



PRESENÇA DO PAPILOMAVIRUS HUMANO TIPO 16 E EXPRESSÃO GÊNICA DA PROTEÍNA P16^{INK4A} E ONCOPROTEÍNA E7 NO CARCINOMA COLORRETAL

HPV16 AND EXPRESSION OF PROTEIN p16^{INK4A} AND E7 ONCOPROTEIN IN COLORECTAL CARCINOMA

Olavo Magalhães **PICANÇO-JUNIOR**^{1,2}✉, Thérèse Rachell **THEODORO**³✉,
Paulo José de Brito Silva **ALBUQUERQUE**²✉, Rodrigo Nascimento **PINHEIRO**¹✉, Jaques **WAISBERG**¹✉

RESUMO – INTRODUÇÃO: O papilomavírus humano (HPV) é agente das doenças sexualmente transmissíveis de maior prevalência no mundo que estão associadas ao câncer do colo do útero e canal anal. A ação do HPV na carcinogênese colorretal não está ainda estabelecida. **OBJETIVO:** Estudar a eventual correlação entre a presença do HPV tipo 16 e a expressão gênica da proteína p16^{INK4a} e da oncoproteína E7 de HPV e de seus níveis no tecido do carcinoma colorretal. **MÉTODOS:** Estudo retrospectivo caso-controle de 79 doentes com carcinoma colorretal divididos em dois grupos: HPV presente e HPV ausente. Foi realizada reação em cadeia da polimerase (PCR), além da hibridização do tipo *dot blot* para o HPV 16 e o HPV 18. Amostras do tecido colorretal também foram submetidas ao estudo imuno-histoquímico para avaliar o nível tecidual das proteínas E7 e p16^{INK4a}. **RESULTADOS:** O HPV foi identificado em 36 (45,6%) casos. Não houve diferença significativa entre os grupos quanto ao sexo ($p=0,056$), idade ($p=0,1$), localização cólica e/ou retal (0,098) e presença do HPV. A expressão gênica da oncoproteína E7 de HPV estava presente em 3,12% dos casos ($p=0,9$) e a expressão da proteína p16^{INK4a} foi observada em 46,3% ($p=0,27$) dos indivíduos com detecção do HPV. **CONCLUSÃO:** A expressão gênica e os níveis teciduais da oncoproteína E7 e da proteína p16^{INK4a} encontrados nos pacientes positivos para o HPV sugerem a ausência de atividade oncogênica do HPV tipo 16 no carcinoma colorretal.

DESCRITORES: Neoplasias Colorretais. Infecções por Papilomavirus. Genes p16. Proteínas E7 de Papilomavirus

ABSTRACT – BACKGROUND: Human papillomavirus (HPV) is the agent of the most prevalent sexually transmitted diseases in the world associated with cervix and anal canal cancer. The action of HPV on colorectal carcinogenesis is not yet established. **OBJECTIVE:** This research aimed to study the possible correlation between the presence of HPV16 and the gene expression of p16^{INK4a} protein and HPV E7 oncoprotein and their levels in colorectal carcinoma tissue. **METHODS:** A retrospective case-control study of 79 patients with colorectal carcinoma was divided into two groups: HPV-positive and HPV-negative. The polymerase chain reaction was performed, in addition to dot-blot hybridization for HPV16 and HPV18. Colorectal tissue samples were also subjected to immunohistochemical study to assess the tissue level of E7 and p16^{INK4a} proteins. **RESULTS:** HPV was identified in 36 (45.6%) cases. There was no significant difference between groups regarding gender ($p=0.056$), age ($p=0.1$), colic and/or rectal location (0.098), and presence of HPV. Gene expression of HPV E7 oncoprotein was present in 3.12% of cases ($p=0.9$), and p16^{INK4a} protein expression was observed in 46.3% ($p=0.27$) of those selected with HPV detection. **CONCLUSION:** Gene expression and tissue levels of E7 oncoprotein and p16^{INK4a} protein found in HPV-positive patients suggest the absence of HPV16 oncogenic activity in colorectal carcinoma.

HEADINGS: Colorectal Neoplasms. Papillomavirus Infections. Genes, p16. Papillomavirus E7 Proteins.

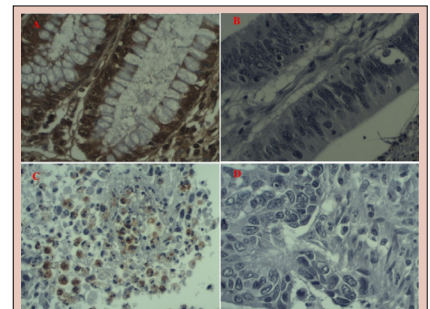


Figura 1 – Fotomicrografias das lâminas de imuno-histoquímica (400x). A – Fotomicrografia com expressão da p16^{INK4a}. B – Fotomicrografia sem expressão da p16^{INK4a}. C – Fotomicrografia com expressão da E7. D – Fotomicrografia sem expressão da E7.

Mensagem central

A ausência de expressão gênica e níveis significantes da oncoproteína E7 do HPV e da proteína p16^{INK4a} nos tecidos de CCR onde a presença do HPV tipo 16 foi detectada sugerem que não há atividade oncogênica do HPV tipo 16 no câncer colorretal

Perspectiva

A realização desse estudo buscou a identificação da presença do HPV e verificar o nível da oncoproteína viral E7 e da proteína p16^{INK4a} no tecido do CCR. As alterações desencadeadas pela presença do HPV no desenvolvimento do CCR são um possível fator causal, sendo necessária a expressão de E7. Nossos dados indicaram que o HPV não estava associado ao desenvolvimento do CCR e o nível da p16^{INK4a} não foi significante como marcador da infecção pelo HPV no CCR.

