

ASSOCIAÇÃO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO COM O ADENOCARCINOMA COLORRETAL E SUA INFLUÊNCIA NO ESTADIO TUMORAL E NO GRAU DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR

Association between human Papillomavirus and colorectal adenocarcinoma and its influence on tumor staging and degree of cell differentiation

Olavo Magalhães **PICANÇO-JUNIOR**¹, Andre Luiz Torres **OLIVEIRA**³, LuciaThereza Mascarenhas **FREIRE**³,
Rosângela Baia **BRITO**², Luisa Lina **VILLA**¹, Délcio **MATOS**¹

Trabalho realizado no ¹Programa de Pós-graduação em Gastroenterologia Cirúrgica, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo –UNIFESP, São Paulo, SP; ²Hospital Ophyr Loiola, Belém, PA e ³Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer do Hospital Alemão Oswaldo Cruz, São Paulo, SP, Brasil.

DESCRIPTORIOS - Infecções por papilomavírus. Carcinoma. Neoplasias colorretais. Estadiamento de neoplasias. Diferenciação celular.

Correspondência:

Olavo Magalhães Picanço-Junior
Email: olavopicanco@unifap.br

Fonte de financiamento: não há
Conflito de interesses: não há

Recebido para publicação: 20/02/2014
Aceito para publicação: 08/05/2014

HEADINGS - Papillomavirus infections. Carcinoma. Colorectal neoplasms. Neoplasm staging. Cell differentiation.

RESUMO - Racional: O câncer colorretal é uma das neoplasias mais frequentes entre a população adulta mundial, e entre as do trato gastrointestinal, é a segunda em relação à prevalência e mortalidade sendo a sua causa conhecida apenas em cerca de 5% dos casos. Acredita-se que 15% das doenças malignas estariam relacionadas à oncogênese viral. **Objetivo:** Correlacionar a presença do HPV com o estadiamento e o grau de diferenciação celular dos pacientes portadores de adenocarcinoma colorretal. **Métodos:** Foi realizado um estudo retrospectivo do tipo caso-controle com 144 pacientes divididos em um grupo teste representado por pacientes com câncer colorretal em um total de 79 casos e um grupo controle correspondente à pacientes com doença benigna totalizando 65 casos. Após a aplicação dos critérios de exclusão, foi possível analisar 144 pacientes com idade entre 25 a 85 anos (média de 57,85 anos com desvio-padrão de 15,27 anos e mediana de 58 anos). Oitenta e seis (59,7%) pacientes eram homens. Amostras teciduais a partir de blocos de parafina de ambos os grupos foram submetidos à extração do DNA e em seguida foi realizada reação em cadeia da polimerase com iniciadores genéricos e específicos para HPV 16 e 18 e também a hibridização do tipo dot blot com o intuito de identificar o DNA do HPV. **Resultados:** Os grupos se mostraram homogêneos quanto a sexo, idade e localização do HPV nas amostras analisadas. Dos 41 pacientes com HPV, 36 (45,6%) eram do grupo teste e cinco (7,7%) do grupo controle ($p < 0,001$). Todos os casos de HPV observados correspondiam ao HPV 16 não sendo evidenciado HPV 18 em nenhum caso estudado. Não houve diferença significativa na comparação realizada quando se considerou o sexo, idade e localização no que tange a presença do HPV em ambos os grupos. Não observou-se diferença significativa em relação ao estágio e ao grau de diferenciação celular dos pacientes portadores de câncer colorretal. **Conclusão:** O papilomavírus humano tipo 16 está presente em indivíduos portadores de carcinoma colorretal. No entanto, não está relacionado com o estadiamento e o grau de diferenciação.

