



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

ANA CLAUDIA LUNA CÂNDIDO

**Associação entre papiloma vírus humano e
câncer gástrico: *estudo genômico***

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Cirurgia.

Orientador

Dr. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

Prof. Associado do Depto. de Cirurgia, CCS-UFPE

Co-orientador

Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho

Diretor do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, LIKA

Linha de Pesquisa

Infecção cirúrgica

RECIFE/PE
2012

Catálogo na fonte
Bibliotecária Liliane Baltar, CRB4-506

C217a Cândia, Ana Cláudia Luna.
Associação entre papiloma vírus humano e câncer gástrico: estudo genômico / Ana Cláudia Luna Cândia. – Recife: O autor, 2012.
xiv + 44 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Álvaro Antônio Bandeira Ferraz.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, 2012.
Inclui bibliografia, apêndices e anexos.

1. Vírus. 2. Câncer. 3. Amostras parafinadas. 4. DNA. 5. L1-HPV. I. Ferraz, Álvaro Antônio Bandeira (Orientador). II. Título.

617.91 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2012-173)

**“ASSOCIAÇÃO ENTRE PAPILOMA VÍRUS HUMANO E CÂNCER GÁSTRICO:
ESTUDO GENÔMICO”.**

ANA CLÁUDIA LUNA CÂNDIDO

APROVADA EM: 04/09/2012

ORIENTADOR INTERNO: DR. ÁLVARO ANTÔNIO BANDEIRA FERRAZ

COMISSÃO EXAMINADORA

PROF. DR. EDMUNDO MACHADO FERRAZ – CCS-UFPE

PROF. DR. JOSEMBERG MARINS CAMPOS – CCS-UFPE

PROF. DR. EUCLIDES DIAS MARTINS FILHO – CCS-UFPE



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

REITOR

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Sílvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Francisco de Souza Ramos

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DIRETOR

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DIRETOR SUPERINTENDENTE

Prof. George da Silva Telles

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
CHEFE

Prof. Salvador Vilar Correia Lima

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA
NÍVEL MESTRADO E DOUTORADO

COORDENADOR

Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

VICE-COORDENADOR

Prof. José Lamartine de Andrade Aguiar

CORPO DOCENTE

Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

Prof. Carlos Teixeira Brandt

Prof. Cláudio Moura Lacerda de Melo

Prof. Edmundo Machado Ferraz

Prof. Fábio de Oliveira Vilar

Prof. Fernando Ribeiro de Moraes Neto

Prof. José Lamartine de Andrade Aguiar

Prof. Josemberg Marins Campos

Profa. Magdala de Araújo Novaes

Prof. Salvador Vilar Correia Lima

Prof. Sílvio Caldas Neto

NORMATIZAÇÃO

International Committee of Medical Journals Editors

Esta dissertação obedeceu às normas do International Committee of Medical Journals Editors – ICMJE – através do endereço eletrônico: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=journals>. Conhecido também como estilo Vancouver

Dedico esta Tese

A minha *mãe, irmãs e irmãos*
que merecem muito mais do que cada simples
palavra que eu poderia escrever.

Agradecimentos

Ao *Prof. Dr. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz* e ao *Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho*, minha gratidão ao apoio e estímulo durante a orientação deste trabalho.

A *Daniela Brunaska* e *Chirleane*, pela paciência e colaboração durante o processo de extração e análise do DNA parafinado.

A *Dra Christine Marques de Miranda*, pelo apoio e amizade durante toda a pesquisa.

A *Dra Angelita Habr-Gama*, não apenas pela enriquecedora oportunidade de convivência e admiração, mas também pela pronta disponibilidade de sempre contribuir com apoio, orientação e simplicidade.

Ao *Dr. Adonis de Carvalho* e *Dra. Maria do Carmo*, pela credibilidade no estudo, disponibilidade e competência na análise dos blocos parafinados.

A *Márcia* e *Mércia Araújo*, pela amizade e valiosa ajuda na diagramação desta tese.

A *Marluce*, por sempre se mostrar disponível e prestativa na identificação dos prontuários.

Aos *pacientes*, por viabilizarem esta pesquisa.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Apresentação do problema.....	01
1.2 Objetivos.....	05
1.2.1 Geral.....	05
1.2.2 Específicos.....	05
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	06
2.1 Casuística e local do estudo.....	06
2.2 Critérios de inclusão.....	06
2.3 Critérios de exclusão.....	06
2.4 Caracterização da amostra.....	07
2.5 Procedimentos.....	08
2.5.1 Procedimentos técnicos.....	08
2.5.1.1 <i>Extração de DNA de sangue humano.....</i>	<i>08</i>
2.5.1.2 <i>Extração de DNA de material parafinado e endoscópico.....</i>	<i>08</i>
2.5.1.3 <i>PCR para gene da região L1-HPV 16.....</i>	<i>08</i>
2.5.2 Procedimentos analíticos.....	10
2.5.3 Procedimentos éticos.....	10
3. RESULTADOS.....	11
3.1 Achados nas amostras parafinadas de pacientes com câncer gástrico.....	11
3.2 Achados nos controles endoscópicos da mucosa gástrica.....	14
3.3 Achados nas amostras de sangue do grupo controle.....	15
4. DISCUSSÃO.....	19
5. CONCLUSÃO.....	22
REFERÊNCIAS.....	23

APÊNDICES	26
APÊNDICE A – Protocolo Câncer Gástrico e HPV.....	26
APÊNDICE B – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	28
APÊNDICE C – Questionário – controles.....	29
APÊNDICE D – Trabalho enviado e produzido segundo as Instruções aos autores “CYTOLOGY and HISTOLOGY”	30
ANEXOS	43
ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	43
ANEXO B – Carta de Aceito da Revista Cytology and Histology.....	44

Lista de Abreviaturas e Siglas

Água Milli-Q	água deionizada que foi purificada em um sistema milli-Q
Cg	câncer gástrico
Dna	ácido desoxirribonucleico
Eluição	separação, fracionamento
Hpv	papiloma vírus humano
L1-Hpv	proteína do capsídeo do HPV
Min.	minutos
Qiaamp DNA FFPE Tissue	kit para purificação do DNA de amostras parafinadas
Overnight	durante a noite
Pb	pares de bases
Pcr	reação de polimerização em cadeia
Pellet	concentrado de material biológico
Plasmídeo	moléculas circulares duplas de DNA capazes de se reproduzirem independentemente do dna cromossômico
Primers	segmento de ácido nucléico necessários para o início da replicação do DNA
Proteinase K	enzima utilizada para digerir proteínas e remover contaminações de preparações de ácido nucléico
P53	gene supressor tumoral que regula a parada do ciclo celular e apoptose
Rb	gene supressor tumoral que regula o ciclo celular
Rpm	rotação por minuto
Software SPSS	<i>statistical package for the social science</i>
Tampão AL	solução tampão de cloridrato de guanidina 25-50%
Tampão ATE	solução Tampão de ácido etilenodiaminico tetra-acético
Tampão ATL	solução tampão de ácido edético e lauril sulfato de sódio
Tampão AW1	solução tampão de cloridrato de guanidina 50-100%
Tampão AW2	solução tampão de azida de sódio (nan3)
Vórtex	movimentos circulares rápidos
µl	microlitro
µm	micrometro
(V/V)	proporção volume/volume
(P/V)	proporção peso/ volume

Lista de Tabelas

Tabela 1	Avaliação do HPV (Parafina) segundo a faixa etária, sexo, tipo de cirurgia, tipo histológico e diferenciação.....	26
Tabela 2	Avaliação da presença do HPV (parafina) segundo o grupo....	29
Tabela 3	Avaliação do HPV (Parafina) no grupo controle segundo a faixa etária, sexo, HPV no sangue periférico e prévio, DST, hábito do tabagismo e etilismo, suplementos vitamínicos, dieta rica em fibras e sal.....	30

Lista de Figuras

Figura 1	Representação esquemática do genoma do HPV mostrando o arranjo dos genes precoces ou não estruturais E, os genes do capsídeo (L1 e L2) e a região regulatória superior – URR..	15
Figura 2	Gel de agarose 1% com DNA extraído de tecido gástrico parafinizado pelo kit Qiamp FFPE.....	23
Figura 3	Gel de agarose 1% apresentando o produto de PCR para o gene da beta-actina (135pb) realizado a partir das amostras de DNA extraído de tecido gástrico parafinizado.....	23
Figura 4	Gel de agarose 1% apresentando o produto de PCR para o gene L1 de HPV amplificado pelo primer GP5+/6+ (150pb) realizado a partir das amostras de DNA extraído de tecido gástrico parafinizado.....	24
Figura 5	Gel de agarose 1% apresentando o produto de PCR para o gene L1 de HPV com primer MY09/11 (500pb) realizado a partir das amostras de DNA extraído de tecido gástrico parafinizado.....	24
Figura 6	Gel de agarose 1% com DNA extraído de biópsia gástrica pelo kit Qiamp FFPE.....	26
Figura 7	Gel de agarose 1% apresentando o produto de PCR para o gene da beta-actina (135pb) realizado a partir das amostras de DNA extraído de biópsia gástrica.....	26
Figura 8	Gel de agarose 1% apresentando o produto de PCR para o gene L1 de HPV com primer MY09/11 (450pb) realizado a partir das amostras de DNA extraído de biópsia gástrica.....	27
Figura 9	Gel de agarose 1% com DNA extraído de sangue pelo kit Wizard genomic DNA (Promega).....	27
Figura 10	Gel de agarose 1% com 3ul de DNA extraído de sangue pelo kit Wizard genomic DNA (Promega) e precipitado com etanol.	28
Figura 11	Gel de agarose 1% apresentando o produto de PCR para o gene da beta-actina (135pb) realizado a partir das amostras de DNA extraído de sangue.....	28
Figura 12	Gel de agarose 1% apresentando o produto de PCR para o gene L1 de HPV amplificado pelo primer GP5+/6+ (155pb) realizado a partir das amostras de DNA extraído de sangue.	29

Resumo

Introdução: O *Papiloma Vírus Humano* - HPV é um dos mais importantes vírus relacionados com a carcinogênese, já sendo conhecido seu papel na gênese do carcinoma cervical uterino. A maioria dos casos de câncer gástrico está relacionada a um agente infeccioso: *Helicobacter Pylori*. Outros agentes infecciosos como os vírus *Epsten-Barr* e HPV são relatados associados ao câncer gástrico. **Objetivo:** Este estudo visa investigar a associação do HPV em pacientes com câncer gástrico e comparar a um grupo controle sem neoplasia. **Método:** Foram analisadas 40 amostras parafinadas provenientes de portadores de câncer gástrico e 40 amostras de pacientes do grupo controle submetidos à endoscopia e biópsia de mucosa gástrica normal e sangue periférico, no período de 2008 a 2009. O material coletado foi examinado por Reação de Cadeia de Polimerase - PCR para gene da região L1-HPV. O DNA extraído foi amplificado em dois sistemas de reação utilizando-se dois pares de primers: MY09/MY11 (fragmento de 450pb) e GP+5/GP+6 (fragmento de 150pb). Foi utilizada água Mili-Q como controle negativo da reação, sendo o controle positivo uma mistura de 01µL de sangue humano acrescido de 0,25µL de plasmídeo p BR322(HPV16). **Resultados:** Foram identificados em quatro pacientes com CG a presença de HPV associado à mucosa tumoral, nos pacientes sem neoplasia gástrica foram identificados 10 casos de HPV associado à mucosa gástrica. **Conclusão:** No presente estudo não encontramos indícios de associação significativa do HPV ao câncer gástrico ($p=0,077$).

Descritores: vírus; câncer; amostras parafinadas; DNA; L1-HPV.

Abstract

Introduction: HPV is regarded as one of the most important tumor-related viruses, which are known to have a role in cervical carcinoma. Most cases of gastric cancer (GC) are caused by an infection agent: *Helicobacter pylori*. Other infection agents like *Epstein-Barr* virus and *Papillomavirus* are linked to gastric cancer. Several studies have been done and have conflicted results regarding the association of GC with HPV. **Objective:** This study aimed to investigate the prevalence of Human Papillomavirus – HPV in patients with gastric cancer and compare with a control group. **Method:** Forty paraffin samples of gastric cancer and forty endoscopic normal mucosa and peripheral blood controls were subjected to examination by Polymerase Chain Reaction (PCR) for the L1 gene of HPV. The extracted DNA was amplified in two reaction systems using two pairs of primers: MY09/MY11 and GP+5/GP+6. We used Milli-Q water as negative control and a mixture of 01 μ l of human blood plus 0,25 μ l of plasmid pBR322 (HPV16) as positive control. **Results:** HPV was found in four patients with gastric cancer and ten patients without cancer. **Conclusion:** There was no statistical significance difference between the two samples ($p=0,077$).