¹Universidade Federal de São Paulo, Programa de pós graduação em Ciência Cirúrgica interdisciplinar - São Paulo - São Paulo – Brasil

²Universidade Federal do Amapá - Macapá - AP - Brasil

³Faculdade de Medicina do ABC, Centro de Biologia Molecular - Santo André - São Paulo - Brasil

Como citar esse artigo: Picanço-Junior OM, Theodoro TR, Albuquerque PJBS, Pinheiro RN, Waisberg J. Presença do papilomavírus humano tipo 16 e expressão gênica da proteína p16^{INK4a} e oncoproteína E7 no carcinoma colorretal. ABCD Arq Bras Cir Dig. 2021;34(4):e1637. <https://doi.org/10.1590/0102-672020210002e1637>

Correspondência:
Olavo Magalhães Picanço-Junior
Email: ompjunior@bol.com.br

Fonte de financiamento: Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, auxílio financeiro durante o período desta pesquisa por meio do pagamento de bolsa.

Conflito de interesses: Não

Recebido: 17/05/2021

Aceito: 30/08/2021

INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR) é uma das neoplasias mais frequentes no mundo, sendo o terceiro câncer mais incidente (10,2%), após as neoplasias malignas de pulmão e mama.^{5,30} O CCR é a segunda com maior mortalidade no mundo e foi o responsável por 881.000 mortes no ano de 2018 com cerca de 1,8 milhões de novos casos.^{5,30}

As doenças infecciosas foram responsáveis por 2,2 milhões de novos casos de câncer no mundo em 2018 que representaram 13% de todos os casos de câncer, excluindo as neoplasias de pele não melanoma.¹⁸ Dentre as neoplasias malignas com etiopatogênese infecciosa, o *Helicobacter pylori* foi o agente infeccioso responsável por 810.000 novos casos de câncer gástrico e o HPV o responsável por 690.000 novos casos de câncer acometendo, principalmente, o colo do útero.¹⁸

O papilomavírus humano (HPV) é uma das doenças sexualmente transmissíveis de maior prevalência no mundo e a infecção pelo HPV está associada ao câncer do colo do útero.^{9,20} Peder et al.²⁰ realizaram metanálise sobre a associação entre o HPV e o câncer genital não cervical com amostra combinada de 1.552 doentes analisados. Esses autores verificaram a presença de HPV em 42% dos casos de câncer de pênis, 67% nos casos de CCR e em 43% nos casos de câncer vulvar. Outros estudos^{1,4,7,9,19,22} correlacionaram o HPV com o desenvolvimento do adenocarcinoma cólico e, mais frequentemente, ao câncer do canal anal. Em doentes portadores de tumor do canal anal foi identificada uma alta proporção de hiperexpressão do gene p16^{INK4a}, sugerindo que a infecção pelo HPV seja um dos determinantes para o desenvolvimento do câncer anal em homens e mulheres.^{1,4,7,9,19,22} Autores mostraram a presença do HPV em tumores de outras localizações.^{6,8,11,23,25,29}

A expressão das oncoproteínas E6 e E7 do HPV está relacionada ao desenvolvimento dos carcinomas genitais cervicais, orais e do canal anal.^{1,23,25} Os resultados apresentados em protocolo de coloração para a avaliação imuno-histoquímica da expressão das oncoproteínas E6 e E7 no câncer do colo do útero e no câncer orofaríngeo positivos para o HPV mostraram vantagens desse método em comparação com a hibridização do mRNA das proteínas E6 e E7 devido ao custo muito menor e à aplicabilidade maior na prática clínica.^{1,8,23,25}

No CCR, buscou-se um marcador substituto para a presença da expressão gênica da E7 do HPV pelo exame imuno-histoquímico da oncoproteína p16^{INK4a}.^{11,25} No entanto, a oncoproteína p16^{INK4a} não se mostrou um marcador substituto para uma infecção ativa por HPV no CCR, ao contrário do que é observado no câncer de células escamosas dos tumores de cabeça e pescoço e no câncer do colo uterino.^{11,25}

Damin et al.⁹ identificaram uma positividade para o HPV em 60% dos doentes com CCR e o tipo 16 foi o mais frequente sendo detectado em 68,3% dos casos. Esse achado indicou que esse vírus poderia estar relacionado com a patogênese do CCR, o que também foi sugerido por outros autores.^{4,7,22}

Porém, ainda é necessário definir se a presença de HPV encontrada nas amostras de tecido obtidas em doentes com CCR determina níveis expressivos da oncoproteína E7 e da proteína p16^{INK4a} do HPV, evento que poderia se apresentar como importante fator de associação causal para o desenvolvimento do CCR.^{11,24}

A identificação do DNA do HPV em amostras teciduais de CCR sugere uma possível participação do HPV na carcinogênese colorretal. No entanto, a atuação efetiva do HPV depende da ação de suas oncoproteínas e com isso surgiu a necessidade de avaliar a possibilidade da oncoproteína E7 estar ativa em nossas amostras.

O objetivo desse estudo foi verificar a eventual correlação entre a presença do HPV tipo 16 e sua relação com a expressão

do gene E7 do HPV tipo 16 e os níveis da proteína p16^{INK4a} e da oncoproteína E7 no tecido do CCR.