ABSTRACT - Background: Colorectal cancer is one of the most common types of neoplasia among the worldwide adult population. Among neoplasms of the gastrointestinal tract, it is ranked second in relation to prevalence and mortality, but its etiology is only known in around 5% of the cases. It is believed that 15% of malignant diseases are related to viral oncogenesis. **Aim:** To correlate the presence of HPV with the staging and degree of cell differentiation among patients with colorectal adenocarcinoma. **Methods:** A retrospective case-control study was conducted on 144 patients divided between a test group of 79 cases of colorectal cancer and a control group to analyze 144 patients aged 25 to 85 years (mean, 57.85 years; standard deviation, 15.27 years and median, 58 years). Eighty-six patients (59.7%) were male. For both groups, tissue samples from paraffin blocks were subjected to DNA extraction followed by the polymerase chain reaction using generic and specific primers for HPV 16 and 18. Dot blot hybridization was also performed with the aim of identifying HPV DNA. **Results:** The groups were shown to be homogenous regarding sex, age and site of HPV findings in the samples analyzed. Out of the 41 patients with HPV, 36 (45.6%) were in the cases and five (7.7%) were in the control group ($p < 0.001$). All the HPV cases observed comprised HPV 16, and HPV 18 was not shown in any of the cases studied. There were no significant differences in comparisons of sex, age and site regarding the presence of HPV in either of the groups. It was not observe any significant difference in relation to staging or degree of cell differentiation among the patients with colorectal cancer. **Conclusion:** Human papillomavirus type 16 is present in individuals with colorectal carcinoma. However, its presence was unrelated to staging or degree of differentiation.

INTRODUÇÃO

O câncer colorretal é doença multifatorial e possibilita estudá-lo desde suas formas iniciais até as mais avançadas, possibilitando a observação dos mecanismos que poderiam estar envolvidos em seu desenvolvimento, evidenciando desta forma as múltiplas etapas genéticas relacionadas ao processo de carcinogênese²⁸.

Existem evidências que elementos dietéticos e ambientais desempenham papel importante no desenvolvimento do câncer colorretal (CCR)¹⁹. Segundo Giuliani⁷, vários fatores estariam envolvidos na carcinogênese colorretal incluindo os relacionados ao estilo de vida, alterações genéticas sequenciais e infecção viral.

O papiloma vírus humano (HPV) é o causador de uma das doenças sexualmente transmissíveis de maior prevalência no mundo, havendo trabalhos na literatura

médica que o correlacionam com o desenvolvimento de adenocarcinoma no cólon^{2,3,5,18}; entretanto, mais comumente está relacionado ao desenvolvimento de câncer do canal anal^{3,12,24} e principalmente cervicouterino^{15,16,21,26,27}.

Em função destes dados e do potencial carcinogênico do HPV já confirmado no colo uterino e canal anal, faz-se necessário a detecção e identificação do papilomavírus como um fator predisponente para a carcinogênese colorretal o que poderia proporcionar a identificação de grupos de risco, bem como auxiliar no desenvolvimento de novas terapêuticas baseados no entendimento da biologia desta doença¹⁸.

O objetivo deste estudo foi buscar possível associação entre o HPV e o adenocarcinoma colorretal bem como a possibilidade desta relação com fatores prognósticos desta doença como o grau de diferenciação celular e o estádio dos pacientes.

MÉTODOS

Este estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brasil, sob o número 1377/08. Trata-se de um estudo do tipo caso controle, realizado em parceria com o Hospital Ophir Loyola e Instituto Ludwig de pesquisa sobre o Câncer.

Pacientes

Foram selecionados inicialmente um total de 182 pacientes no período de janeiro de 1999 a dezembro de 2003 divididos em dois grupos que após a aplicação de critérios de exclusão e inclusão compuseram um total de 79 casos para o Grupo Teste (GT) e 65 casos para o Grupo Controle (GC). Os critérios de inclusão utilizados foram pacientes admitidos no Hospital Ophir Loyola, Belém, PA, Brasil para tratamento e investigação diagnóstica de acordo com o grupo ao qual foram alocados, classificados de acordo com o sistema TNM, e que possuíssem prontuário médico e blocos de parafina com o tumor primário, arquivados no Departamento de Patologia, bem como os blocos dos pacientes que foram submetidos apenas à biópsia.

Os casos onde não foi possível se obter DNA viável para a realização de PCR foram excluídos, totalizando três casos no GT e 12 casos no GC. Outros cinco casos do GC foram excluídos devido a terem sido diagnosticados como adenomas, e os submetidos à radioterapia prévia.

Com relação aos dados descritivos os pacientes foram representados por 40,3% de mulheres e 50,7% de homens. A maioria dos casos estavam na 5ª década de vida (67,2%) e a localização retal correspondeu à 53,5% das lesões. A distribuição em relação ao estádio clínico foi representada por 10 casos no estádio I (12,7%), 27 no II (34,2%), 26 no III (32,9%) e 16 no IV (20,3%). A totalidade dos casos do GT eram representados por amostras de pacientes com adenocarcinoma colorretal. O GC tinha pacientes com mucosa normal (n=1, 0,7%), lesão inflamatória da mucosa (n=35, 24,3%), lesão polipóide da mucosa (n=28, 19,4%) e hipoanglionose (n=1, 0,7%).

