetor solar? 0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
HÁBITOS ALIMENTARES E MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS De maneira geral, com qual frequência você ingere...		
70	Legumes e verduras? 0- Nunca; 1- Menos que uma vez por mês; 3- 1-3 vezes por mês; 4- Uma ou duas vezes por semana; 5- Na maioria dos dias, mas não todos os dias; 6- Todos os dias	
71	Folhas e vegetais? 0- Nunca; 1- Menos que uma vez por mês; 3- 1-3 vezes por mês; 4- Uma ou duas vezes por semana; 5- Na maioria dos dias, mas não todos os dias; 6- Todos os dias	
72	Frutas frescas? 0- Nunca; 1- Menos que uma vez por mês; 3- 1-3 vezes por mês; 4- Uma ou duas vezes por semana; 5- Na maioria dos dias, mas não todos os dias; 6- Todos os dias	
73	Carne vermelha, ovo e leite 0- Nunca; 1- Menos que uma vez por mês; 3- 1-3 vezes por mês; 4- Uma ou duas vezes por semana; 5- Na maioria dos dias, mas não todos os dias; 6- Todos os dias	
74	Enlatados? 0- Nunca; 1- Menos que uma vez por mês; 3- 1-3 vezes por mês; 4- Uma ou duas vezes por semana; 5- Na maioria dos dias, mas não todos os dias; 6- Todos os dias	
75	Congelados? 0- Nunca; 1- Menos que uma vez por mês; 3- 1-3 vezes por mês; 4- Uma ou duas vezes por semana; 5- Na maioria dos dias, mas não todos os dias; 6- Todos os dias	
76	Grãos? (ex. milho) 0- Nunca; 1- Menos que uma vez por mês; 3- 1-3 vezes por mês; 4- Uma ou duas vezes por semana; 5- Na maioria dos dias, mas não todos os dias; 6- Todos os dias	
77	Bebidas quentes (Ex. Chimarrão, Café, Chá) 0- Nunca; 1- Sim, atualmente; 2- Sim, passado	
78	Peso KILOS	
79	Altura METROS	
HISTÓRICO DE HÁBITOS SEXUAIS		
80	Você já teve alguma doença sexualmente transmissível, diagnosticada por um médico ou profissional de saúde? 0- Não; 1- Sim; 2- Não sabe; 3- Não quer responder; 99-Ignorado	
81	Verrugas genitais? 0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
82	Herpes genital? 0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
83	Hepatite B? 0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
84	Hepatite C? 0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
85	HIV? 0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
86	HPV? 0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
87	Em toda a sua vida, você já teve relação sexual (vaginal, ou oral, ou anal) com alguém? 0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
88	Qual a idade da sua primeira relação sexual? ANOS	

89	Em toda a sua vida, com quantas pessoas você teve relação sexual? 1- 2-5; 2- 6-10; 3- 11-20; 4- 21-50; 5- 51-100; 6- Mais de 100; 99-Ignorado	
90	Você já fez sexo colocando sua boca nos genitais do(a) parceiro(a) (sexo oral ativo)? 0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
91	Quantos anos você tinha quando fez sexo oral em alguém pela primeira vez? ANOS	
92	Com que frequência você faz ou fazia sexo oral no(a) parceiro(a)? 0- Nunca; 1- Raramente; 2- Frequentemente; 3- Sempre; 99-Ignorado	
93	Qual era o sexo das pessoas em quem você fez sexo oral? 1- Mulheres; 2- Homens; 3- Homens e Mulheres; 88- Não se aplica; 99-Ignorado	
94	Você já fez sexo colocando sua boca no ânus do parceiro? 0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
95	Você já fez sexo colocando seus genitais na boca do parceiro (sexo oral passivo)? 0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
HISTÓRICO DE CÂNCER NA FAMÍLIA		
96	História de câncer de esôfago em familiares de 1º Grau (Pais, Irmãos e Filhos) 0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
97	História de câncer cabeça e pescoço na família 0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
98	História de câncer de esôfago na família 0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
99	História de câncer de colo de útero na família 0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
100	História de câncer de vulva na família 0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
101	História de câncer de pênis na família 0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
102	História de câncer anal na família 0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
COMORBIDADES		
103	Chagas 0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
104	Se sim, megaesôfago chagásico 0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
105	Refluxo gastresofágico 0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	
106	Esôfago de Barret 0- Não; 1- Sim; 99-Ignorado	

Anexo 5 - Instrumento de coleta de dados clínicos

DADOS CLÍNICOS		
1	Data do diagnóstico DD-MM-AAAA	
2	Grau histológico 1- Bem diferenciado; 2- Moderadamente diferenciado; 3- Pouco diferenciado; 99- Ignorado	
3	Estadiamento T 0- T0; 1- T1; 2- T2; 3- T3; 4- T4; 99- Tx	
4	Estadiamento N 0- N0; 1- N1; 99- Nx	
5	Estadiamento M 0- M0; 1- M1; 2- M1a; 3- M1b; 99- Mx	
6	Estadiamento TNM agrupado 0- 0; 1- I; 2- IIA; 3- IIB; 4- III; 5- IV; 6- IVA; 7- IVB; 99- Ignorado	

Anexo 6 - Artigo a ser submetido

O artigo referente a essa dissertação de mestrado está sendo formulado baseado nos resultados de detecção de HPV de alto risco pela metodologia Luminex e sua relação com a expressão das proteínas p53 e p16 e, será submetido à revista International Journal of Cancer, fator de impacto 5.007.