MÉTODOS

Foi realizado um estudo envolvendo participantes humanos de acordo com o padrão de Instituições de Ética em pesquisa sob o número: 1377/08 e 1.461.817.

Trata-se de um estudo retrospectivo e analítico do tipo caso-controle.

Foram analisadas 82 amostras teciduais de CCR obtidas no transcorrer das cirurgias eletivas realizadas com intenção curativa para tratamento do CCR. Foi realizada reação em cadeia da polimerase (PCR) com iniciadores do gene betaglobina para avaliar a suficiência e integridade do DNA presente em cada amostra, sendo excluídas 3 amostras.³

Procedeu-se, desta forma, a realização de PCR com iniciadores genéricos e específicos para os papilomavírus 16 e 18 e hibridização em pontos (*dot blot*).

A amostragem foi constituída por blocos parafinados de tecido colorretal obtidos a partir de peças cirúrgicas de doentes com CCR, de ambos os sexos, com idades entre 28 a 87 anos (média 57,85±15,3 anos) submetidos ao procedimento cirúrgico no Hospital Ophir Loyola (Belém, PA), no período de janeiro de 1999 a dezembro de 2003. Todos os doentes foram operados consecutivamente nesse período e foram classificados de acordo com o sistema TNM (*American Joint Committee on Cancer*).

Para definir o diagnóstico e o estadiamento foram utilizados a biópsia do tumor colorretal, exames de imagem (RX de tórax, TC abdominal e pélvica e/ou ultrassonografia abdominal) de acordo com protocolo do serviço, achados intra-operatórios e o laudo do exame anatomopatológico da peça cirúrgica.

Os critérios de inclusão foram doentes adultos, de ambos os sexos, com CCR confirmado por exame histopatológico, submetidos à cirurgia no Hospital Ofir Loyola.

Os critérios de exclusão foram a presença de síndrome de polipose colorretal hereditária, carcinoma colorretal não polipóide hereditário, doença inflamatória colorretal, CCR metacrônico, pacientes submetidos a tratamento radioterápico neoadjuvante e outro tipo histológico de câncer colorretal diferente do CCR.

Extração do DNA

Seções do tecido parafinado depositadas em um tubo foram submetidas ao processo de desparafinização e digestão enzimática com proteinase K (200 mg/ml) a 56°C, durante 2 a 4 dias. Após a digestão, procedeu-se à extração do DNA pelo método fenol-clorofórmio.

PCR

Após a extração e purificação, as amostras de DNA foram inicialmente submetidas à PCR com os *primers* PCO3 e G74 que amplificam 100 pares de bases (pb) do gene b-globina humana para avaliar a suficiência e integridade do DNA presente em cada amostra.

As amostras positivas foram submetidas à PCR com iniciadores genéricos para HPV, GP5+/GP6+, capazes de amplificar 140 pb do gene L1 de HPV.

Para verificar a ausência de contaminação por DNA exógeno foi utilizado um controle negativo, contendo todos os reagentes da mistura, exceto o DNA. Uma linhagem de células *HeLa* com DNA de HPV 18 integrado foi utilizada como controle positivo.

As amplificações foram efetuadas no termociclador, (*Eppendorf*, modelo *Mastercycle*, *Gradiente*, *Germany*), com 40 ciclos de amplificação com 1 min. para a desnaturação

a 95° C, 1 min. de anelamento a 55° C e 1,5 minutos para o alongamento da cadeia a 72° C.

Os produtos da amplificação (*amplicons*) foram analisados em gel de poliacrilamida a 7% e corados pela prata.

Identificação de HPV por Hibridização em Pontos (Dot Blot)

Os procedimentos de fixação do *amplicon* na membrana incluíram o aquecimento ou irradiação UV. Em seguida, a membrana foi recoberta com sondas específicas (isoladamente ou em coquetéis) marcadas com fósforo radioativo (P³²) para os HPV tipos 6,11,16,18,31,33,34,35,39,40,42,43,44,45,51,52,54,56 e 58. A hibridização foi revelada após exposição das membranas ao filme de RX por 18 a 36 horas à 70°C. A hibridização com a sonda foi reconhecida como evidência de que a sequência nucleotídica pesquisada estava presente no espécime estudado.

Em cada membrana utilizou-se, além dos controles positivos e negativos dos produtos da PCR, controles para diferentes tipos de HPV, provenientes de amplificações por PCR de plasmídeos e amostras clínicas.

Posteriormente, as membranas foram umedecidas com solução 2xSSC e colocadas em um saco plástico com 5mL da solução 6xSSC, 10x *Denhardt's*, 0,5% SDS e 100mg de esperma de salmão desnaturado, sendo, em seguida, encubadas a 55°C por 3 horas (pré-hibridização).

Adicionou-se as sondas radioativas à solução anterior, permanecendo incubadas a mesma temperatura por 12 a 24 horas (hibridização). Ao fim deste período, as membranas foram lavadas com solução 3xSSC, 0,5%SDS, em três etapas: a primeira, por 10 min. à temperatura ambiente; as outras duas, por 30 min. cada, a 55°C. Finalmente, as membranas foram expostas a um filme de RX (*X-OmatK-Kodak, Rochester, NY, USA*) durante 18 a 36 horas a -70°C e a hibridização foi verificada após a revelação do filme pela presença de pontos escuros no local correspondente às amostras adicionadas à membrana.