Diagnóstico histopatológico

Após a coleta as amostras de tecido eram imediatamente imersas em solução de formol a 10% tamponado para preservação do material e encaminhadas patologia, fixados em formol, incluídos em parafina e processados por técnicas histopatológicas padrão. A avaliação diagnóstica era realizada por patologistas da instituição e as amostras que se enquadraram nos GT e GC eram selecionadas para a pesquisa.

Após esta seleção eram realizadas secções nos blocos de parafina contendo material genético dos casos selecionados e enviados em tubos estéreis ao Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer em São Paulo para realização de reação em

cadeia da polimerase - PCR.

Extração do DNA e PCR

Seções do tecido parafinado eram submetidas ao processo de desparafinização e digestão enzimática com proteinase K (200 µg/ml) a 56° C, durante dois a quatro dias. Após a digestão, procedeu-se à extração do DNA pelo método fenol-clorofórmio preconizado por Sambrook²².

Após a extração e purificação, as amostras de DNA eram inicialmente submetidas à reação em cadeia mediada pela polimerase (polymerase chain reaction, PCR) utilizando iniciadores ou primer (oligonucleotídeos iniciadores a serem utilizados em reações de amplificação de PCR) PCO3 e G74 que amplificam 100 pares de bases (pb) do gene β-globina humana¹ objetivando avaliar a suficiência e integridade do DNA presente em cada amostra.

As amostras positivas eram submetidas à PCR com iniciadores genéricos para HPV, GP5+/GP6+⁸, capazes de amplificar 140 pb do gene L1 de HPV.

Para demonstrar que não houve contaminação por DNA exógeno foi utilizado controle negativo, contendo todos os reagentes da mistura, exceto o DNA. Uma linhagem de células HeLa que continha o DNA de HPV 18 integrado²⁹ foi utilizada como controle positivo.

As amplificações foram efetuadas no equipamento termociclador, Eppendorf, modelo Mastercycle gradiente. Quarenta ciclos de amplificação foram efetuados empregando 1 min para a desnaturação a 95° C, 1 min de anelamento a 55° C e 1,5 min para o alongamento da cadeia a 72° C.

Os produtos da amplificação também chamados amplicons foram analisados em gel de poli-acrilamida a 7% corados pela prata.

Identificação de HPV por hibridização em pontos (Dot Blot)

Este método se baseia nos princípios gerais de hibridização, onde o produto amplificado é desnaturado e fixado em pontos em uma membrana de náilon. Os procedimentos de fixação do amplicon na membrana incluem aquecimento ou irradiação UV. Em seguida a membrana é recoberta com sondas específicas (isoladamente ou em coquetéis) para os HPV tipos 6,11,16,18,31,33,34,35,39,40,42,43,44,45,51,52,54,56 e 58 marcadas com fósforo radioativo (P³²). A hibridização é revelada após exposição das membranas ao filme de RX por 18 a 36 horas à 70°C. A hibridização com a sonda é reconhecida como evidência de que a seqüência nucleotídica pesquisada esta presente no espécime.

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 5 mL da solução 6xSSC, 10x Denhardt's, 0,5% SDS e 100µg de esperma de salmão desnaturado, sendo em seguida encubadas a 55° C por três horas (pré-hibridização).

Em seguida, adicionou-se as sondas radioativas à solução anterior, permanecendo incubadas a mesma temperatura por 12 a 24 h (hibridização); ao fim deste período, lavaram-se as membranas com solução 3xSSC, 0,5%SDS, em três etapas: a primeira por 10 min à temperatura ambiente e as outras duas por 30 min cada, à 55° C. Finalmente, as membranas foram expostas a um filme de RX (X-OmatK-Kodak) durante 18 a 36 horas à -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. Quarenta ciclos de amplificação foram efetivados empregando 1 min para a desnaturação à 95° C, 1 min de anelamento à 55° C e 1,5 min para o alongamento da cadeia à 72° C.

