Análise da presença de HPV por imunorreatividade para p16 em hemorroidas externas

Analysis of Human Papillomavirus (HPV) Detection by p16 Immunoreactivity in External Hemorrhoids

Júlia Yumi Fujiki[1], *Sofia Alessandra Kotsifas*[1], *Laura Mendes Lopes*[1], *Jennifer Thais de Barros Ferro*[1], *Ana Cristina Lira Sobral*[1]

[1] Faculdade Evangélica Mackenzie do Paraná. Curitiba, PR, Brasil.

Resumo

Introdução: O papilomavírus humano (HPV) é considerado a infecção sexualmente transmissível com maior prevalência na população, podendo conduzir o tecido epitelial a expressar fenômenos neoplásicos. Devido à predileção do HPV por epitélio estratificado, o vírus também pode se manifestar em tecido hemorroidário. *Objetivo*: Avaliar a positividade para o marcador p16 no tecido hemorroidário externo e analisar sua positividade por faixas etárias e sexo. *Materiais e métodos:* Estudo retrospectivo observacional com análise imuno-histoquímica com anticorpo p16 para verificar o risco de progressão oncogênica no tecido hemorroidário de 44 pacientes com alterações celulares compatíveis com infecção pelo HPV. *Resultado*: Dos 44 pacientes analisados, 26 eram do sexo feminino e 18 do sexo masculino, sendo que 84% dos pacientes tinham 36 anos ou mais. Os pacientes que apresentaram positividade têm em média 51,62 anos. Cinquenta e quatro por cento dos pacientes do sexo feminino apresentaram positividade frente a 39% do sexo masculino. *Conclusão*: Dos pacientes submetidos a hemorroidectomia com alterações similares a coilócitos, cerca de 50% expressavam positividade para o p16, podendo beneficiar-se, portanto, de um acompanhamento e pesquisa para p16 a fim de detectar lesões pré-cancerosas.

Palavras-chave: Hemorroidas; Infecções por Papilomavírus; Imuno-Histoquímica.

Abstract

Introduction: Human Papillomavirus (HPV) is considered the most prevalent sexually transmitted infection in the population and can induce neoplastic changes in epithelial tissue. Given HPV's tropism for stratified epithelium, the virus may also manifest in hemorrhoidal tissue. *Objective*: To assess p16 marker positivity in external hemorrhoidal tissue and to analyze its distribution by age group and sex. *Materials and Methods*: This was a retrospective observational study involving immunohistochemical analysis using the p16 antibody to evaluate the risk of oncogenic progression in hemorrhoidal tissue from 44 patients with cellular changes consistent with HPV infection. Results: Among the 44 patients analyzed, 26 were female and 18 were male; 84% were aged 36 years or older. The mean age of p16-positive patients was 51.62 years. Fifty-four percent of female patients tested positive, compared with 39% of male patients. *Conclusion*: Among patients undergoing hemorrhoidectomy with alterations resembling koilocytes, approximately 50% showed p16 positivity and may therefore benefit from p16 testing and extended follow-up to detect precancerous lesions.

Keywords: Hemorrhoids; Papillomavirus infection; Immunohistochemistry.

Correspondência
Júlia Yumi Fujiki
E-mail: juliafujiki@hotmail.com

Recebido em 07/10/2024 | Aprovado em 03/01/2025 | DOI: 10.21877/2448-3877.202500201.pt

INTRODUÇÃO

O papilomavírus humano (HPV) é um DNA viral de fita dupla pertencente à família *Papillomaviridae*[1] que possui tropismo para tecidos epiteliais[2] por se beneficiar da renovação celular para adentrar no epitélio e infectar as células da camada basal.[3] O HPV é a infecção sexualmente transmissível (IST) mais comum no mundo.[4]

O HPV pode ser classificado em de baixo risco, responsável por verrugas anogenitais e cutâneas, e de alto risco, que pode levar ao desenvolvimento de cânceres anogenitais e orofaríngeos,[4] os quais possuem as oncoproteínas E6 e E7 específicas para a proliferação celular e inativação dos *checkpoints* do ciclo celular, pois interferem nas proteínas P53 e PRb reguladoras do ciclo.[3,5] Assim, proteínas do HPV podem conduzir o tecido epitelial para fenótipos neoplásicos,[6] podendo ocorrer em tecidos como o hemorroidário, o qual favorece o tropismo do vírus do HPV, que frequentemente é encontrado de forma acidental após análise patológica do tecido removido na hemorroidectomia.

O tratamento padrão-ouro para hemorroidas externas (HE) é a hemorroidectomia, sendo preconizado, atualmente, um acompanhamento por três anos para o paciente operado para avaliação da possibilidade de recidiva hemorroidária. No entanto, o HPV pode estar presente no tecido e apresentar-se como fator de risco para desenvolvimento de câncer anorretal e permanecer latente no tecido residual por até cinco anos. Nesse sentido, mostra-se necessária avaliação do tecido removido durante a hemorroidectomia para que, em casos de pacientes portadores do HPV, esse acompanhamento seja ampliado de modo a contemplar o maior período de latência do vírus no tecido hemorroidário.

OBJETIVO

Avaliar a positividade para o marcador p16 no tecido hemorroidário externo e analisar sua positividade por faixas etárias e sexo.