PCR específica para E7 de HPV 16 e 18

As amostras foram utilizadas em uma PCR com iniciadores específicos para E7 do HPV 16 e 18 capazes de amplificar 217 pb para E7 de HPV 16 e 137 pb para E7 de HPV 18. Com relação aos iniciadores específicos para o HPV 16 foram utilizados: 5' GCC CAT TAA CAG GTC TTC C 3' ; 5' TTT GCA ACC AGA GAC AAC TGA 3'. Para o HPV 18: 5' ATG TCA CGA GCA ATT AAG C 3' ; 5' TTC TGG CTT CAC ACT TCA AAC A 3'.

As amplificações foram efetuadas no equipamento termociclador, (*Eppendorf, modelo Mastercycle, Gradiente, Germany*), em 40 ciclos de amplificação empregando 1 min. para a desnaturação a 95° C, 1 min. de anelamento a 55° C e 1,5 minutos para o alongamento da cadeia a 72°C.

Os produtos da amplificação (*amplicons*) foram analisados em gel de poliacrilamida a 7% corados pela prata e analisados de forma semelhante aos para a RT- PCR genérica.

Técnica Imuno-histoquímica

Os blocos de parafina contendo os espécimes histológicos foram seccionados com 3 µm de espessura e montados sobre lâminas silanizadas. Estas foram submetidas à técnica LSAB-peroxidase (complexo avidina-biotina-peroxidase) de imuno-histoquímica. Cozimento no vapor com solução de citrato foi empregada na recuperação antigênica. No bloqueio das peroxidases endógenas e de sítios inespecíficos utilizou-se peróxido de hidrogênio 10V e leite desnatado 2%, respectivamente. Foram, então, incubados por 18 horas os anticorpos monoclonais anti-HPV16 E7 N-21 (SC-1588) e anti-P16-ARC FL-151 (SC-68393) (*Santa Cruz Biotechnology Inc[®], Santa Cruz, CA, USA*) na diluição de 1:100 em soro albumina bovina (*BSA, Sigma[®], St Louis, MI, USA*). Após esse período, as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário LSAB-

HRP (*Large Streptavidin-Avidin-Biotin - System Peroxidase; Dako A/S[®], Copenhagen, Denmark*), reveladas com cromógeno 3-3'-diaminobenzamida (*Dako A/S[®], Copenhagen, Denmark*) e a contracoloração foi realizada com hematoxilina de Harris (*Sigma Diagnostics, St. Louis, MI, USA*).

Captura e Tratamento das Imagens

A coloração de cada marcador no ensaio imuno-histoquímico foi quantificado apenas no tecido cólico e retal no aumento 100x, utilizando-se o princípio do *hotspot* (identificação no menor aumento da área com maior concentração de alteração histológica pesquisada), enquanto que no aumento de 400x, o campo de maior expressão foi capturado digitalmente (Figura 1).

O sistema de captura de imagem utilizou microscópio *Nikon Eclipse E200 (Nikon Company, Tokio, Japan)* acoplado à câmera digital.

Os arquivos, salvos como *tagged image file format (TIFF)*, foram processados no *software* de editoração de imagens *Corel photo-paint (Corel Corporation, Ottawa, Canada)* utilizando-se o recurso "máscara de cor" inicialmente, onde o pixel da cor predominantemente correspondente a expressão do marcador de imuno-histoquímica foi selecionado.

Esse arquivo editado foi transferido para o *software* de análise de imagens Imagem J (imagej.nih.gov/ij/) disponível na plataforma *Windows*. Nesse programa, as imagens coloridas foram convertidas em escala de cinza (*color to gray*) e em seguida novamente convertidas para imagem binária, resultando em uma imagem constituída apenas de pixels brancos e pretos, esses últimos correspondendo a expressão do marcador da proteína p16^{INK4a} e da oncoproteína E7 do HPV. O recurso "*count black and white pixels*" quantificou em valor absoluto e em percentual a expressão dos pixels brancos e pretos de cada campo histológico capturado.

Análise Estatística

Os testes utilizados foram o teste do qui-quadrado para testar a homogeneidade entre as proporções, o teste t de Student para amostras independentes e o teste exato de Fisher nos casos onde as frequências foram menores que 5. Adotou-se o valor de p < 0,05 como nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade. Os testes estatísticos foram realizados no programa *BioEstat 5.0* (<https://www.mamiraua.org.br/documentos/374dcfb64a59a98770b581ec51962b.zip>).

RESULTADOS

Durante o desenvolvimento da pesquisa foram excluídos três casos devido a negatividade para o teste do gene da betaglobina humana para identificação de DNA viável, o que totalizou 79 casos viáveis para o estudo que mostraram positividade para o gene da betaglobina humana em 92,9% das amostras.

Desse modo, analisou-se 79 doentes com idade entre 28 a 87 anos, com média de idade de 57,85±15,3 anos e mediana de idade de 58 anos.

Após a realização da PCR, os doentes foram divididos em dois grupos diferenciados pela presença ou ausência do HPV. Trinta e seis (45,5%) doentes foram alocados para o grupo com HPV presente e 43 (54,5%) casos integraram o grupo HPV ausente.

Observou-se que não houve diferença significativa em relação ao sexo, a idade dos doentes em ambos os grupos e a localização do HPV no colo ou no reto nos doentes do grupo onde o HPV estava presente (Tabela 1).