Os produtos da amplificação também chamados amplicons foram analisados em gel de poliacrilamida a 7% corados pela prata e analisados de forma semelhante aos para PCR genérica.

Análise estatística

Os resultados obtidos foram inicialmente submetidas à análise descritiva de todas as variáveis. Para as quantitativas ela foi feita através da observação dos valores mínimos e máximos, e do cálculo de médias, desvios-padrão e mediana. Para as variáveis qualitativas foi realizado o cálculo das frequências absolutas e relativas. Para se testar a homogeneidade entre as proporções foi utilizado o teste qui-quadrado ou o exato de Fisher quando ocorreram frequências esperadas menores do que cinco. Foi adotado o nível de significância de 5% para rejeição da hipótese de nulidade nas amostras analisadas.

RESULTADO

Durante o desenvolvimento da pesquisa foram excluídos do GT três casos devido à negatividade para o teste do gene da β globina humana para identificação de DNA viável. Da mesma forma no GC foi necessário excluir oito casos o que totalizou 65 casos no GC após a exclusão de outros cinco casos devido se tratarem de adenomas e 79 casos para o GT viáveis mostrando positividade para o gene da β globina humana em 92,9% das amostras.

Com a aplicação dos critérios de exclusão pôde-se analisar 144 pacientes com idade entre 25 a 85 anos (média de 57,85 anos com desvio-padrão de 15,27 anos e mediana de 58 anos). Oitenta e seis (59,7%) pacientes eram homens.

A presença do HPV foi observada em 41 pacientes, o que representou 28,5% do total de casos, tendo sido identificado apenas a presença do HPV 16 em todos os casos e, mesmo com a utilização de hibridização e PCR específica para o HPV 18, ele não foi encontrado em nenhum dos casos.

Setenta e nove (54,9%) pacientes apresentaram adenocarcinoma colorretal (GT) e 65 (45,1%) foram considerados como integrantes do GC.

Os grupos não apresentaram diferença significativa em relação a sexo, idade e localização do tumor o que representa a homogeneidade entre os grupos.

Dos 41 pacientes com HPV, 36 (45,6%) eram do GT e cinco (7,7%) do GC. Portanto houve diferença significativa entre os grupos (Tabela 1). O GT apresentou maior percentual de casos onde se identificou a presença do HPV quando comparado ao GC (teste qui-quadrado, p<0,001).

TABELA 1 – Caracterização dos pacientes segundo a presença ou ausência do DNA do HPV em ambos os grupos estudados

	HPV		p
	GT(%)	GC(%)	
Positivo	45,6	7,7	*p< 0,001
Negativo	54,4	92,3	
Total	100	100	

(*) nível descritivo de probabilidade do teste qui-quadrado; GT=grupo teste; GC=grupo controle

Entre os casos do GT não houve diferença significativa em relação ao sexo, idade e localização no que tange a presença

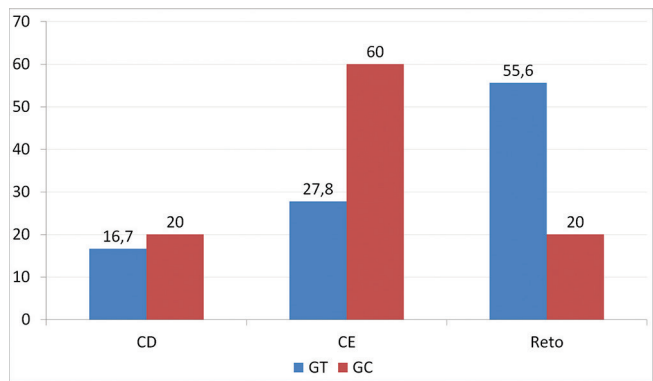
do HPV. Os pacientes deste grupo não apresentaram diferença significativa em relação ao estágio e ao grau de diferenciação celular dos pacientes portadores de câncer (Tabela 2).