Key words: virus; cancer; prevalence, paraffin samples, DNA.



1.1 Apresentação do problema

No mundo, o câncer gástrico configura-se como a quarta causa mais comum, e em termos de mortalidade é a segunda causa de óbitos por câncer. No Brasil, ano de 2008, foram estimados 21800 novos casos desta doença com um risco estimado de 15 novos casos para cada 100 mil habitantes do sexo masculino e de oito para cada 100 mil habitantes do sexo feminino. No estado de Pernambuco o câncer gástrico é o terceiro mais frequente na população masculina com taxas estimadas de incidência de 420 novos casos (10/100.000), sendo 90 na capital (12,83/100.000), na população feminina é o quinto mais frequente com taxas estimadas de incidência de 280 novos casos (6,22/100.000), sendo 80 destes na capital (9,11/100.000). Em geral, sua magnitude é de duas a três vezes maior nos países em desenvolvimento^{1,2}.

A maioria dos casos de câncer gástrico está relacionada a um agente infeccioso: *Helicobacter Pylori* (*H. pylori*). Normalmente a acidez gástrica preveniria a sobrevivência de vírus, bactérias ou outros micro-organismos, no entanto o *H. pylori* secreta uma enzima chamada uréase responsável por converter a ureia em amônia reduzindo a acidez gástrica e deste modo tornando o meio permissivo a agentes infecciosos. O *H. pylori* coexiste com humanos por milhares de anos, no entanto, como havia uma crença que o estômago era um órgão estéril esta bactéria não foi descoberta até 1980. O *H. pylori* foi observado pela primeira vez em 1979 pelo médico Australiano Berry Marshal em estômagos de pacientes com úlceras. Ele continuou as pesquisas com o patologista John Robin Warren. Como teve dificuldade na construção de um modelo animal ele se autoinfectou com a bactéria e publicou o resultado da autoindução da infecção em 1985. Marshal e Warren receberam o Premio Nobel da medicina em 2005 pela descoberta do *H. pylori* e sua implicação na úlcera gástrica.

A infecção humana com o *H. pylori* é comum, sendo estimado que aproximadamente 2/3 da população mundial são portadores da bactéria. Havendo taxas de infecção maior em países em desenvolvimento. A presença da infecção pelo *H. pylori* não está diretamente associada como a patogênese do câncer

gástrico, mas atua como um carcinógeno que promove o dano da mucosa e com isto a torna mais susceptível ao desenvolvimento e progressão do câncer gástrico³⁻⁵.

A diminuição na incidência de câncer gástrico tem sido observada em vários países, e pode ser explicada por reduções dos fatores de risco. Estratégias para a prevenção do câncer gástrico incluem melhorias no saneamento básico, mudanças no estilo de vida da população, modificação do consumo alimentar (aumento da ingestão de frutas, legumes e verduras, redução do uso do sal, melhores métodos de conservação alimentar), bem como atitudes individuais como não fumar e manutenção do peso corporal¹.

Programas de erradicação de *H. pylori* em larga escala, por meio do uso de antibióticos específicos, têm mostrado efetividade questionável; além disso, ocorre o fato de que um número grande de indivíduos tem a infecção, contudo apenas uma parcela pequena deles desenvolverá câncer. Conforme a Organização Mundial de Saúde, desde 1994 o *H. pylori* é considerado um carcinógeno semelhante ao cigarro e ao álcool^{1, 2}.

A razão mortalidade/ incidência do câncer gástrico é consideravelmente alta em todas as partes do mundo. Sendo a sobrevida em cinco anos, considerada baixa, cerca de 20% na maioria dos países. No Japão a sobrevida é cerca de 60%. Essa diferença encontrada pode ser explicada por existir programas de rastreamento populacional, sistemas de diagnósticos e tratamentos bem estruturados, uma vez que o país tem altíssimas taxas de incidência da doença².

O adenocarcinoma gástrico é uma doença genética resultante de alterações progressivas nos genes responsáveis por controlar a proliferação, diferenciação e morte das células da mucosa do estômago. O modelo mais estudado atualmente é o da metilação do DNA, por ser capaz de alterar a expressão protéica do gene e preservar a sequência de bases após sucessivas divisões celulares, permitindo desta forma o acúmulo de lesões no genoma, que por sua vez favorece alterações na sequência dos pares de DNA^{6, 7}.

Globalmente é estimado que 20% de todas as neoplasias estejam relacionadas com algum agente infeccioso^{8, 9}. Os mecanismos genéticos envolvidos na iniciação e progressão do câncer ainda não são bem conhecidos, sendo que os processos relativos às alterações que ocorrem na cromatina durante a transformação celular e eventual interação com agentes ambientais também apresentam aspectos obscuros. Neste sentido, o papiloma vírus se resalta no

contexto da literatura atual devido a sua relevância na oncogênese, não só por estar ligado como agente causal de neoplasias de alta incidência, mas também por ter sua ação associada à interação com fatores ambientais, podendo ser considerado excelente modelo para estudo de interação com a cromatina hospedeira ⁸⁻¹¹.

O HPV são vírus não-envelopados com capsídeos icosaédricos e que têm seu genoma circular constituído por DNA dupla fita organizado em região codificadora e região não codificadora. Na região codificadora de todos os papiloma vírus, podemos identificar oito regiões denominadas precoces (ORFs – open reading frames E1-E8) e duas tardias (ORFs – L1-L2). As precoces (E1-E8) codificam proteínas que interagem com o genoma hospedeiro produzindo novo DNA viral; as tardias (L1-L2) são ativadas apenas após replicação viral e codificam proteínas do capsídeo viral. Todos os papiloma vírus são organismos obrigatórios intranucleares. Devido à ausência de um gene da polimerase a replicação do genoma viral depende do estímulo da síntese do DNA da célula hospedeira ¹¹⁻¹³.

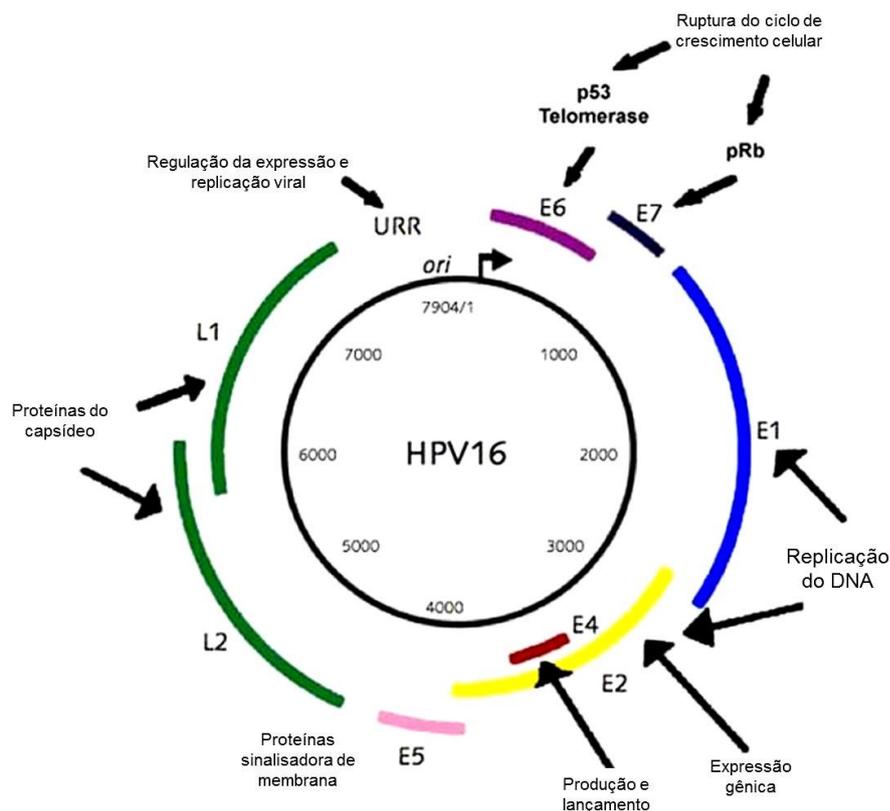


Figura 1. Representação esquemática do genoma do HPV mostrando o arranjo dos genes precoces ou não estruturais E, os genes do capsídeo (L1 e L2) e a região regulatória superior – URR.

Para ocorrer transformação maligna, eventos adicionais genéticos e epigenéticos são necessários incluindo expressão desregulada dos oncogenes virais E6 e E7 promovendo instabilidade genética e alteração na regulação dos genes hospedeiros com subsequente crescimento tumoral¹².

Na maioria dos carcinomas cervicais o HPV está integrado ao DNA no genoma do hospedeiro resultando na perda da expressão do gene E2 viral, que é um repressor da transcrição dos genes E6 e E7. Deste modo fica aumentado a expressão dos genes E6 e E7 que são oncoproteínas virais¹³⁻¹⁵.

Tem sido evidenciado que as proteínas E6 e E7 de HPV de alto risco imortalizam células *in vitro* e provoca tumorações em pele de animais transgênicos^{14,16}. As proteínas do vírus HPV têm como alvos supressores tumorais resultando em perda de controle da replicação celular. A proteína E6 está relacionada ao p53 e a E7 ao Rb. Elas atuam no ciclo celular inibindo a apoptose^{17,18}. A E6 através da ubiquitina ligase forma um complexo que destrói o p53 associado a isto também atua induzindo a atividade da telomerase e imortalização celular. A habilidade das proteínas E6 e E7 no processo de imortalização das células humanas são sinérgicas¹⁴⁻¹⁹.

Cerca de 130 tipos do papiloma vírus humano já foram identificados, dentre os quais infectam epitélios cutâneos e mucosos da região anogenital, das mãos, dos pés, da orofaringe e região gástrica²⁰.

Os tipos virais do papiloma vírus humano são classificados como: alto, médio e baixo risco. Os genótipos de alto risco são caracterizados por estarem associados ao desenvolvimento de câncer, inclusive o câncer gástrico e cervical (HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33 e HPV-45)²⁰⁻²².

O câncer gástrico é uma das principais causas de óbitos em todo mundo e sua heterogeneidade e variabilidade de incidência geográfica o transforma em modelo interessante para estudos em carcinogênese^{1,2}.

Vários estudos foram feitos e têm resultados contraditórios com relação à associação do câncer gástrico ao HPV^{20, 23-26}.

A maioria das lesões causadas pela infecção por HPV são passageiras e regridem espontaneamente após alguns meses podendo, porém evoluir com transformação maligna. Cofatores podem influenciar nessa evolução, tais como: o consumo de álcool, tabagismo, promiscuidade^{9,10,19}.

O presente estudo visa avaliar a associação de HPV em pacientes portadores de câncer gástrico no estado de Pernambuco, a fim de aumentar o conhecimento existente nesta área e viabilizar novas possibilidades de otimização no tratamento desta doença, haja vista a alta morbimortalidade do câncer gástrico e tendo o conhecimento que neoplasias associadas ao HPV tem comportamento biológico tumoral diferente do usual, como maior sensibilidade a radioterapia.

1.2 Objetivos

1.2.1 Geral

Avaliar a associação do HPV em portadores de câncer gástrico atendidos no Hospital do Câncer de Pernambuco.

1.2.2 Específicos

Identificar a presença do HPV em 40 amostras de neoplasias gástricas parafinadas através de técnica de PCR;

Identificar a existência de HPV associada à biópsia parafinada da mucosa gástrica de 40 pacientes sem neoplasia identificada ao exame endoscópico para utilização como grupo controles;

Identificar a presença de sequências de DNA do HPV no sangue periférico dos pacientes do grupo controle.

MATERIAIS E MÉTODOS



2.1 Casuística e local do estudo

Foram coletadas 40 amostras parafinadas de pacientes com câncer gástrico do Hospital do Câncer de Pernambuco (HCP), no período de maio de 2008 até maio de 2009 (grupo caso) e quarenta amostras de pacientes sem câncer (grupo controle) submetidos à endoscopia com biópsias de mucosa gástrica normal. Foram coletadas 40 amostras de sangue periférico do grupo controle as quais foram analisadas e extraídas o DNA.

A análise molecular foi realizada no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA - da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

2.2 Critérios de inclusão

- Pacientes submetidos a procedimento cirúrgico para tratamento do câncer gástrico no HCP seja de forma curativa ou paliativa com amostra neoplásica parafinada de boa qualidade;
- Pacientes submetidos a procedimento endoscópico sem achado neoplásico.