Com relação ao estágio TNM, estadiamento clínico e ao grau de diferenciação celular não se observou diferença significativa em relação à presença ou ausência do HPV (Tabela 2).

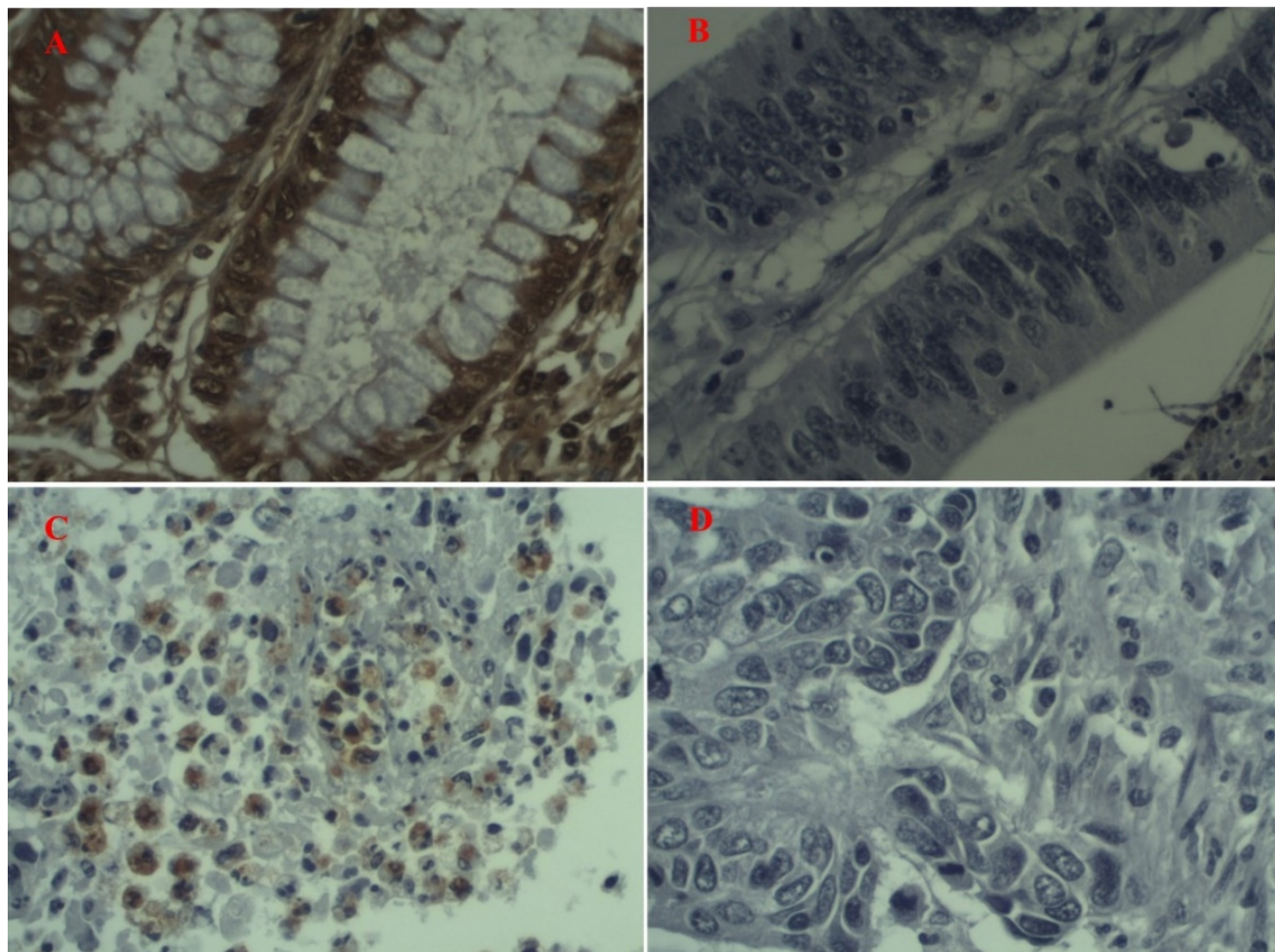


Figura 1 - Fotomicrografias das lâminas de imuno-histoquímica (400x). A – Fotomicrografia com expressão da p16^{INK4a}. B – Fotomicrografia sem expressão da p16^{INK4a}. C - Fotomicrografia com expressão da E7. D - Fotomicrografia sem expressão da E7.

Tabela 1 - Caracterização dos doentes operados de carcinoma colorretal em relação às variáveis gênero, idade e localização anatômica da coleta da amostra de tecido colorretal.

Variável	Categoria	HPV				p
		Positivo		Negativo		
		n	%	n	%	
Gênero	Feminino	10	27,8	21	48,8	0,056 ⁽¹⁾
	Masculino	26	72,2	22	51,2	
Idade	< 40	3	8,3	4	9,3	1,000 ⁽²⁾
	40 – 49	7	19,4	8	18,6	
	50 – 59	7	19,4	9	20,9	
	= 60	19	52,8	22	51,2	
Localização	CD	6	16,7	14	32,6	0,098
	CE	10	27,8	5	11,6	
	Reto	20	55,6	24	55,8	

1. Nível descritivo de probabilidade do teste qui-quadrado
2. Nível descritivo de probabilidade do teste exato de Fisher

CD: Cólon direito; CE: Cólon esquerdo

O estudo imuno-histoquímico para as proteínas p16^{INK4a} e E7 não evidenciou diferença significativa ($p=0,26$) na sua presença em ambos os grupos.