TABELA 2 – Caracterização dos 79 pacientes segundo o estágio TNM, clínico e grau de diferenciação celular dos pacientes pertencentes ao Grupo Teste quanto à presença ou ausência do HPV em números absolutos e percentual

Variável	Categoria	HPV				p
		Positivo		Negativo		
		n	%	n	%	
Grau de diferenciação	I	4	11,1	8	18,6	0,269 ⁽²⁾
	II	26	72,2	31	72,1	
	III	3	8,3	4	9,3	
	IV	3	8,3	0	0,0	
Estadio T	1	1	2,8	1	2,3	0,877 ⁽²⁾
	2	5	13,9	8	18,6	
	3	27	75,0	29	67,4	
	4	3	8,3	5	11,6	
Estadio N	0	17	47,2	25	58,1	0,613 ⁽¹⁾
	1	11	30,6	11	25,6	
	2	8	22,2	7	16,3	
Estadio M	0	28	77,8	35	81,4	0,690 ⁽¹⁾
	1	8	22,2	8	18,6	
Estadio Clínico	I / II	14	38,9	23	53,5	0,195 ⁽¹⁾
	III / IV	22	61,1	20	46,5	

(1) nível descritivo de probabilidade do teste qui-quadrado; (2) nível descritivo de probabilidade do teste exato de Fisher

Em relação à localização do HPV ao local da coleta não foi evidenciado diferença estatisticamente significativa (Figura 1)



CD=côlon direito; CE=côlon esquerdo; GT=grupo teste; GC=grupo controle

FIGURA 1 - Distribuição dos casos em relação à presença do HPV e o local de coleta das amostras em ambos os grupos representados em percentual

DISCUSSÃO

O conhecimento a respeito dos mecanismos celulares e moleculares relacionados ao CCR vêm melhorando nos últimos anos; no entanto, mesmo com os avanços em suas modalidades diagnósticas e terapêuticas, como a cirurgia, quimioterapia e radioterapia, a taxa de sobrevivência em cinco anos mantém-se em torno de 40%¹⁰. Quando o tratamento é realizado em estádios iniciais esta sobrevivência pode chegar a 80% e nos de doença avançada apenas 20% estarão vivos após cinco anos¹⁷.

Segundo Ponz de Leon²⁰ apenas 3,7% dos casos de câncer colorretal têm efetivamente estabelecidas a sua causa específica, dentre estes os mais comuns são os HNPCC; entretanto, a grande maioria dos casos (96,3%) não tem sua causa esclarecida.

Com base na literatura pesquisada, é possível afirmar

que cerca de 15% das neoplasias, de uma forma geral, estão relacionadas a causa viral, contribuindo na carcinogênese humana, favorecendo instabilidade genética e induzindo aberrações cromossômicas⁷.

A partir desses dados pode-se formular a pergunta que se baseia na possibilidade de um vírus - neste caso o HPV - em promover alterações que possam acarretar o desenvolvimento do CCR. Essa possibilidade poderia favorecer a formulação de estratégias de controle da doença, que é responsável por elevada mortalidade e morbidade em todo o mundo.

A partir destes dados acredita-se que a controvérsia existente na literatura em relação a eventual associação do HPV com o CCR é uma das justificativas mais relevantes para a realização deste estudo.

Ao comparar os grupos pode-se observar que a variável faixa etária não se mostrou significativa; no entanto, a idade dos pacientes do GC apresentava-se inferior a do GT, fato este ocorrido provavelmente devido às diferenças com relação ao acometimento por doença maligna ser mais comum a partir da 5ª década de vida, diferentemente do que foi observado nos controles, ou seja, em não portadores de câncer.

As variáveis idade, gênero, e local de acometimento não mostraram diferenças, evidenciando que os grupos eram homogêneos.

Ao analisarmos o grupo câncer quanto a presença ou ausência do HPV em relação às variáveis sexo, idade, localização do tumor e outras variáveis associadas ao prognóstico não encontrou-se diferença. Outros autores também não observaram diferenças em relação às estas variáveis^{2,4,5}.

Em estudos que identificaram a presença do HPV em outros sítios diferentes do cólon - câncer de cabeça, pescoço²⁵ e pulmão⁶ -, foi possível observar que quando associados ao HPV de forma significativa estavam relacionados a melhor prognóstico, diferentemente do que foi encontrado neste estudo onde não foi possível observar esta relação.

Ao analisar-se a variável localização do tumor é possível referir que o DNA do papilomavírus estava presente em ambos os grupos, sendo mais comum na região do reto; no entanto, também foi encontrado nas demais regiões do intestino grosso, porém esta diferença não foi significativa o que pode estar relacionado às outras formas de contaminação desta região, diferentes da via retrógrada a partir da região anogenital.