2.3 Critérios de exclusão

- Pacientes cujas amostras parafinadas se apresentavam danificadas;
- Pacientes do grupo controle com cirurgia gástrica prévia;
- Pacientes do grupo controle com passado de neoplasia;
- Paciente do grupo controle em uso de corticosteroides ou imunossupressores cronicamente.

2.4 Caracterização da amostra

A média de idade dos pacientes portadores de câncer gástrico foi de 60,73 (DP: 12,33) e mediana de 62,5. Houve predomínio no sexo masculino 27 (67,5%) pacientes em relação ao feminino 32,5% (13 pacientes).

Foram realizadas 31 (77,5%) cirurgias com intenção curativa e nove (22,5%) com finalidade paliativa. O tipo histopatológico mais frequente foi o adenocarcinoma em 27 (67,5%) pacientes sendo os demais classificados com carcinoma (32,5%). Com relação ao grau de diferenciação histopatológico 25 (62,5%) pacientes foram classificados como mal diferenciado, quatro (10,0%) pacientes foram moderadamente diferenciado e 11 (27,5%) pacientes diferenciado. Nos 31 pacientes submetidos a procedimento com intenção curativa, a média de linfonodos dissecados foi de 18 sendo a média de linfonodos positivos para neoplasia neste grupo de 4,87.

Os nove pacientes submetidos a procedimento paliativo foram a óbito no seguimento de um ano, os submetidos à cirurgia com intenção curativa 24 (77,4%) estão em seguimento e sete (22,6%) evoluíram com óbito no período de um ano.

A análise retrospectiva dos prontuários de pacientes com câncer gástrico para pesquisa do *H. pylori* evidenciou ausência da bactéria em 14 pacientes, presença em 05 pacientes e não foram identificados registros nos demais 21 pacientes.

Os pacientes do grupo controle foram escolhidos de forma aleatória, por conveniência, sendo selecionados entre os pacientes que fizeram exames endoscópicos no Hospital Agamenon Magalhães – HAM, no período entre 2008 a 2009.

A idade média dos pacientes utilizados como controle foi de 53,35 (DP: 15,25) e mediana de 56. Houve predomínio do sexo feminino, 30 (75%) pacientes. Quando questionados verbalmente 19 (47,5%) pacientes afirmaram passado de DST.

2.5 Procedimentos

2.5.1 Procedimentos técnicos

2.5.1.1 *Extração de DNA de sangue humano*

Para extração de DNA de sangue periférico utilizou-se o kit genômico Wizard (Promega Bio Sciences, LLC. San Luis Obispo, CA, USA.) seguindo as normas do fabricante²⁷.

Para um volume de 300 µL de sangue total, 900µL de solução de lise celular foram adicionados e misturados por inversão. A mistura foi incubada a temperatura ambiente por 10 min. e posteriormente centrifugada (14000rpm, 1 min.) sendo o sobrenadante descartado. Ao pellet formado, adicionaram-se 300 µL de solução de lise nuclear seguido de mistura por inversão. Adicionou-se, também, 100 µL de solução de precipitação de proteínas e misturou-se em vórtex por 20 segundos. Após este período a mistura foi centrifugada por 3 min. a 14000 rpm. O sobrenadante formado foi então transferido a um novo tubo contendo 300 µL de isopropanol, homogeneizado e centrifugado (14000 rpm, 1min.), sendo o sobrenadante descartado. Etanol 70% (300 µL) foi adicionado ao pellet e seguiu-se uma nova centrifugação. O etanol foi aspirado e o pellet formado seco a temperatura ambiente por 15 minutos. O DNA precipitado foi re-hidratado através da adição de 100 µL de solução de re-hidratação e incubado a 65°C por 1 hora. Após a extração o DNA foi armazenado a -20°C.

2.5.1.2 *Extração de DNA de material parafinado e endoscópico*

O protocolo para extração de DNA a partir de material parafinado foi realizado utilizando-se o kit comercial QIAamp DNA FFPE Tissue (QIAGEN Biotecnologia Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brasil) de acordo com as normas do fabricante²⁸.

Dos blocos parafinizados foram obtidos 10 a 15 cortes histológicos de 2 µm, os quais foram misturados a 180 µL de tampão ATL e 20 µL de solução de proteinase K, seguido de incubação overnight a 56°C, sob leve agitação. Posteriormente, adicionaram-se a amostra 400 µL de tampão AL e etanol (1:1 v/v) e homogeneizou-se vigorosamente. O lisado foi cuidadosamente transferido para uma coluna acoplada a tubo de dois mililitros. Realizou-se uma centrifugação (8000 rpm,

1 min.) e o filtrado foi descartado. A coluna foi lavada em duas etapas, utilizando-se 500 µL dos tampões AW1 e AW2, separadamente. Em cada etapa realizou-se uma centrifugação (8000 rpm, 1 min.) sendo o filtrado foi descartado. Ao final da 2ª lavagem uma nova centrifugação foi realizada (14000 rpm, 3 min.). A eluição do DNA ligado à coluna foi realizada se adicionado 50 µL de tampão ATE e incubando-se à temperatura ambiente por 10 min, seguida de centrifugação (14.000 rpm, 1 min.); esta etapa foi repetida 2 vezes, os eluídos foram misturados e armazenados a -20°C para análise posterior. As amostras fixadas em formol também foram submetidas a estas mesmas etapas de procedimento.

2.5.1.3 PCR para gene da região L1-HPV 16

O DNA extraído foi amplificado em dois sistemas de reação utilizando-se dois pares de primers: MY09/MY11 (fragmento de 450 pb) e GP+5/GP+6 (fragmento de 150 pb). As condições da PCR foram: desnaturação inicial por 3 min. a 94°C, seguido de 34 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 55°C (MY09/MY11) ou 45°C (GP+5/GP+6) por 1 min e extensão a 72°C por 1 min. A etapa de extensão final foi realizada a 72°C por 10 min. Para ambas as reações utilizou-se água Mili-Q como controle negativo da reação, sendo o controle positivo uma mistura de 01µL de sangue humano acrescido de 0,25 µL do plasmídeo pBR322 (HPV-16). A reação foi realizada em termociclador Eppendorf utilizando-se os reagentes descritos no quadro 1. O sucesso da amplificação foi verificado por eletroforese em gel de agarose 2% (p/v), corado em brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta.

Quadro 1 - Volumes dos componentes da PCR para região L1-HPV

Componentes	Volume
Solução tampão 10x (10mM)	1,25 µL
MgCl ₂ (50mM)	1,25 µL
dNTP	1,80 µL
TAQ	0,09µL
Primers (10 picomoles)	2 µL
DNA	2 µL
Água	16,61 µL

2.5.2 Procedimentos analíticos

A análise estatística foi realizada utilizando o software SPSS 11.5 para Windows. A expressão dos resultados das variáveis qualitativas foi demonstrada através da análise das frequências utilizando o teste do qui-quadrado de Pearson, nas variáveis quantitativas pela análise das medias e desvio padrão utilizando o teste Exato de Fisher com intervalo de confiança de 95%.

2.5.3 Procedimentos éticos

O estudo é uma pesquisa original, retrospectiva, foi aceito pelo Comitê de Ética em Pesquisa. Número de registro: 446/2007 (ANEXO A). Foram avaliados os prontuários de todos os pacientes com câncer gástrico de forma retrospectiva conforme protocolo para pesquisa (Apêndice A).

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Agamenon Magalhães em reunião no dia 13/12/2007 (ANEXO A).

Os pacientes do grupo controle concordaram em participar do estudo, sendo utilizado um termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE B). Após serem incluídos na pesquisa os pacientes foram submetidos ao questionário proposto pelo presente trabalho (Apêndice C).

RESULTADOS



3.1 Achados nas amostras parafinadas de pacientes com câncer gástrico

Foram obtido material, DNA, adequado para amplificação pela PCR nas quarenta amostras parafinadas dos pacientes com câncer gástrico submetido à extração (figura 2). Foi realizado PCR para o gene da beta actina nas quarenta amostras como controle para a PCR para a identificação do HPV (figura 2).

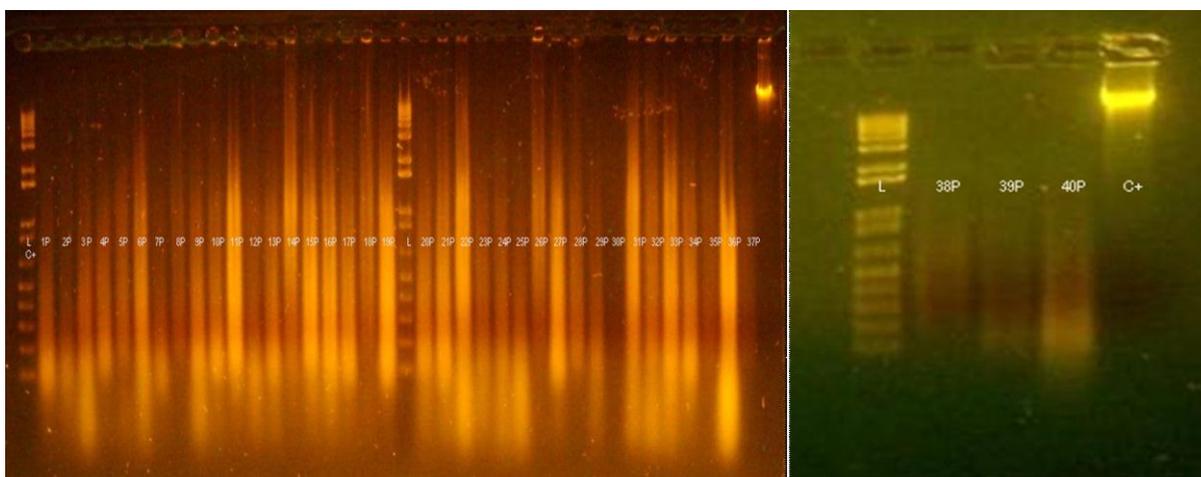


Figura 2. Gel de agarose 1% com DNA extraído de tecido gástrico parafinizado pelo kit Qiamp FFPE. O padrão de peso molecular está representado pela letra L (Ladder 1Kb plus – Invitrogen).

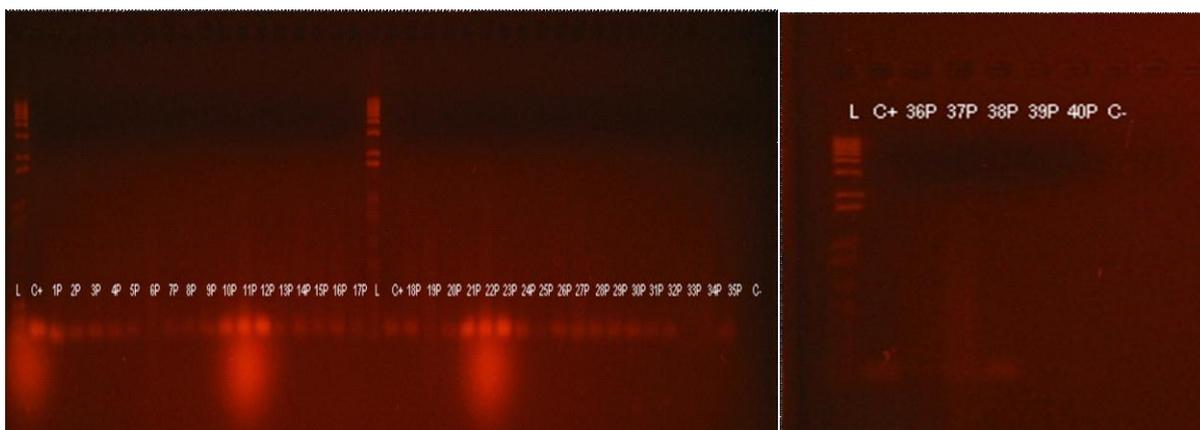


Figura 3. Gel de agarose 1% apresentando o produto de PCR para o gene da beta-actina (135pb) realizado a partir das amostras de DNA extraído de tecido gástrico parafinizado. O padrão de peso molecular está representado pela letra L (Ladder 1Kb plus – Invitrogen). O controle positivo (C+) é corresponde à extração de DNA realizada em amostra de sangue. O controle negativo (C-) é referente à reação de PCR contendo água em igual volume à amostra.

Dos 40 pacientes com câncer gástrico o produto da PCR para o gene L1 amplificado pelo primer GP+5/GP+6 (150pb) e pelo primer MY 09/11 (500pb) identificou em quatro amostras (10%) HPV associado à mucosa tumoral (figuras 3 e 4 respectivamente).