A oncoproteína E7 esteve presente apenas no grupo onde o HPV foi detectado e não houve diferença significativa ($p=0,89$) no nível tecidual da oncoproteína E7 entre o grupo com HPV presente ou ausente (Tabela 3).

Tabela 2 - Caracterização dos 79 doentes operados de carcinoma colorretal de acordo com o estágio TNM, estadiamento clínico e o grau de diferenciação celular, quanto à presença ou ausência do HPV.

Variável	Categoria	HPV				P
		Positivo		Negativo		
		N	%	N	%	
T	1	1	2,85	1	2,32	0.2699
	2	5	14,28	8	18,6	
	3	26	74,28	29	67,44	
	4	3	8,57	5	11,62	
N	0	16	45,57	26	60,49	0.3823
	1	11	31,42	11	25,58	
M	2	8	22,85	6	13,95	0.1149
	0	27	77,14	35	81,39	
Estádio clínico	I	4	11,42	6	13,95	0.3174
	II	9	25,71	18	41,86	
	III	14	40	11	25,58	
	IV	8	22,85	8	18,6	
Grau de diferenciação	I	4	11,42	8	18,6	0.3420
	II	25	71,42	31	72,09	
	III	6	17,14	4	9,3	

Teste do qui-quadrado N = número de doentes

Tabela 3 - Caracterização dos doentes operados de carcinoma colorretal em relação ao nível das proteínas p16^{INK4a} e E7 do HPV no tecido colorretal.

Variável	HPV		P*
	Positivo %	Negativo %	
P16 ^{INK4a}	46,311	42,799	0.2699
E7	3,218	0	0.8983

*Teste t de Student.

DISCUSSÃO

Estudos vêm sendo realizados visando a identificação da presença do HPV no colo e no reto acometidos por CCR, porém ainda com resultados conflitantes. Pelizzer et al.²¹, ao realizarem revisão sistemática com metanálise, verificaram a associação entre HPV e CCR, o que também foi observado por Damim et al.¹⁰ Em contraposição a esses dados, Vuitton et al.²⁶, refutaram a relação do HPV na carcinogênese colorretal. Picanço Junior et al.²⁴ observaram a presença do HPV em 46% dos doentes com CCR, sem que houvesse relação com o estágio TNM, estágio clínico ou grau de diferenciação celular.

O risco de desenvolvimento do CCR na população é superior a 6%.¹⁶ Doentes com história familiar representam até 20% dos casos de CCR e 5 a 10% estariam relacionados à interação com síndromes polipoides e não polipoides. Os demais casos aconteceria de forma esporádica, representando 80% dos CCR.¹⁶

Surge, desta forma, o questionamento em relação à associação entre o HPV e o desenvolvimento do CCR, pois a simples presença do HPV não é considerado um fator para o desenvolvimento do câncer, uma vez que há a necessidade da atividade oncogênica da proteína E7 de HPV e a inatividade de genes supressores de tumor, como o p16^{INK4a}.^{15,16}

A realização desse estudo buscou a identificação da presença do HPV e verificar o nível da oncoproteína viral E7 e da proteína p16^{INK4a} de HPV no tecido do CCR.^{14,27}

Os oncovírus contribuem para a carcinogênese promovendo instabilidade genética e induzindo aberrações cromossômicas.²⁷ Nesse sentido, pode-se associar as alterações desencadeadas pela presença do HPV no desenvolvimento do CCR como possível fator causal.²⁷ Porém, o aumento do nível de uma determinada proteína não implica, necessariamente, no aumento da atividade dessa proteína que pode estar funcionalmente inativa.^{1,11,25}

Estudos relacionaram a hiperexpressão da proteína p16^{INK4a} com os processos de carcinogênese e progressão do CCR.^{13,28} Herman et al.¹² constataram que a redução da expressão da proteína p16^{INK4a} está associada à hipermetilação de genes que predis põem ao CCR em 32 a 55% dos casos. A perda da função da proteína p16^{INK4a} resultante de sua metilação aberrante foi associada ao surgimento de diversas neoplasias, incluindo o CCR e notou-se uma íntima relação da positividade da proteína p16^{INK4a} com a manifestação do CCR.^{12,31}

Nossos dados indicaram que o HPV não estava associado ao CCR e o nível da p16^{INK4a} não foi significativo como marcador da infecção pelo HPV no CCR, resultados semelhantes aos observados por Libera et al.¹⁷

Apesar da necessidade da expressão de E7 para que ocorra a carcinogênese após a integração do HPV à célula hospedeira,^{8,11} unicamente sua presença não parece ser um fator definitivo para a progressão no desenvolvimento tumoral.^{13,16,28} Esse dado é corroborado pela observação de que indivíduos contaminados pelo HPV não desenvolvem necessariamente células tumorais, o que sugere que são imperativos outros eventos sequenciais para a carcinogênese.³² Assim, a atuação

do HPV na carcinogênese, no entanto, ainda permanece controversa.^{2,9,10,17,24}

Deschoolmeester et al.¹¹ identificaram a presença do DNA do HPV em 14,2% das amostras de tecido de doentes com CCR, valor inferior de outros autores^{4,9,14,15,24} que apontaram a presença do HPV em 21 a 97% dos casos. Essas discrepância são atribuídas às diferenças geográficas, culturais e de saneamento das regiões de onde os doentes estudados eram originários.