A realização de PCR de HPV a partir de material embebido em parafina tem especificidade comparável à hibridização *in situ*. A PCR com a utilização de iniciadores específicos é capaz de detectar e amplificar pequenas porções do genoma do HPV de até 119 pares de base (pb) de fragmentos do papiloma vírus do tipo 16 ou 18, o que representa parte do gene E6 ou E7 do HPV²³.

A realização de hibridização do tipo Dot Blot tem sido utilizada em vários estudos no intuito de detectar o DNA do papilomavírus humano em material extraído por meio de biópsias da cérvix uterina^{11,16}. Este método apresenta menor sensibilidade e especificidade quando comparado à hibridização do tipo Southern Blot; este dado pode explicar a variação quanto à prevalência do HPV no mundo nos mais diversos sítios do corpo humano, em função das técnicas utilizadas para a detecção do DNA do HPV; estas variações em relação as técnicas empregadas podem estar sub-estimando a real prevalência do HPV¹¹.

Neste estudo foi realizado inicialmente uma PCR com iniciadores genéricos para HPV, GP5+/GP6+¹⁷, capazes de amplificar 140 pb do gene L1 de HPV. Após este procedimento as amostras foram submetidas à hibridização do tipo Dot Blot com o intuito de identificar os HPV tipos 6,11,16,18,31,33,34,35,39,40,42,43,44,45,51,52,54,56 e 58; no entanto, somente foi possível identificar o HPV 16.

A partir destes dados optou-se por realizar PCR com iniciadores específicos para E7 de HPV 16 e também 18 de acordo com o proposto por Molina¹⁴, devido outros autores terem evidenciado a presença do DNA do HPV 18 em amostras de CCR^{2,5,9}.

Após realizar-se PCR com iniciadores específicos para E7 de HPV 16 e 18, não foi possível identificar o HPV 18, dado este consistente com o observado por Weinberger³⁰ onde não há referência em seus resultados a presença do HPV 18 por meio da utilização de PCR em tempo real, evidenciando apenas o HPV 16 e relacionando-o de forma significativa aos pacientes em estadio inicial.

Por outro lado, Lee⁹ identificou a presença do DNA do HPV 18 em cerca de 84% de suas amostras por meio de PCR seguida de hibridização do tipo Southern Blot para tipagem do HPV 18. Estes resultados vão de encontro ao encontrado nesta pesquisa possivelmente devido às diferenças demográficas, haja vista que a população estudada por Lee⁹ era asiática e neste estudo como no de Weinberger³⁰ era ocidental.

Bodagui² evidenciou que o HPV 18 estava presente em apenas 13% de suas amostras, concluindo que o HPV 16 (82% dos casos) talvez esteja relacionado ao desenvolvimento do CCR e que ele não seria originário da região anogenital, pois houve maior incidência no ceco e cólon ascendente de forma não significativa.

Com a utilização de técnicas de detecção semelhante ao empregado neste estudo observou-se variação em relação à presença do HPV que vai desde 32% em estudo de Mcgregor¹³ até 84% encontrado por Lee⁹. Nestas amostras observou-se a presença do HPV 16 em 45,6% nas com CCR e ao comparar-se com o grupo controle evidenciou-se diferença significativa, o que pode estar relacionado ao desenvolvimento do CCR.

Diferentemente de outros autores evidenciou-se a presença do HPV 16 em amostras de pacientes do GC em 7,7% o que pode estar relacionado ao método de coleta dos tecidos que foi a partir de colonoscopias, o que poderia contaminar as amostras com HPV a partir da região anogenital.

No Brasil o primeiro estudo relacionando a presença do HPV com o CCR foi realizado no Rio Grande do Sul por Damin⁵ onde foi observado que 83,3% das amostras apresentavam positividade para o DNA do HPV, sendo o tipo 16 o mais comumente encontrado representando cerca de 68,3% dos casos, não havendo relação com fatores prognósticos. Entretanto, sugere que o HPV talvez esteja associado à patogênese do CCR.

Neste estudo a prevalência do HPV foi de 45,6%, diferentemente dos dados obtidos por Damin⁵. Esta variação pode ter ocorrido devido à menor incidência de CCR no estado do Pará quando comparado ao Rio Grande do Sul; outro fator associado pode ter sido a utilização nesta pesquisa de material oriundo de amostras embebidas em material parafinado para preservação, o que sabidamente pode levar a degradação do DNA nas amostras, diferentemente da técnica realizada por Damin⁵ que utilizou material fresco obtido durante o ato cirúrgico e preservado em nitrogênio líquido.