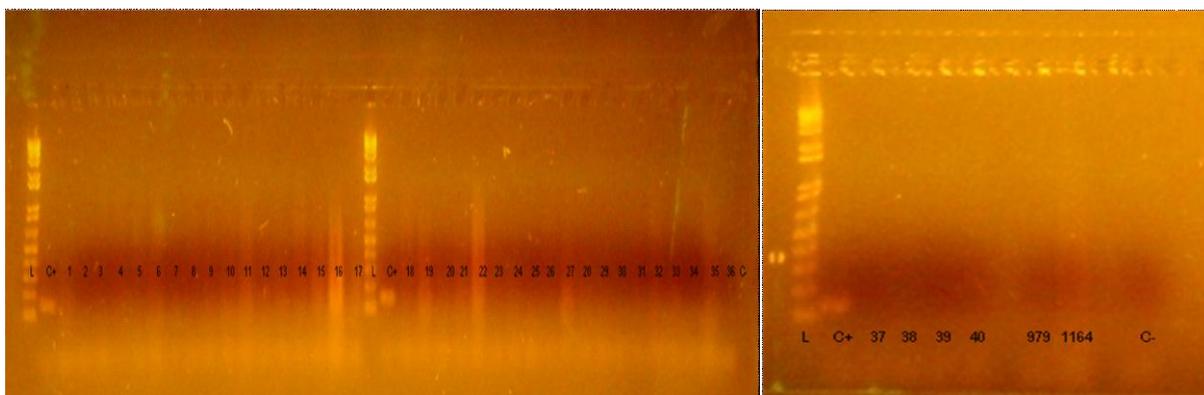


Figura 4. Gel de agarose 1% apresentando o produto de PCR para o gene L1 de HPV amplificado pelo **primer GP5+/6+** (150pb) realizado a partir das amostras de DNA extraído de tecido gástrico parafinado. O padrão de peso molecular está representado pela letra L (Ladder 1Kb plus – Invitrogen). O controle positivo (C+) é corresponde a extração de DNA realizada em amostra de sangue. O controle negativo (C-) é referente à reação de PCR contendo água em igual volume à amostra.

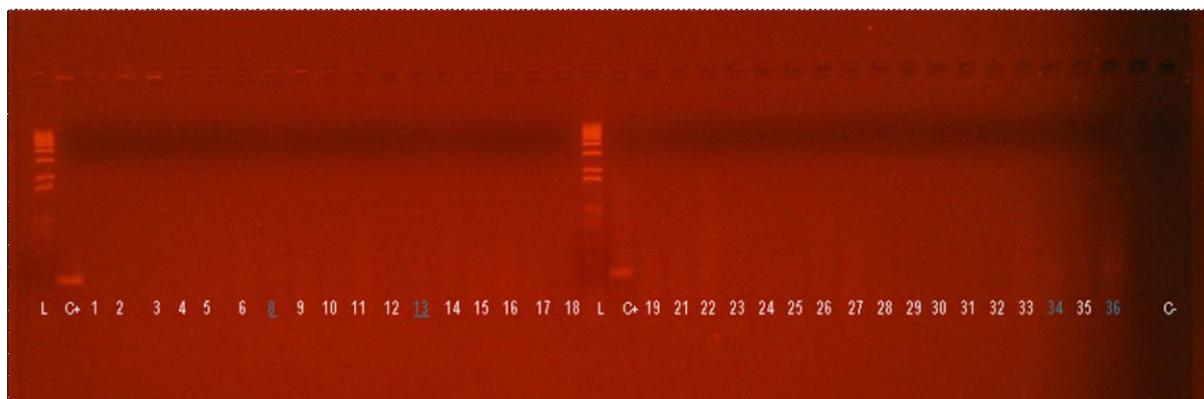


Figura 5. Gel de agarose 1% apresentando o produto de PCR para o gene L1 de HPV com **primer MY09/11** (500pb) realizado a partir das amostras de DNA extraído de tecido gástrico parafinado. O padrão de peso molecular está representado pela letra L (Ladder 1Kb plus – Invitrogen). O controle positivo (C+) é corresponde à extração de DNA realizada em amostra de sangue. O controle negativo (C-) é referente à reação de PCR contendo água em igual volume à amostra. Possíveis amostras positivas: 8, 13, 34 e 36.

Os quatro pacientes com HPV relacionados à neoplasia gástrica foram do tipo histopatológico carcinoma ($p=0,008$) sendo dois indiferenciados e dois mal diferenciados ($p=0,049$). Não sendo encontrada outras associações significantes na amostra examinada (tabela 1).

Tabela 1. Avaliação do HPV nas amostras parafinadas dos pacientes com câncer gástrico segundo a faixa etária, sexo, tipo de cirurgia, tipo histológico e diferenciação.

Variável	HPV – Parafina				Total		Valor de p	
	Sim		Não		n	%		
	n	%	n	%	n	%		
• Faixa etária								
Até 49	1	10,0	9	90,0	10	100,0	$p^{(1)} = 1,000$	
50 ou mais	3	10,0	27	90,0	30	100,0		
• Sexo								
Masculino	3	11,1	24	88,9	27	100,0	$p^{(1)} = 1,000$	
Feminino	1	7,7	12	92,3	13	100,0		
• Tipo de cirurgia								
Gastrectomia total	2	13,3	13	86,7	15	100,0	$p^{(1)} = 0,314$	
Gastrectomia subtotal	-	-	12	100,0	12	100,0		
Gastroenteroanastomose	2	40,0	3	60,0	5	100,0		
Gastrectomia total + Esplenectomia	-	-	2	100,0	2	100,0		
Gastrectomia total + Colecistectomia	-	-	1	100,0	1	100,0		
Irressecáveis	-	-	4	100,0	4	100,0		
Gastrectomia subtotal + Colecistectomia	-	-	1	100,0	1	100,0		
• Tipo histológico								
Carcinoma	4	30,8	9	69,2	13	100,0		$p^{(1)} = 0,008^*$
Adenocarcinoma	-	-	27	100,0	27	100,0		
• Diferenciação								
Indiferenciado	2	66,7	1	33,3	3	100,0	$p^{(1)} = 0,049^*$	
Bem	-	-	11	100,0	11	100,0		
Medianamente	-	-	4	100,0	4	100,0		
Mal	2	9,1	20	90,9	22	100,0		
Grupo Total	4	10,0	36	90,0	40	100,0		

(*): Diferença significativa a 5,0% (1): Através do teste Exato de Fisher.

3.2 Achados nos controles endoscópicos da mucosa gástrica

Foi obtido material, DNA, adequado para amplificação pela PCR nas quarenta amostras submetidas à extração (figura 6). Foi realizado PCR para o gene da beta actina nas quarenta amostras como controle para a PCR para a identificação do HPV (figura 7).

Dos 40 pacientes do grupo controle, em parafina, o produto da PCR para o gene L1 amplificado pelo primer MY 09/11 (450pb) identificou em dez amostras (25%) HPV associado à mucosa gástrica (figura 8).

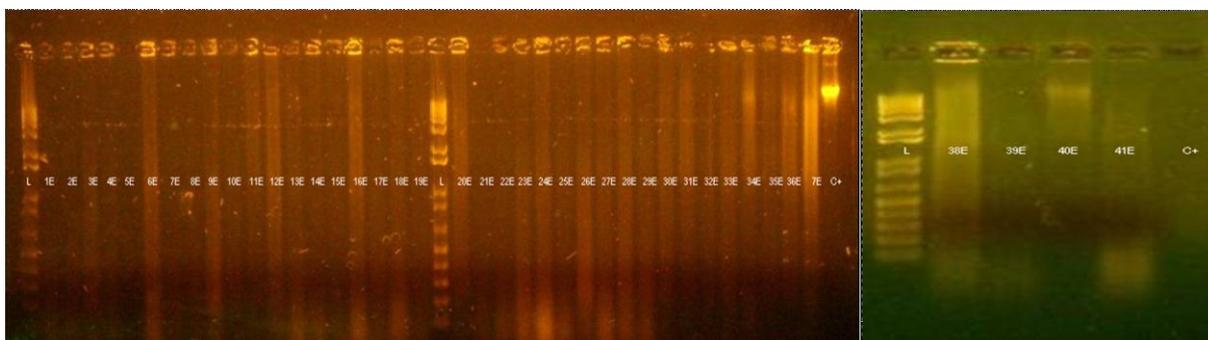


Figura 6. Gel de agarose 1% com DNA extraído de biópsia gástrica pelo kit Qiam FFPE. O padrão de peso molecular está representado pela letra L (Ladder 1Kb plus – Invitrogen).

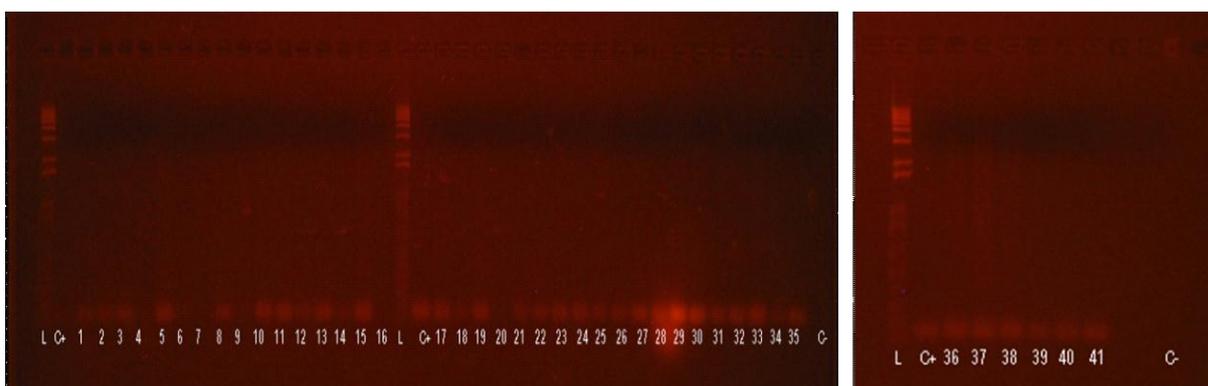


Figura 7. Gel de agarose 1% apresentando o produto de PCR para o gene da beta-actina (135pb) realizado a partir das amostras de DNA extraído de biópsia gástrica. O padrão de peso molecular está representado pela letra L (Ladder 1Kb plus – Invitrogen). O controle positivo (C+) é corresponde a extração de DNA realizada em amostra de sangue. O controle negativo (C-) é referente à reação de PCR contendo água em igual volume à amostra.

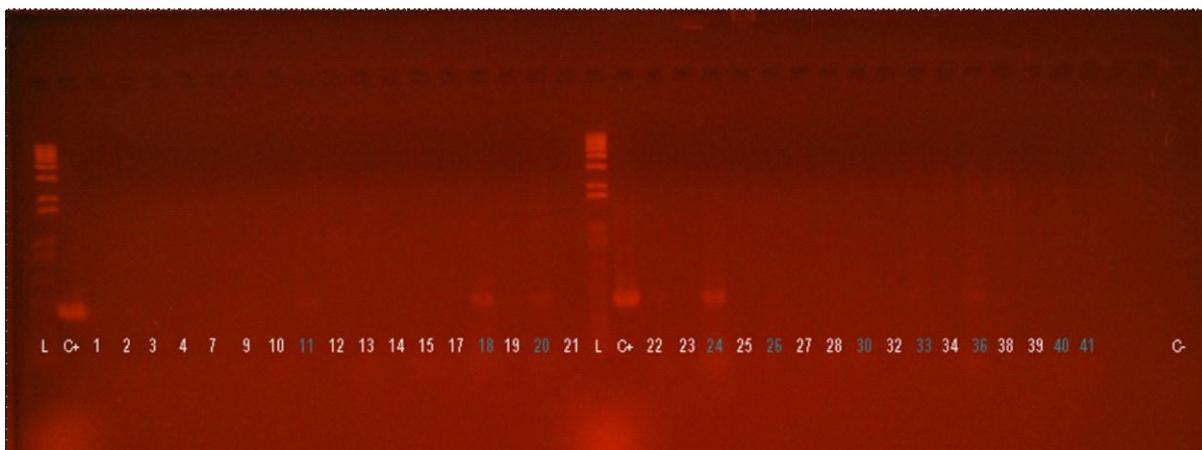


Figura 8. Gel de agarose 1% apresentando o produto de PCR para o gene L1 de HPV com **primer MY09/11** (450pb) realizado a partir das amostras de DNA extraído de biopsia gástrica. O padrão de peso molecular está representado pela letra L (Ladder 1Kb plus – Invitrogen). O controle positivo (C+) é corresponde a extração de DNA realizada em amostra de sangue. O controle negativo (C-) é referente à reação de PCR contendo água em igual volume à amostra. Amostras positivas: 11, 18, 20, 24, 26, 30, 33, 36, 40 e 41.