Com relação à distribuição do HPV no intestino grosso, nós não observamos diferenças quanto a localização onde o DNA do vírus foi detectado. Esses dados são coincidentes com os de Damin et al.⁹, o que pode indicando que a contaminação pelo HPV não ocorre por transmissão viral retrógrada da região anogenital. Também não foram encontradas diferenças significantes entre as variáveis clínicas e patológicas estudadas e a presença ou ausência do HPV.

Na presente investigação não se identificou atividade da proteína de supressão tumoral p16^{INK4a}, diferentemente do que se observa nos casos de neoplasia do colo uterino relacionados ao HPV, onde esta proteína atua como marcador substituto da atividade oncogênica da oncoproteína E7 de HPV.

Os achados obtidos no transcórre dessa pesquisa são coincidentes com os dados da literatura atual na qual se observa a presença do HPV em amostras teciduais de doentes portadores de CCR.^{9,11,20,25} No entanto, outros autores não evidenciaram a presença de qualquer tipo de HPV,^{16,26} o que poderia estar relacionado com as diversas técnicas de identificação do DNA do HPV utilizadas nesses estudos.

Foram observadas limitações no transcórre do presente estudo, como o número de amostras, a dificuldade na obtenção de material adequados das peças cirúrgicas a partir de blocos parafinados e a natureza retrospectiva do estudo.

O papel desempenhado pelo HPV na gênese do CCR ainda permanece controverso. Outros estudos ainda são necessários para esclarecer se o HPV participa, em algum grau, da carcinogênese do CCR nos doentes com esse vírus detectado no tecido do CCR.

CONCLUSÃO

Não houve expressão gênica e níveis significantes da oncoproteína E7 do HPV e da proteína p16^{INK4a} nos tecidos de CCR onde a presença do HPV tipo 16 foi detectada. Esses achados sugerem ausência de atividade oncogênica do HPV tipo 16 no CCR.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Luisa Lina Villa, agradeço a disponibilidade do Laboratório do Instituto Ludwig de Pesquisa do Câncer de São Paulo.

REFERÊNCIAS

1. Alemany L, Saunier M, Alvarado-Cabrero I, Quirós B, Salmeron J, Shin HR, et al. Human papillomavirus DNA prevalence and type distribution in anal carcinomas worldwide. *Int J Cancer*. 2015;136(1):98-107. doi: 10.1002/ijc.28963.
2. Baandrup L, Thomsen LT, Olesen TB, Andersen KK, Norrild B, Kjaer SK. The prevalence of human papillomavirus in colorectal adenomas and adenocarcinomas: a systematic review and meta-analysis *Eur J Cancer*. 2014;50(8):1446-61. doi: 10.1016/j.ejca.2014.01.019.