Não foi aqui encontrada associação significativa entre a presença do HPV com o estadiamento e o grau de diferenciação celular dos pacientes que apresentaram o HPV quando comparados aos casos onde não foi evidenciado pelas técnicas aqui empregadas.

Outros autores ao investigarem essa associação também não conseguiram demonstrar a associação com o CCR, como foi observado por Cheng⁴. Não se pode descartar a possibilidade da utilização nesta pesquisa de material arquivado e embebido em parafina ter sido responsável pela falta de evidência. No entanto, o estudo realizado por Damin⁵ utilizou material fresco obtido no momento da operação. Os achados aqui obtidos são coincidentes com os da literatura

atual na qual observa-se a presença do HPV em amostras teciduais de pacientes portadores de CCR. No entanto, outros autores não evidenciaram o HPV, o que poderia estar relacionado às mais diversas técnicas de identificação do DNA do HPV utilizadas nesses estudos.

É possível associar a presença do HPV com o CCR e aqui em com o HPV 16, não havendo relação com o HPV 18.

Observou-se algumas limitações no transcorrer deste estudo, porém elas não invalidam os resultados encontrados. Acredita-se que as conclusões obtidas podem ser importantes contribuições às controvérsias que, no entanto, ainda persistem mesmo com a realização de estudos anteriores. O CCR é doença de origem multifatorial e esta demonstração de que o HPV está associado ao CCR pode favorecer alternativas para diminuir o aparecimento desse câncer.

CONCLUSÃO

O papilomavírus humano tipo 16 está presente em indivíduos portadores de carcinoma colorretal. No entanto, não está relacionado com o estadiamento e o grau de diferenciação.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos em especial a Sra. Maria Antonieta A. Andreoli, supervisora de Laboratório do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer no Hospital Alemão Oswaldo Cruz pela sua colaboração na realização de PCR e ensinamentos sobre a técnica e procedimentos.