3.3 Achados nas amostras de sangue do grupo controle

Foi obtido material, DNA, adequado para amplificação pela PCR nas quarenta amostras de sangue periférico dos pacientes (figura 9 e 10). Foi realizado PCR para o gene da beta actina nas quarenta amostras como controle para a PCR para a identificação do HPV (figura 11).

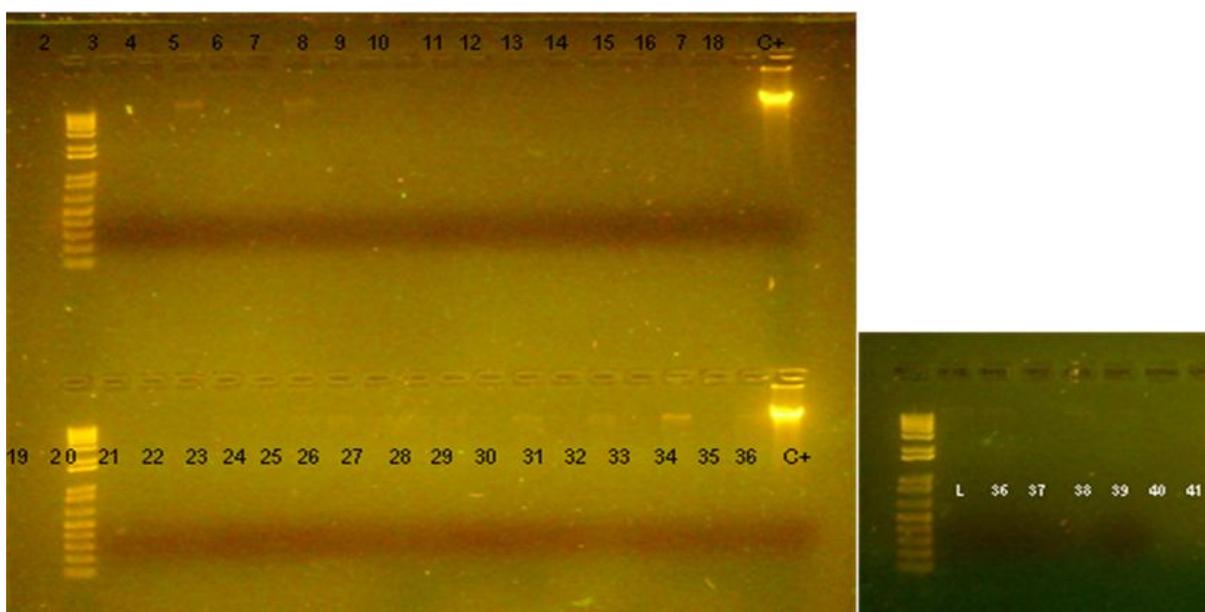


Figura 9. Gel de agarose 1% com DNA extraído de sangue pelo kit Wizard genomic DNA (Promega). O padrão de peso molecular está representado pela letra L (Ladder 1Kb plus – Invitrogen).

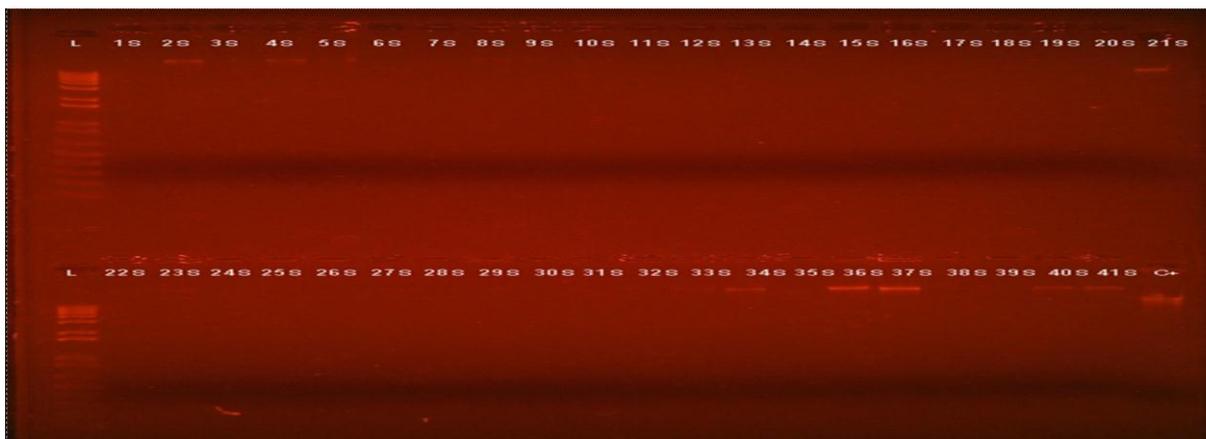


Figura 10. Gel de agarose 1% com 3ul de DNA extraído de sangue pelo kit Wizard genomic DNA (Promega) e precipitado com etanol. O padrão de peso molecular está representado pela letra L (Ladder 1Kb plus – Invitrogen).

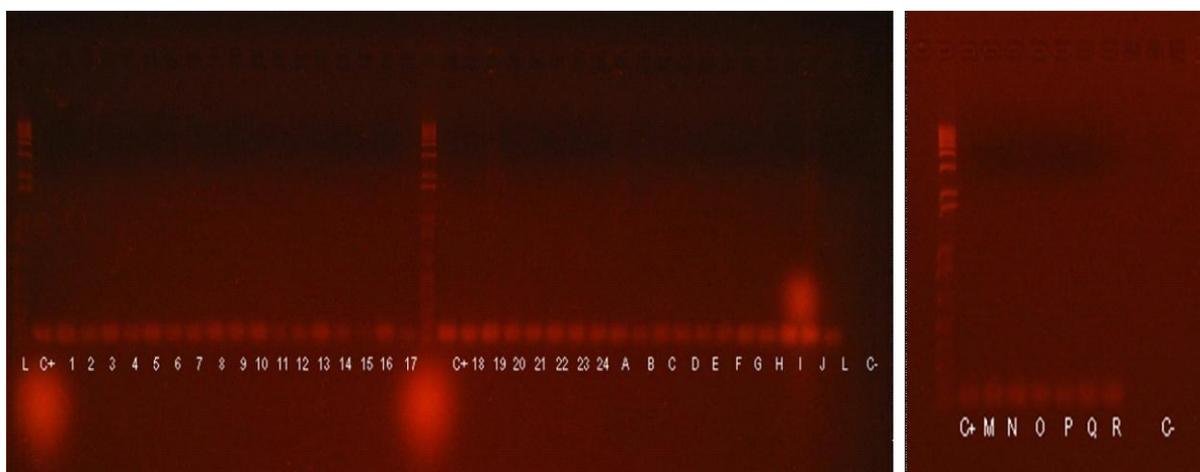


Figura 11. Gel de agarose 1% apresentando o produto de PCR para o gene da beta-actina (135pb) realizado a partir das amostras de DNA extraído de sangue. O padrão de peso molecular está representado pela letra L (Ladder 1Kb plus – Invitrogen). O controle positivo (C+) é corresponde a extração de DNA realizada em amostra de sangue. O controle negativo (C-) é referente à reação de PCR contendo água em igual volume à amostra.

Dos 40 pacientes do grupo controle, sangue, o produto da PCR para o gene L1 amplificado pelo primer GP5+/GP6+ (145pb) identificou, em seis amostras (15%), HPV associado ao sangue periférico (figura 12).

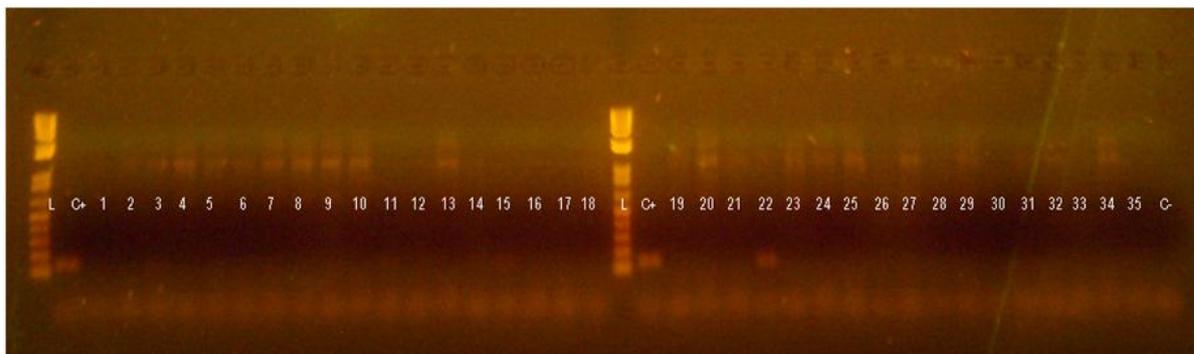


Figura 12. Gel de agarose 1% apresentando o produto de PCR para o gene L1 de HPV amplificado pelo primer GP5+/6+ (155pb) realizado a partir das amostras de DNA extraído de sangue. O padrão de peso molecular está representado pela letra L (Ladder 1Kb plus – Invitrogen). O controle positivo (C+) é correspondente a extração de DNA realizada em amostra de sangue. O controle negativo (C-) é referente à reação de PCR contendo água em igual volume à amostra. Possíveis amostras positivas: 3,7, 11, 14, 15 e 22

Quando avaliamos os achados encontrados nos pacientes portadores de câncer gástrico e o grupo controle com pacientes sem neoplasia não é encontrado significância com relação à presença do HPV (tabela 2).

Tabela 2. Avaliação da presença do HPV segundo o grupo

Variável	Grupos				Total		Valor de p
	Casos		Controle		n	%	
	n	%	n	%			
• HPV							
Sim	4	10,0	10	25,0	14	17,5	p ⁽¹⁾ = 0,077
Não	36	90,0	30	75,0	66	82,5	
Total	40	100,0	40	100,0	80	100,0	

(*): Diferença significativa a 5,0%.

(2): Através do teste Qui-quadrado de Pearson.

Apenas em uma amostra dos controles houve positividade para o HPV no bloco de parafina e no sangue ($p=1,0$), não houve associação significativa entre a presença de HPV no bloco de parafina dos controles e o relato de DST prévia ($p=0,721$); assim como não houve associação significativa com relação a outras variáveis epidemiológicas (tabela 3).

Tabela 3. Avaliação do HPV nos pacientes do grupo controle (biópsia mucosa gástrica e sangue) segundo a faixa etária, sexo, HPV no sangue periférico e prévio, DST, hábito do tabagismo e etilismo, suplementos vitamínicos, dieta rica em fibras e sal.

Variável	HPV				Total		Valor de p
	Sim		Não		n	%	
	n	%	n	%			
• Faixa etária							
Até 49	5	33,3	10	66,7	15	100,0	$p^{(1)} = 0,457$
50 ou mais	5	20,0	20	80,0	25	100,0	
• Sexo							
Masculino	1	10,0	9	90,0	10	100,0	$p^{(1)} = 0,401$
Feminino	9	30,0	21	70,0	30	100,0	
• HPV – sangue							
Sim	1	16,7	5	83,3	6	100,0	$p^{(1)} = 1,000$
Não	9	26,5	25	73,5	34	100,0	
• HPV – prévio							
Sim	4	21,1	15	78,9	19	100,0	$p^{(1)} = 0,721$
Não	6	28,6	15	71,4	21	100,0	
• DST							
Sim	5	27,8	13	72,2	18	100,0	$p^{(1)} = 0,731$
Não	5	22,7	17	77,3	22	100,0	
• Hábito do tabagismo							
Sim	3	15,8	16	84,2	19	100,0	$p^{(1)} = 0,281$
Não	7	33,3	14	66,7	21	100,0	
• Hábito do etilismo							
Sim	-	-	8	100,0	8	100,0	$p^{(1)} = 0,165$
Não	10	31,3	22	68,8	32	100,0	
• Suplementos vitamínicos							
Sim	1	11,1	8	88,9	9	100,0	$p^{(1)} = 0,404$
Não	9	29,0	22	71,0	31	100,0	
• Dieta rica em fibras							
Sim	4	25,0	12	75,0	16	100,0	$p^{(1)} = 1,000$
Não	6	25,0	18	75,0	24	100,0	
• Sal							
Sim	5	21,7	18	78,3	23	100,0	$p^{(1)} = 0,587$
Não	4	26,7	11	73,3	15	100,0	
3	1	50,0	1	50,0	2	100,0	
Grupo Total	10	25,0	30	75,0	40	100,0	

(1): Através do teste Exato de Fisher.