3. Bauer HM, Ting Y, Greer CE, Chambers JC, Tashiro CJ, Chimera J, et al. Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *JAMA*. 1991;265(4):472-77. PMID: 1845912
4. Bodaghi S, Yamanegi K, Xiao SY, Da Costa M, Palefsky JM, Zheng ZM. Colorectal papillomavirus infection in patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2005;11(8):2862-7. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1680.
5. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(6):394-424. doi: 10.3322/caac.21492.
6. Bucchi D, Stracci F, Buonora N, Masanotti G. Human papillomavirus and gastrointestinal cancer: a review. *World J Gastroenterol*. 2016;22(33):7415-30. doi: 10.3748/wjg.v22.i33.7415.
7. Buyru N, Tezol A, Dalay N. Coexistence of K-ras mutations and HPV infection in colon cancer. *BMC Cancer*. 2005;6:115. doi: 10.1186/1471-2407-6-115.
8. Cai Q, Lv L, Shao Q, Li X, Dian A. Human papillomavirus early proteins and apoptosis. *Arch Gynecol Obstet*. 2013;287(3):541-8. doi: 10.1007/s00404-012-2665-z.
9. Damin DC, Caetano MB, Rosito MA, Schwartzmann G, Damin AS, Frazzon AP, et al. Evidence for an association of human papillomavirus infection and colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2007;33(5):569-74. doi: 10.1016/j.ejso.2007.01.014.
10. Damin DC, Ziegelmann PK, Damin AP. Human papillomavirus infection and colorectal cancer risk: a meta-analysis. *Colorectal Dis*. 2013; 15(8):e420-28. Lorenzon L, Ferri M, Pilozi E, Torrisi MR, Ziparo V, French D. Human papillomavirus and colorectal cancer: evidences and pitfalls of published literature. *Int J Colorectal Dis*. 2011;26(2):135-42. doi: 10.1007/s00384-010-1049-8.
11. Deschoolmeester V, Marck VV, Baay M, Weyn C, Vermeuler P, Marck EV, et al. Detection of HPV and the role of p16^{INK4A} overexpression as a surrogate marker for the presence of functional HPV oncoprotein E7 in colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2010;10:117-26. doi: 10.1186/1471-2407-10-117.
12. Herman JG, Merlo A, Mao L, Lapidus RG, Issa JP, Davidson NE, et al. Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. *Cancer Res*. 1995;55(20):4525-30. PMID: 7553621
13. Ishiguro A, Takahata T, Saito M, Yoshiya G, Tamura Y, Sasaki M, Munakata A. Influence of methylated p15^{INK4b} and p16^{INK4a} genes on clinicopathological features in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006;21(8):1334-9. doi: 10.1111/j.1440-1746.2006.04137.x.
14. Kirgan D, Manalo P, Hall M, McGregor B. Association of human papillomavirus and colon neoplasms. *Arch Surg*. 1990;125(7):862-5. doi: 10.1001/archsurg.1990.01410190060009.
15. Lee YM, Leu SY, Chiang H, Fung CP, Liu WT. Human papillomavirus type 18 in colorectal cancer. *J Microbiol Immunol Infect*. 2001;34(2):87-91. PMID: 11456365
16. Lorenzon L, Ferri M, Pilozi E, Torrisi MR, Ziparo V, French D. Human papillomavirus and colorectal cancer: evidences and pitfalls of published literature. *Int J Colorectal Dis*. 2011;26(2):135-42. doi: 10.1007/s00384-010-1049-8.
17. Libera LS, Siqueira T, Santos IL, Ramos JE, Milhomen AX, Alencar RC, et al. Detection of Human papillomavirus and the role of p16^{INK4a} in colorectal carcinomas. *PLoS One*. 2020 Jun 25;15(6):e0235065. doi: 10.1371/journal.pone.0235065.
18. Martel C, Georges D, Bray F, Ferlay J, Clifford GM. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. *Lancet Glob Health*. 2020;8(2):e180-e190. doi: 10.1016/S2214-109X(19)30488-7.
19. Nasioutziki M, Chatzistamatiou K, Loufopoulos PD, Vavoulidis E, Tsampazis N, Pratilas GC, Liberis A, Karpa V, Parcharidis E, Daniilidis A, Spanos K, Dinas K. Cervical, anal and oral HPV detection and HPV type concordance among women referred for colposcopy. *Infect Agent Cancer*. 2020;15;15:22. doi: 10.1186/s13027-020-00287-7.
20. Peder LD, Silva CM, Boeira VL, Plewka J, Turkiewicz M, Consolaro MEL, Sela VR, Boer CG, Gimenes F, Teixeira JJV. Association between Human Papillomavirus and Non-cervical Genital Cancers in Brazil: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2018;19(9):2359-2371. doi: 10.22034/APJCP.2018.19.9.2359.
21. Pelizzer T, Dias CP, Poeta J, Torriani T, Roncada C. Colorectal cancer prevalence linked to human papillomavirus: a systematic review with meta-analysis. *Rev Bras Epidemiol*. 2016;19(4):791-802. doi: 10.1590/1980-5497201600040009.
22. Pérez LO, Abba MC, Laguens RM, Golijow CD. Analysis of adenocarcinoma of the colon and rectum: detection of human papillomavirus (HPV) DNA by polymerase chain reaction. *Colorectal Dis*. 2005;7(5):492-95. doi: 10.1111/j.1463-1318.2005.00774.x.
23. Petito G, Carneiro MA, Santos SH, Silva AM, Alencar RC, Gontijo AP, Saddi VA. Human papillomavirus in oral cavity and oropharynx carcinomas in the central region of Brazil. *Braz J Otorrinolaryngol*. 2017;83(1):38-44. doi: 10.1016/j.bjorl.2016.01.004.
24. Picanço Junior OM, Oliveira AL, Freire LT, Brito RB, Villa LL, Matos D. Associação do papillomavirus humano com o adenocarcinoma colorretal e sua influência no estadio tumoral e no grau de diferenciação celular. *ABCD Arq Bras Cir Dig*. 2014;27(3):172-6. doi: 10.1590/s0102-67202014000300003.
25. Stiasny A, Kuhn C, Mayr D, Alexiou C, Janko C, Wiest I, et al. Immunohistochemical Evaluation of E6/E7 HPV Oncoproteins Staining in Cervical Cancer. *Anticancer Res*. 2016;36(6):3195-8. PMID: 27272848.
26. Vuitton L, Jaillet C, Jacquin E, Monnien F, Heberle M, Mihai MI, et al. Human papillomaviruses in colorectal cancers: a case-control study in western patients. *Dig Liver Dis*. 2017;49(4):446-50. doi: 10.1016/j.dld.2016.11.003.
27. Weinberger PM, Yu Z, Zerkowski M, Chung G, Camp RL, Rimm DL, et al. A possible association of human papilloma virus with a subset of colorectal adenocarcinomas. *J Clin Oncol Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition)*. 2004; 22(14S): 3544.
28. Wieser RJ, Faust D, Dietrich C, Oesch F. p16^{INK4} mediates contact-inhibition of growth. *Oncogene*. 1999;18(1):277-81. doi: 10.1038/sj.onc.1202270.
29. Woellner LFA, Medeiros JS, Ribas CAPM, Nassif PAN, Ribas-Filho JM, Sobral ACL, Ariede BL, Costa DAPDD, Malafaia O. Is there correlation between human papillomavirus (HPV) and esophageal epidermoid carcinoma? *Arq Bras Cir Dig*. 2021;34(1):e1528. doi: 10.1590/0102-672020200002e1528.
30. World Health Organization. Global Health Observatory [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2018 [Cited 2020 Ago 08]. Available from: who.int/gho/database/en/.
31. Zhao P, Hu YC, Talbot IC. Expressing patterns of p16 and CDK4 correlated to prognosis in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2003;9(10):2202-6. doi: 10.3748/wjg.v9.i10.2202.
32. Zur Hausen H. Disrupted dichotomous intracellular control of human papillomavirus infection in cancer of the cervix. *Lancet*. 1994; 343(8903):955-7. doi: 10.1016/s0140-6736(94)90070-1.