REFERÊNCIAS

- Bauer HM, Ting Y, Greer CE, Chambers JC, Tashiro CJ, Chimera J, Reingold A, Manos M. Genital Human papillomavirus infection in female university Students as Determined by a PCR-Based Method. *JAMA*. 1991; 265: 472-77.
- 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.
- Buyru N, Tezol A, Dalay N. Coexistence of K-ras mutations and HPV infection in colon cancer. *BMC Cancer*. 2005; 6:115.
- Cheng JY, Sheu LF, Lin JC, Meng CL. Detection of human papillomavirus DNA in colorectal adenomas. *Arch Surg*. 1995; 130: 73-6.
- Damin DC, Caetano MB, Rosito MA, Schwartzmann G, Damin AS, Frazzon AP, Ruppenthal RD, Alexandre CO. Evidence for an association of human papillomavirus infection and colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2007; 33(5):569-74.
- Giuliani L, Jaxmar T, Casadio C, Gariglio M, Manna A, D'Antonio D, Syrjanen K, Favalli C, Ciotti M. Detection of oncogenic viruses (SV40, BKV, JCV, HCMV, HPV) and p53 codon 72 polymorphism in lung carcinoma. *Lung Cancer*. 2007; 57: 273-281.
- Giuliani L, Ronci C, Bonifacio D, Di Bonito L, Favalli C, Perno CF, Syrjanen K, Ciotti M. Detection of Oncogenic DNA Viruses In Colorectal Cancer. *Anticancer Research*. 2008; 28: 1405-10.
- Husman AMR, Walboomers JMM, van den Brule AJC, Meijer CJLM, Snijders PJF. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3 ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *Journal of General Virology*. 1995; 76: 1057-62.
- Lee YM, Leu SY, Chiang H, Fung CP, Iiu WT. Human papillomavirus type 18 in colorectal cancer. *J Microbiol Immunol Infect*. 2001; 34: 87-91.
- Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJC. The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *British Journal of Surgery*. 2002; 89: 845-60.
- Low SH, Thong TW, Ho TH, Lee YS, Morita T, Singh M, Yap EH, Chan YC. Prevalence of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical carcinomas: a study by Dot and Southern blot hybridization and the polymerase chain reaction. *Jpn. J. Cancer Res*. 1990; 81: 1118-23.
- Magi JC, Rodrigues MRS, Guerra GMLSR, Costa MC, Costa ACL, Villa LL, Formiga GJS. Resultados do Exame Anátomo- Patológico e "Polymerase Chain Reaction (PCR)" na Forma Clínica e Subclínica da Infecção Anal pelo Papilomavírus Humano (HPV) - Estudo em Quatro Grupos de Pacientes. *Rev bras Coloproct*. 2006; 26(4): 406-413.
- McGregor B, Byrne P, Kirgan D, Albright J, Manalo P, Hall P. Confirmation of the association of human papillomavirus with human colon cancer. *The American Journal of Surgery*. 1993; 166: 738-42.
- Molina AL, Tobo PR. Uso das técnicas de biologia molecular para diagnóstico. *Einstein*. 2004; 2(2): 136-9.
- Muñoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *Journal of Clinical Virology*. 2000; 19: 1-5.
- Noronha V, Mello W, Villa L, Brito A, Macedo R, Bisi F, Mota R, Sassamoto K, Monteiro T, Linhares A. Papilomavírus associado a lesões de cérvix uterina. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina tropical*. 1999; 32(3): 235-40.
- Palma RT, Waisberg J, Simões AB, Bromberg SH, Appolonio F. Significado prognóstico das micrometastases do carcinoma colorretal. Detecção imunistoquímica com anticorpos anticitoqueratina AE1/AE3. *Rev Col Bras Cir*. 2002; 29(3): 131-7.
- 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 Disease*. 2005; 7(5):492-5.
- Pinho M, Rossi BM. Conceitos atuais sobre carcinogênese colorretal. *Rev Bras Coloproct*. 1999; 19(1): 57-60.
- Ponz de Leon M, Benatti P, Borghi F, Pedroni M, Scarselli A, Di Gregorio C, Losi L, Viel A, Genuardi M, Abbati G, Rossi G, Menigatti M, Lamberti I, Ponti G, Roncucci L. Aetiology of colorectal cancer and relevance of monogenic inheritance. *Gut*. 2004; 53: 115-122.
- Prado JC, Calleja-Macias IE, Bernard HU, Kalantari M, Macay SA, Allan B, ET al. Worldwide genomic diversity of the human papillomavirus-53, 56, and 66, a group of high-risk HPVs unrelated to HPV-16 and HPV-18. *Virology*. 2005; 340: 95-104.
- Sambrook J, Russel DW. *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
- Shibata D, Fu YS, Gupta JW, Shah KV, Arnheim N, Martin WJ. Detection of human papillomavirus in normal and dysplastic tissue by the polymerase chain reaction. *Laboratory Investigation*. 1988; 59(4): 555-9.
- Soares PC, Ferreira S, Villa LL, Matos D. Identificação do papilomavírus humano em doentes com carcinoma de células escamosas do canal anal e sua relação com o grau de diferenciação celular e estadiamento. *Rev bras coloproct*. 2011; 31(1): 8-16.
- Syrjanen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol*. 2005; 32S: S59-S66.
- Villa LL, Franco ELF. Epidemiologic correlates of cervical neoplasia and risk of human papillomavirus infection in asymptomatic women in Brazil. *J Natl Cancer Inst*. 1989; 81: 332-40.
- Villa LL, Sichero L, Rahal P, Caballero O, Ferenczy A, Rohan T, Franco EL. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *Journal of General Virology*. 2000; 81: 2959-68.
- Vogelstein B, Fearon BA, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AMM, Bos JL. Genetic Alterations Colorectal-tumor Development. *N Engl J Med*. 1988; 319(9): 525-32.
- Yee C, Krishnan-Hewlett I, Baker CC, Schlegel R, Howley PM. Presence and expression of Human papillomavirus sequences in Human Cervical Carcinoma Cell Lines. *Am J Pathol*. 1985; 119: 361-66.
- Weinberger PM, Yu Z, Zerkowski M, Chung G, Camp RL, Rimm DL, Psyrris A. A possible association of human papilloma virus with a subset of colorectal adenocarcinomas. *Journal of Clinical Oncology Suppl*. 2004 (abstract); 22(14s): 3544.