DISCUSSÃO



O estômago tem quatro diferentes camadas celulares. A mais externa é feita de células epiteliais que se diferenciam em glândulas. A maioria dos casos de câncer gástrico estão associados à presença do *H. pylori*, o qual atua como carcinógeno induzindo um processo inflamatório crônico, dano da mucosa e gerando um aumento da vulnerabilidade a outros carcinógenos²⁹. De acordo com algumas pesquisas sobre a patogenicidade da neoplasia gástrica têm se encontrado associação com outros agentes infecciosos como o vírus Epstein-Barr e o bacilo do *Helicobacter Pylori*⁵. O processo de carcinogênese apresenta múltiplas etapas e a infecção com vírus de DNA pode substituir um ou muitos eventos mutacionais e resultar na transformação completa, neoplasia e metástase. O HPV apresenta mecanismos que contribuem para o processo neoplásico, com estratégias de desregulação e perturbação do ciclo celular normal⁹.

Virtualmente 100% das neoplasias cervicais apresentam HPV. No entanto, apenas alguns tipos de HPV regularmente estão presentes. De aproximadamente 130 tipos de HPV, é conhecido que 30 são considerados de alto risco (principalmente o tipo 16, 18, 31 e 45). A infecção com HPV de alto risco é comum, mas apenas 15% das mulheres evoluem com infecção persistente, a qual é o maior fator de risco para o desenvolvimento de neoplasias ano-genitais. Para que ocorra a persistência, o HPV precisa escapar das defesas do sistema imune hospedeiro. O ciclo de replicação viral do HPV ocorre por um mecanismo de fuga do sistema imune do hospedeiro. O papiloma vírus produz apenas uma enzima para replicação do DNA, E1, além desta e da proteína viral E2, a replicação é totalmente dependente dos mecanismos para síntese do DNA celular. O mecanismo central da oncogênese a nível molecular é a desregulação, realizada pelos genes precoces do HPV, dos genes supressores tumorais que resulta em crescimento celular sem controle e inibição da apoptose. Os genes E6 e E7 são expressos de forma exacerbada como consequência da deleção de gene E2, o qual se encontra integrado ao DNA hospedeiro. O E7 promove degradação proteossomal do pRb e proteínas relacionadas e deste modo o crescimento celular fica desregulado. E6 promove degradação do p53 como consequência células com crescimento anormal são poupadas da apoptose⁹⁻¹². Assim como com o *H. pylori* a infecção pelo HPV

atua inibindo supressores tumorais e propiciando um ambiente mais favorável para o acúmulo de mutações e a progressão do processo carcinógeno³.

A incidência de câncer gástrico se relaciona à aspectos geográficos, tendo em vista sua alta incidência em países asiáticos com predominância na China².

O vírus do HPV apresenta potencial infeccioso para o epitélio estratificado e se correlaciona com tumores malignos de células escamosas. Alguns estudos demonstram também a associação deste agente com neoplasias não escamosas como o adenocarcinoma do cólon e gástrico^{20, 22-26}.

No estudo realizado por Tian-You e cols. na província de Shaanxi na China foi identificado um aumento significativo na prevalência de HPV nas células neoplásicas gástricas quando comparadas a mucosa gástrica adjacente sem neoplasia. Foram utilizados como teste PCR para o gene E6 do HPV. Não foi utilizado o PCR para o gene L1 com a justificativa de que o mesmo assim como o gene L2, na grande maioria das vezes, se perde durante a transformação maligna e integração com o genoma hospedeiro podendo levar a baixas taxas de detecção³⁰.

Kamangar e cols. Publicaram um estudo de Cohort prospectivo na província de Linxian, China. Neste estudo foi utilizado teste sorológico para o HPV 16, HPV 18 e HPV 73 não sendo encontrada associação significativa²³.

Xu e cols. Estudaram pacientes de Beijing, China, através de hibridização *in situ* (ISH) para detectar expressão do gene E6 HPV 16 em RNA concluindo que o HPV poderia ser um fator na etiologia e desenvolvimento do câncer gástrico²⁴.

Saegusa e cols. investigaram a ocorrência da infecção pelo HPV em neoplasias esofágicas e gástricas na população do Japão utilizando como método PCR para o gene L1 ou E6-E7 do HPV 16 e 18, no entanto a série inteira de pacientes foi negativa para seqüências de HPV usando os 04 primers²⁵.

Turner e cols. avaliaram a incidência de infecção pelo HPV em neoplasias escamosas do esôfago de pacientes da América do Norte (03 cidades), foi utilizado como teste a PCR para L1 e E7. Apenas um caso na amostra apresentou positividade para o HPV²⁶.

As técnicas de amplificação do DNA são procedimentos laboratoriais que ampliam fragmentos, de uma sequência específica do DNA, a fim de adquirir uma amostra concentrada. Vários tipos de testes utilizam técnicas de amplificação; no entanto a reação de cadeia polimerase – PCR é a mais comumente utilizada para a detecção do HPV^{6, 25, 26}.

O DNA isolado de amostras parafinadas, em geral, têm menor peso molecular comparado àqueles extraídos de amostras frescas. A importância do PCR para detecção do HPV está na habilidade de detectar pequenas quantidades de DNA-HPV. É necessário um controle laboratorial rigoroso, a fim de reduzir contaminações e achados falso-positivos^{6, 30-32}.

Os testes sorológicos para detecção do HPV podem apresentar falso-negativo tendo em vista os mecanismos imunológicos do HPV para escapar da organização imunológica do hospedeiro ou diminuir a quantidade de IgG²³.

As tecnologias diagnósticas que não utilizam amplificação como: hibridização *in situ*, southern blot e dot-blot possuem fatores limitantes como relativa baixa sensibilidade, demora para execução, necessidade de técnicos treinados e grande demanda de equipamentos e reagentes laboratoriais³⁰.

Nosso estudo não demonstra de forma significativa a presença da infecção do HPV à mucosa neoplásica nos pacientes ($p=0.077$). Foi utilizado no estudo o PCR para L1 de HPV, o qual possibilita a identificação da maioria dos tipos de HPV conhecidos. É possível que tenha ocorrido sub-diagnóstico tendo em vista a possibilidade de perda genética durante o processo de transformação maligna com interação da proteína do capsídeo ao genoma hospedeiro; no entanto, vale ressaltar outros trabalhos que utilizaram o PCR para E6 e E7 do HPV que também não evidenciaram associação entre o HPV e a neoplasia gástrica.

Não há estudos na literatura sobre a pesquisa da presença de *H. pylori* e HPV de forma combinada. Como o estudo foi retrospectivo, não encontramos notificação sobre a presença do *H. pylori* em 21 prontuários dos pacientes estudados o que inviabilizou esta avaliação.

Diante do exposto não há evidência de forma significativa da presença do HPV nos pacientes portadores de câncer gástrico do Hospital do Câncer de Pernambuco. Sendo sugerida uma avaliação de forma prospectiva, podendo fazer um melhor controle das variáveis e uma análise não apenas da presença do HPV e do *H. pylori* assim como qual tipo de vírus e moléculas envolvidas no processo de malignização.

CONCLUSÕES



Os resultados obtidos no presente estudo, analisados com uma margem de segurança de 95%, permite concluir que:

Não há evidência de forma significativa da presença do HPV nos pacientes portadores de câncer gástrico do Hospital do Câncer de Pernambuco.

REFERÊNCIAS



1. Brasil. Ministério da Saúde, Instituto Nacional do Câncer. Estimativas de incidência e mortalidade do câncer no Brasil. Disponível em: <www.inca.org.br>. Acesso em 15 jul. 2010.
2. American Cancer Society: Global Cancer Facts and Figures. Available at: <www.cancer.org>. Access: 22 may 2012.
3. Pandey R, Misra V, Misra SP, Dwivedi M, Kumar A, Tiwari BK. *Helicobacter Pylori* and Gastric Cancer. Asian Pacific J Cancer Prev. 2010;11:583-8.
4. Hatakeyama M. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. J Gastroenterol. 2009;44:239-48.
5. Truong CD, Feng W, Li W, Khoury T, Li Q, Alrawi S, Yu Y, Xie K, Yao J, Tan D. Virus associated gastric cancer: a study of 235 cases at a comprehensive cancer center in USA. J Exp Clin Cancer Res. 2009;3:28:14.
6. Reik W, Murrel A. genomic imprinting, silence across the border. Nature. 2000; 405:408-9.
7. Chen X, Yan CS. Esophageal adenocarcinoma: a review and perspectives on the mechanism of carcinogenesis and chemoprevention. Carcinogenesis. 2001; 22:1119-20.
8. Howley PM, Livingston DM. Small DNA tumor viruses: Large contributors to biomedical sciences. Virology. 2009;384:256-9.
9. Pagano JS. Infectious agents and cancer: criteria for a causal relation. Seminars in Cancer Biology. 2004;14:453-71.
10. Damania B. DNA tumor viruses and human cancer. Review. Trends Microbiol. 2006;15:38-44.
11. Muñoz N. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. Vaccine. 2006; 24: S3-1/10.
12. Stanley MA. HPV: from infection to cancer. Biochem Soc Trans. 2007;35:1456-60.
13. Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE. Papillomaviruses. Fields virology. Philadelphia: Lippincott; 2001. p.2231-64.
14. Hebner CM, Laimins LA. Humapapillomaviruses:basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. Rev Med Virol. 2006;16:83-97.

15. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature*. 2002;2:342-50.
16. Campo MS. Animal models of papillomavirus pathogenesis. *Virus Res*. 2002;89:249-61.
17. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*. 1990;63:1129-36.
18. Dyson N, Howley PM, Münger K, Harlow E. The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*. 1989;243:934-7.
19. Steenbergen RDM, Wilde J, Wilting SM, Brink AATP, Snijders PJF, Meijer CJLM. HPV-mediated transformation of the anogenital tract. *J Clin Virol*. 2004;32S:S25-S33.
20. Petersen I, Klein F. HPV in non-gynecological tumors. *Pathologe*. 2008;29:118-22.
21. Cheah PL, Looi LM. Biology and pathological associations of human papillomaviruses: a review. *Malays J Pathol*. 1998;20:1-10.
22. Searle PF, Thomas DP, Faulkner KB, Tinsley JM. Stomach cancer in transgenic mice expressing human papillomavirus type 16 early region genes from a keratin promoter. *J Gen Virol*. 1995;76(Pt10):2631.
23. Kamangar F, Qiao YL, Schiller JT, Dawsey SM, Fears T, Sun XD, Abnet CC, Zhao P, Taylor PR, Mark SD. Human papillomavirus serology and the risk of esophageal and gastric cancer: results from a cohort in a high-risk region in China. *Int J Cancer*. 2006;119:579-84.
24. Xu WG, Zhang LJ, Lu ZM, Li JY, Ke Y, Xu GW. Detection of human papillomavirus type 16 E6 m RNA in carcinomas of upper digestive tract. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2003;83:1910-4.
25. Saegusa M, Hashimura M, Takano Y, Ohbu M, Okayasu I: Absence of human papillomavirus genomic sequences detected by the polymerase chain reaction in oesophageal and gastric carcinomas in Japan. *J Clin Pathol MolPathol*. 1997;50:101-4.
26. Turner JR, Shen LH, Crum CP, Dean PJ, Odze RD. Low prevalence of human papillomavirus infection in esophageal squamous cell carcinomas from North

- America: analysis by a highly sensitive and specific polymerase chain reaction-based approach. *Hum Pathol.* 1997;28:174-8.
27. Technical Manual. Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit. Instructions for use of products A1120, A1123, A1125, A1620. Available at: <www.promega.com>. Access: 30 nov 2011.
 28. QIAamp DNA FFPE Tissue Handbook 10/2007. Available at: <www.qiagen.com>. Access: 30 nov 2011.
 29. Shukla S, Bharti AC, Mahata S, Hussain S, Kumar R, Hedau S, Das BC. Infection of human papillomaviruses in cancers of different human organ sites. *Indian J Med Res.* 2009;130:222-33.
 30. Ma TY, Liu WK, Chu YL, Jiang XY, An Y, Zhang MP, Zheng JW. Detection of human Papillomavirus tipe 16 DNA in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens of gastric carcinoma. *Eur J Gastroenterology & Hepatol.* 2007;19:1090-6.
 31. Lehmann U, Kreipe H. Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed and paraffin-embedded. 2001;25:409-18.
 32. Barr E, Sings HL. Prophylactic HPV vaccines: New interventions for cancer control. *Vaccine.* 2008;26:6244-57.



APÊNDICE A

PROTOCOLO CÂNCER GÁSTRICO E HPV

1. Nome:
2. Registro:
3. Idade:
4. Sexo:
 - a. Feminino
 - b. masculino
5. Data da cirurgia:
6. Telefone:
7. Local de residência:
8. Local da lesão:
 - a. Antro
 - b. Corpo
 - c. Fundo
9. Diagnóstico histopatológico
 - a. Adenocarcinoma
 - b. Epidermoide
 - c. Carcinoma
 - d. Outros
10. Fatores de risco associado:
 - a. Tabagismo
 - b. Barret
 - c. Cirurgia gástrica prévia
 - d. *H. pylori*
 - e. Etilismo
 - f. DST

- g. HPV
- h. HIV
- i. Imunossupressão
- j. Antecedentes oncológicos

11. Grau de diferenciação

- a – Bem
- b- Medianamente
- c- Mal
- d - Indiferenciado

12. Tipo de cirurgia realizada

- a- Gastrectomia total
- b – Gastrectomia sub-total

13. Número de linfonodos dissecados:

14. Número de linfonodos comprometidos:

15. Linfadenectomia

- a- DI
- b- DII
- c- DIII

17. Status atual do acompanhamento

- a- Seguimento
- b- Óbito

18. Óbito relacionado a doença:

- a- Sim
- b- Não

APÊNDICE B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo submetido a uma endoscopia digestiva alta diagnóstica, e está sendo convidado a participar, como grupo controle, do estudo - Infecção pelo Papiloma Vírus Humano (HPV) associada ao câncer gástrico. Os avanços na área da saúde ocorrem através de estudos como este, por isso a sua participação é importante. O objetivo deste estudo é identificar a associação do HPV ao câncer gástrico e caso você participe, será necessário *fazer exame de sangue, e responder a um questionário sobre seus hábitos*. Não será feito nenhum procedimento que lhe **acrescente** qualquer desconforto ou modificação quanto ao seu tratamento. Você poderá ter todas as informações que quiser e poderá não participar da pesquisa ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem prejuízo no seu atendimento. Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro, mas terá a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade. Seu nome não aparecerá em qualquer momento do estudo, pois você será identificado com um número.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE, APÓS ESCLARECIMENTO.

Eu, _____, li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi para que serve o estudo e qual procedimento a que serei submetido. A explicação que recebi esclarece os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará meu tratamento. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro por participar do estudo. Eu concordo em participar do estudo.

Recife,/...../.....

Assinatura do voluntário ou seu responsável legal

Documento de identidade

Assinatura do pesquisador responsável

Assinatura do pesquisador orientador

Telefone de contato dos pesquisadores: _____

APÊNDICE C

QUESTIONÁRIO - CONTROLES

Nome:

Telefone:

Endereço:

Uso de suplementos vitamínicos:

Tabagismo:

Álcool:

Passado de neoplasia:

Cirurgia gástrica prévia:

Ingestão alimentar rica em fibras:

Ingestão de sal:

DST:

HPV prévio:

Imunossupressão (corticoides e/ou imunossupressores):

APÊNDICE D

Trabalho enviado e produzido segundo as Instruções aos autores
“**CYTOLOGY and HISTOLOGY**”
editassist@aqch.com

Association of Human Papillomavirus genomic sequences by polymerase chain reaction in gastric carcinomas in Brazil

Authors:

- **Ana Claudia L. Cândido**^{1,2}, M.D.;
- **José Luiz de Lima Filho**³, M.D., Ph.D.;
- **Danyelly Brunessa G. Martins**³, Ph.D.;
- **Chirleanny Maciel Mendes**³, Ph.D.;
- **Jeymesson Raphael C. Vieira**³, Ph.D.;
- **Alvaro Antônio B. Ferraz**¹, M.D., Ph.D.

Institutional affiliations :

Department of surgery, Clinics Hospital – U.F.PE.¹, Cancer Hospital of Pernambuco² and Laboratory of Immunopatology Keizo Asami – L.I.K.A.³– Federal University of Pernambuco, Pernambuco, Brazil.

Dra.Cândido and Mendes are Research Fellows from department of Surgery and Immunopatology.

Dr. Lima is Director of L.I.K.A. and Associate Professor of Biochemistry and Cell Biology.

Dra. Martins is Associated Professor of Biomedicine.

Dr. Vieira is Adjunct Professor of Histology and Embryology.

Dr. Ferraz is Chief of the Surgery Department of Clinics Hospital – U.F.PE and Associated Professor of General Surgery.

Address correspondence to: Ana Claudia Luna Cândido, M.D., Department of Surgery, Clinics Hospital, Federal University of Pernambuco, Prof. Moraes Rego avenue, 1235 – University City, Pernambuco, Brazil (luna.anaclaudia@gmail.com).

**Association of Human Papillomavirus genomic sequences by polymerase chain reaction
in gastric carcinomas in Brazil**

ABSTRACT

Introduction: HPV is regarded as one of the most important tumor-related viruses, which are known to have a role in cervical carcinoma. Most cases of gastric cancer (GC) are caused by an infection agent: *Helicobacter pylori*. Other infection agents like *Epstein-Barr* virus and *Papillomavirus* are linked to gastric cancer. Several studies have been done and have conflicted results regarding the association of GC with HPV. **Objective:** This study aimed to investigate the prevalence of Human Papillomavirus – HPV in patients with gastric cancer and compare with a control group. **Study design:** Forty paraffin samples of gastric cancer and forty endoscopic normal mucosa and peripheral blood controls were subjected to examination by Polymerase Chain Reaction (PCR) for the L1 gene of HPV. The extracted DNA was amplified in two reaction systems using two pairs of primers: MY09/MY11 and GP+5/GP+6. We used Milli-Q water as negative control and a mixture of 01 µl of human blood plus 0,25 µl of plasmid pBR322 (HPV16) as positive control. **Results:** HPV was found in four patients with gastric cancer and ten patients without cancer. **Conclusion:** There was no statistical significance difference between the two samples ($p=0,077$).

Key words: virus; cancer; prevalence, paraffin samples, DNA.

Introduction

In Brazil, 21.800 new cases of gastric cancer (GC) in 2008 were estimated.^{1,2} It is reported that worldwide 20% of all cancers are related to some infectious agent.³ HPV stands out in the context of current literature for their relevance in oncogenesis and may be considered an excellent model for studying the interaction with the host DNA.^{3,4}

HPV is a non-enveloped viruses with genomes consisting of 8000 base-pairs long circular DNA molecules in double strand that can be divided into three regions: upstream regulatory region, early or nonstructural genes (E1, E2, E4 - E7), and the capsid genes (L1 and L2).^{4,5}

Papillomaviruses are perfectly adapted to their natural host and exploit the cellular machinery for their own purposes. The process of viral replication occurs in a cell already destined to death by natural causes, there is no viral induction to cytolysis or necrosis, so there is no inflammation. Only small amounts of viral particles are exposed to defenses.^{5,7}

The critical molecules in the process of viral replication are the viral proteins E6 and E7. The best-characterized interactions are with the proteins pRB and p53 which are central molecules in cell cycle control. As a consequence, the dependence on cell cycle control is abolished and normal differentiation is retarded.^{4,8} Constant activity of the viral proteins E6 and E7 leads to increasing genomic instability, accumulation of oncogene mutations, further loss of cell-growth control, and ultimately cancer.⁹ During tumor progression, the viral genomes often integrate into the host chromosome, which results in a constant level of E6/E7 proteins.^{10,11} HPV infection persistence occurs in about 15% of cases.^{5,12}

Several studies have been done and have conflicted results regarding the association of GC with HPV, considering its high heterogeneity and variability of geographical incidence, it becomes interesting for studies in carcinogenesis.^{15,18,19,20,21}

In Brazil, Pernambuco is the seventh most prevalent state in cervical uterine cancer (26.44 per 100,000 women), which can indirectly estimate a high prevalence of HPV infection in this population.¹

This study aims to assess the prevalence of HPV in patients with GC in Pernambuco state, in order to increase the existing knowledge in this area and enable new possibilities for optimization in the treatment of this disease.

Methods and Material

The cross-sectional analytic observational retrospective study is an original research that was accepted on the ethics committee. Registration number: 446/2007. The registers of all case group patients were analyzed as a retrospective search.

Forty paraffin samples of GC (case group) and forty normal gastric mucosae (control group) of patients from Cancer Hospital in Pernambuco were subjected to analysis. Forty blood samples from the control group were subjected to extraction and analysis of DNA.

Inclusion criteria were: (1) patients undergoing surgery, curative or palliative, from May 2008 to May 2009; (2) patients who accepted the study protocol and underwent endoscopic procedure without GC.

Exclusion criteria were: (1) patients whose paraffin samples were not significant for cancer or the biological material was damaged; (2) control group patients with a history of malignancy, prior gastric surgery or immunosuppression.

Blood DNA isolation

Total blood DNA was extracted using Wizard Genomic Kit (Promega Bio Sciences, LLC. San Luis Obispo, CA, USA), follows the recommendations of the supplier. After DNA elution, the material was stored at -20oC until further analysis.

Paraffin-embedded and formalin-fixed DNA extraction

Formaldehyde Fixed-Paraffin Embedded (FFPE) tissue was cut from 10 to 15 slices of 2 μ m each and harvested to 1,5 ml polypropylene tube DNase/RNase free. The DNA extraction was performed using the comercial kit QIAamp DNA FFPE Tissue (QIAGEN Biotecnologia Brasil Ltda, Sao Paulo, SP, Brazil) in accordance with the standards of the manufacturer. Thus, the cut sections were incubated directly with 180 μ l of buffer ATL and 20 μ l of proteinase K, overnight at 56° C. After that, the supernatant was transferred to a fresh tube and store at -20oC for further analysis. Formalin-fixed samples were submitted to the same treatment.

HPV identification by PCR

DNA samples were subjected to analysis by PCR for MY09/MY11 (450 bp fragment) and GP5+/GP6+ (150 bp fragment) both targets in L1 open reading frame (ORF) of HPV. The cycling conditions were: 94°C for 3 minutes, followed by 34 cycles of 95°C for 1 min, 45°C (for GP5+/GP6+) or 55°C (for MY09/MY11) for 1min and 72°C for 1min, with final extension step performed at 72°C for 10 min. DNA extracted from negative HPV human blood was used as a negative control. Plasmidial DNA pBR322.HPV-16 was used as positive control. PCR for β -globin housekeeping gene was also performed using the primers PCO4/GH20 (268 bp). Cycling conditions as followed: 94°C for 10 minutes, 40 cycles of 94°C for 1 min, 65°C for 1min and 72°C for 1min, with final extension step performed at 72°C for 7 min. DNA extracted from human blood was used as a positive control. All PCR reactions were performed in EppendorfMastercycler. The amplicons were analysed by 1% electrophoresis agarose gel using ethide bromide 10 μ g/ml.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS 11.5 for Windows. Comparisons of frequencies were done by using the chi-square statistic from Pearson. Mean values between 2 groups were compared with Fisher's Exact test with confidence interval of 95%.

Results

The mean age of patients with GC were 60.73 (SD: 12.33). Thirty one surgeries were performed with curative intent and nine as a palliative. The most frequent histopathological type was adenocarcinoma (27 patients) with the remaining classified as carcinoma. All patients underwent palliative procedure died within one year. The retrospective analyze of the registers of all case group patients searched for *H. pylori* showed negative in 14 samples, positive to 05 and there were no information about infection in 21 patients. The average ages of patients used as control were 53.35 (SD: 15.25). The DNA for PCR amplification was suitable in all collected samples (cases and controls).

Paraffins samples

HPV have been identified in four samples of gastric cancer (10%), all of them were classified as carcinoma ($p=0,008$). There were no other significant associations in the samples examined (Table I). In the control group HPV have been identified in ten samples (25%).

There was no significant difference between this samples ($p = 0.077$).Peripheral blood samples

The PCR product for the L1 gene amplified by primer GP5+/GP6+ identified HPV in six samples (15%).

Only one control sample was positive for HPV in both paraffin block and peripheral blood ($p=1,0$). There was no significant association between the presence of HPV in paraffin block of controls and reports of previous Sexually Transmitted Diseases (STDs) ($p = 0.721$) and no other significant association in relation to other epidemiological variables (Table II).

Discussion

The stomach consists of four different layers of cells and the outmost layer is made up of epithelial cells which make gland like structures on stomach wall. Most case of GC are

caused by *H. pylori* and this bacterium secretes urease, a special enzyme that converts urea to ammonia which reduces the acidity of stomach, making it more hospitable for infection agents like *Epstein-Barr* virus and *Papillomavirus*.²²⁻²⁵

DNA target amplification is a laboratory-based procedure that duplicates DNA fragments from a target sequence of genes, thus providing concentrated sample of a specific genetic sequence. Several types of DNA target amplification technologies exist; however PCR is the most commonly employed in HPV detection.^{6,20,21}

Non-amplified technologies, that include Southern blot hybridization, dot blot hybridization and *in situ* hybridization, among others have several factors that limit their use such relatively low sensitivity, generally are time-consuming, require trained technicians and demand an array of laboratory reagents and equipment.¹⁵

The inherent strength of PCR-based methodology lies in its capacity to detect very small amounts of HPV-DNA. At the same time, strict laboratory procedures and controls are critical in reducing contamination-related false-positive findings.¹⁵

Serological tests may show false negative in view of the immunological mechanisms of HPV to escape the organization of the host immune system or decrease the amount of Ig G.¹⁸ The DNA isolated from paraffin samples is usually of low molecular weight compared to DNA extracted from fresh or frozen samples.⁶

It was identified DNA bands of good quality in all paraffin samples to perform PCR in this study.

The study performed by Tian-You Ma et al.¹⁵ found a significant increase in the prevalence of HPV in gastric cancer cells when compared to the near gastric mucosa without cancer. They didn't use PCR for the L1 gene on the grounds that the same as the L2, because the vast majority of times, they were lost during malignant transformation and integration with the host genome and may lead to false negatives. Kamangar et al.¹⁸ published a cohort

which was used serologic test for identification of HPV 16, HPV 18 and HPV 73 in China and wasn't found significant association. Xu et al.¹⁹ studied in China patients by in situ hybridization (ISH) to detect gene expression of HPV E6 16 m RNA and concludes that HPV could be a factor in the etiology and development of GC.

Saegusa et al.²⁰ investigated the occurrence of HPV in GC in Japan using PCR for gene L1 or E6-E7, but the entire series of patients was negative. Turner et al.²¹ evaluated the incidence of HPV in esophagus cancer, using PCR to test the L1 and E7. Only one sample was positive.

Our study did not demonstrate a significant presence of HPV infection in patients with GC ($p = 0.077$). The use of PCR for identification of L1 HPV allows the identification of most types known of HPV. It may have been under-diagnosis in view of the possibility of gene loss during the process of malignant transformation interaction with the host genome; however, it is noteworthy that other studies that used PCR for HPV E6 and E7 also showed no association between HPV with GC.

As a retrospective study, it was not informed in the registers the *H. pylori* presence in 21 samples, suggesting a prospective study to analyze the co-infection between *H. Pylori* and HPV.

According to the results above there is not enough evidence of a significant association of HPV to the GC at the Cancer Hospital of Pernambuco.

Acknowledgment

We would like to thank Dra. Christina M. Miranda for the technical support, the Cancer Hospital for providing the data to produce this study and the CNPq for the financial support.

References

1. BRASIL, Ministério da Saúde, Instituto Nacional do Câncer: Estimativas de incidência e mortalidade do câncer no Brasil. Available at: www.inca.gov.br

2. American Cancer Society: Global Cancer Facts and Figures. Available at www.cancer.org
3. Pagano JS: Infectious agents and cancer: criteria for a causal relation. *Seminars in Cancer Biology* 14(2004) 453-471
4. Muñoz N. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 24S3 (2006) S3/1-S3/10
5. Stanley M.A: HPV: from infection to cancer. *Biochemical Society Transactions* (2007) vol 35, part 6
6. Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE: *Papillomaviruses*. *Fields virology* (Philadelphia, USA: Lippincott, Williams and Wilkins) 2001; 2231-64
7. Kupper TS, Fuhlbrigge RC: Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 211-222
8. Munger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M: Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* 2004;78:11451-60
9. Duensing S, Munger K: Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. *Int J Cancer* 2004;109:157-62
10. Bernard HU: Gene expression of genital human papillomaviruses and considerations on potential antiviral approaches. *Antivir Ther* 2002;7:219-37
11. Damania B: DNA tumor viruses and human cancer. Review. *Trends in Microbiology*. 2006; Nov, vol. 15 number 1
12. Liaw KL, Hildesheim A, Burk RD, Gravitt P, Wacholder S, Manos MM, Scott DR, Sherman ME, Kurman RJ, Glass AG, Anderson SM, Schiffman M: A prospective study of human Papillomavirus (HPV) type 16 DNA detection by polymerase chain reaction and its association with acquisition and persistence of other HPV types. *J Infect Dis* 2001 Jan 1;183(1):8-15.

13. Technical Manual. Wizard ® Genomic DNA Purification Kit. Instructions for use of products A1120, A1123, A1125, A1620. Available at: www.promega.com
14. QIAamp DNA FFPE Tissue Handbook 10/2007. Available at: www.qiagen.com
15. Ma T, Liu W, Chu Y, Jiang X, Na Y, Zhang M, Zheng J: Detection of human papillomavirus type 16 DNA in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens of gastric carcinoma. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 2007; 19:1090-1096
16. Li T, Lu ZM, Chen KN, Guo M, Xing HP, Mei Q: Human papilloma virus type 16 is an important infections factor in the high incidence of esophageal cancer in anyang area of China. *Carcinogenesis* 2001; 22:929-934.
17. Sur M, Cooper K: The role of human papillomavirus in esophageal cancer. *Pathology* 1998; 30:348-354
18. Kamangar F, Qiao YL, Schiller JT, Dawsey SM, Fears T, Sun XD, Abnet CC, Zhao P, Taylor PR, Mark SD: Human papillomavirus serology and the risk of esophageal and gastric cancer: results from a cohort in a high-risk region in China. *Int J Cancer*. 2006 Aug 1;119(3):579-84
19. Xu WG, Zhang LJ, Lu ZM, Li JY, Ke Y, Xu GW: Detection of human papilomavirus type 16 E6 m RNA in carcinomas of upper digestive tract. *Zhonghua Yi XueZaZhi*. 2003 Nov 10;83(21):1910-4.
20. Saegusa M, Hashimura M, Takano Y, Ohbu M, Okayasu I: Absence of human papillomavirus genomic sequences detected by the polymerase chain reaction in oesophageal and gastric carcinomas in Japan. *J. Clin. Pathol: MolPathol*. 1997 Apr;50(2):101-4
21. Turner JR, Shen LH, Crum CP, Dean PJ, Odze RD: Low prevalence of human papillomavirus infection in esophageal squamous cell carcinomas from North America:

analysis by a highly sensitive and specific polymerase chain reaction-based approach.

Hum Pathol 1997 Feb;28(2):174-8

22. Pandey R, Misra V, Misra SP, Dwivedi M, Kumar A, Tiwari BK: *Helicobacter Pylori* and Gastric Cancer. Asian Pacific J Cancer Prev, 11, 2010, 583-588
23. Hatakeyama M: *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. J Gastroenterol. 2009; 44(4): 239-48.
24. Shukla S et al: Infection of human papillomaviruses in cancers of different human organ sites. Indian J Med Res 130, September 2009,pp 222-233
25. Truong CD, et al: Virus associated gastric cancer: a study of 235 cases at a comprehensive cancer center in USA. J Exp Clin Cancer Res.2009 Feb 3;28:14

Table I Assessment of HPV (paraffin) by age, sex, type of surgery, histopathological and degree of differentiation.

Variables	HPV – Parafin				TOTAL		p-value
	Yes		no		n	%	
	n	%	n	%	n	%	
• Age							
Until 49	1	10,0	9	90,0	10	100,0	p ⁽¹⁾ = 1,000
50 or more	3	10,0	27	90,0	30	100,0	
• Sex							
Male	3	11,1	24	88,9	27	100,0	p ⁽¹⁾ = 1,000
Female	1	7,7	12	92,3	13	100,0	
• Surgery							
Total gastrectomy	2	13,3	13	86,7	15	100,0	p ⁽¹⁾ = 0,314
Subtotal gastrectomy	-	-	12	100,0	12	100,0	
Gastroenteroanastomosis	2	40,0	3	60,0	5	100,0	
Total gastrectomy + Splenectomy	-	-	2	100,0	2	100,0	
Total gastrectomy + cholecystectomy	-	-	1	100,0	1	100,0	
Unresectable	-	-	4	100,0	4	100,0	
Subtotal gastrectomy + cholecystectomy	-	-	1	100,0	1	100,0	
• Histopathological							
Carcinoma	4	30,8	9	69,2	13	100,0	p ⁽¹⁾ = 0,008*
Adenocarcinoma	-	-	27	100,0	27	100,0	
• Degree of differentiation							
Undifferentiated	2	66,7	1	33,3	3	100,0	p ⁽¹⁾ = 0,049*
Well differentiated	-	-	11	100,0	11	100,0	
Moderately differentiated	-	-	4	100,0	4	100,0	
Poorly differentiated	2	9,1	20	90,9	22	100,0	
Total	4	10,0	36	90,0	40	100,0	

(*): significant difference 5,0% (1): By Fisher exact test

Table II Assessment of HPV (paraffin) in control group by age, sex, HPV in peripheral blood, prior STDs, smoking, alcoholism, Vitamin Supplements, high-fiber diet and salt.

Variables	HPV - paraffin				TOTAL		p-value
	n	Sim %	Não N	%	n	%	
• Age							
until 49	5	33,3	10	66,7	15	100,0	p ⁽¹⁾ = 0,457
50 or more	5	20,0	20	80,0	25	100,0	
• Sex							
Male	1	10,0	9	90,0	10	100,0	p ⁽¹⁾ = 0,401
Female	9	30,0	21	70,0	30	100,0	
• HPV – peripheral blood							
Yes	1	16,7	5	83,3	6	100,0	p ⁽¹⁾ = 1,000
No	9	26,5	25	73,5	34	100,0	
• STDs							
Yes	5	27,8	13	72,2	18	100,0	p ⁽¹⁾ = 0,731
No	5	22,7	17	77,3	22	100,0	
• Smoking							
Yes	3	15,8	16	84,2	19	100,0	p ⁽¹⁾ = 0,281
No	7	33,3	14	66,7	21	100,0	
• Alcoholism							
Yes	-	-	8	100,0	8	100,0	p ⁽¹⁾ = 0,165
No	10	31,3	22	68,8	32	100,0	
• Vitamin Supplements							
Yes	1	11,1	8	88,9	9	100,0	p ⁽¹⁾ = 0,404
No	9	29,0	22	71,0	31	100,0	
• high-fiber diet							
Yes	4	25,0	12	75,0	16	100,0	p ⁽¹⁾ = 1,000
No	6	25,0	18	75,0	24	100,0	
• Salt							
Yes	5	21,7	18	78,3	23	100,0	p ⁽¹⁾ = 0,587
No	4	26,7	11	73,3	15	100,0	
Unknown	1	50,0	1	50,0	2	100,0	
Total	10	25,0	30	75,0	40	100,0	

(1): By Fisher exact test

ANEXOS



Anexo A



SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DE PERNAMBUCO
HOSPITAL AGAMENON MAGALHÃES

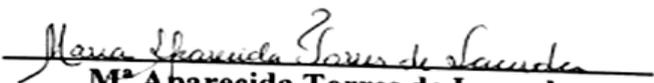
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Recife, 14 de dezembro de 2007

Prezada Investigadora

Informamos a Vsa., que foi aprovado na reunião do dia 13/12/2007, pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Agamenon Magalhães, o projeto de pesquisa, "INFECCÃO PELO PAPILOMA VÍRUS HUMANO (HPV) ASSOCIADA AO CÂNCER GÁSTRICO", conforme normas para pesquisa, envolvendo seres humanos resolução 196/96.

Atenciosamente,


M^a Aparecida Torres de Lacerda
Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa - HAM

ANEXO B

Carta de Aceito da Revista "CYTOLOGY and HISTOLOGY"

editassist@aqch.com
Manuscript AQ-01286-12 Version 2
25 de julho de 2012 10 17

Dear Dr. Candido.

It is a pleasure to inform you that your manuscript "Association of Human Papillomavirus Genomic Sequences by Polymerase Chain Reaction in Gastric Carcinomas in Brazil" (MS # AQ-01286-12 Version 2), is now acceptable for publication in "Analytical and Quantitative Cytology and Histology" subject to such editorial changes as may be necessary.

Please download the available copyright and financial disclosure forms from:
<http://www.aqch.com/admin/copyright.pdf>

Sign and return the copyright and financial disclosure forms. You will receive galley proofs and a reprint order form from the publisher before publication.

We assume that no part of this work—text, tables or illustrations—has been published previously and that no portion will be submitted elsewhere without our permission. Thank you for your continued interest in the journal.

Sincerely,

Antonio Lopez-Beltran, M.D., Ph.D.
Editor-in-Chief