MATERIAL E MÉTODO

Estudo retrospectivo observacional em que foi realizado levantamento dos laudos anatomopatológicos de 44 pacientes submetidos a hemorroidectomia que apresentavam alterações celulares compatíveis com coilocitose na microscopia óptica (MO).

Após a seleção, as áreas com essas alterações celulares foram demarcadas e localizadas através do sistema de espelho, no qual a lâmina marcada é utilizada para localização da mesma região no bloco doador. Foi realizada uma perfuração no bloco doador na área previamente marcada com a obtenção de cilindro de tecido com posterior implantação deste tecido no bloco receptor (Figura 1A). Cada fragmento amostral retirado do bloco doador foi colocado no bloco-receptor conforme o mapa "plano cartesiano" (Figura 1B). Dessa forma, foi realizada a confecção de blocos teciduais multiamostrais (TMAs) (Figura 1C) utilizados para a confecção de lâminas multiamostrais, com as regiões amostrais representativas de lesão (Figura 1D).

As lâminas histológicas provenientes dos blocos em TMA artesanal foram submetidas ao processo de imuno-histoquímica com o marcador p16 em duas fases: aplicação da técnica de imuno-histoquímica padronizada no material do estudo e a leitura microscópica da área positiva nas lâminas, tendo como controle duas lâminas de fígado imunocoradas com o anticorpo p16, utilizadas como padrão para definição em série da área média de expressão dos marcadores nas demais lâminas. Em sequência, as leituras microscópicas foram planilhadas em tabela Excel e submetidas a tratamento estatístico.

Variáveis contínuas foram expressas como média ± desvio padrão e comparadas com os testes t de Student e Mann-Whitney. Variáveis categóricas foram expressas em porcentagens e comparadas com o teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher, conforme apropriado. Valores de p menores que 0,05 são considerados estatisticamente significativos.

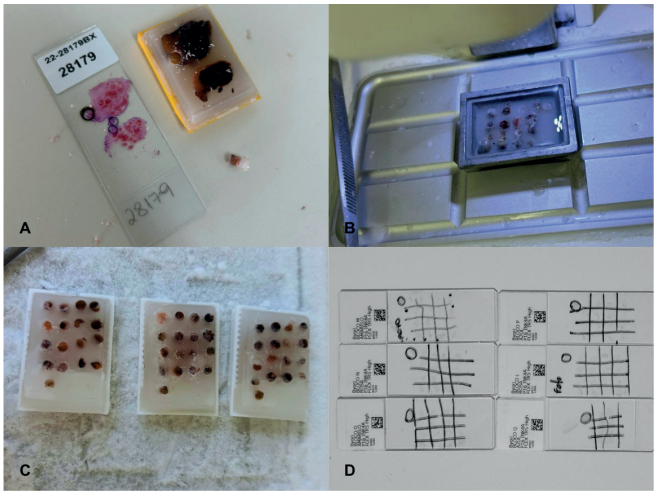


Figura 1
Confecção de lâminas amostrais

Os pacientes selecionados foram analisados em positividade e negatividade para o p16 após imuno-histoquímica, correlacionando com a prevalência por sexo e idade, dividida em três faixas etárias (18 a 25, 26 a 35 e acima de 36 anos).

RESULTADOS

Foram coletadas amostras de tecido da mucosa hemorroidária de 44 pacientes com alterações celulares coilocitárias, indicando a presença de HPV, sendo 26 do sexo feminino e 18 do sexo masculino. Dois tinham entre 18 a 25 anos (4,55%), 5 entre 26 a 35 anos (11,36%) e 37 possuíam 36 anos ou mais (84,09%). A média de idade foi de 48,34 anos.

Dos 44 pacientes, 21 apresentaram o tecido hemorroidário corado com a imuno-histoquímica p16, indicando risco de progressão oncológica (47,73%) (Figura 2).

Os casos positivos têm em média 51,62 anos, enquanto os negativos têm em média 45,35 anos. Não houve diferença significativa entre os grupos quanto à idade (p=0,13) (Tabela 1).

Das 26 pacientes do sexo feminino, quase 54% apresentaram positividade, enquanto entre os pacientes do sexo masculino houve positividade em quase 39% dos casos. No entanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa (p=0,33).

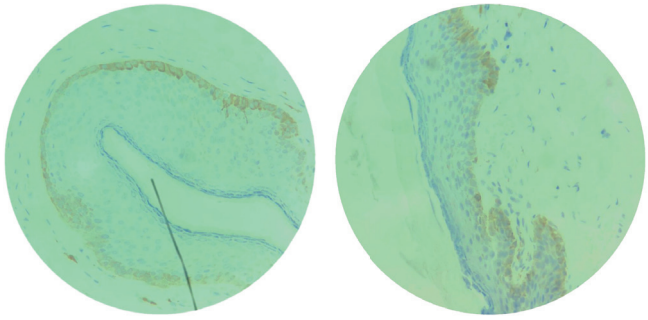


Figura 2

Análise da positividade

*Amostra de tecido hemorroidário para o p16 (área marrom x400)

Tabela 1

Relação entre idade e positividade

	Idade				
Positividade	**Média**	**n**	**DP**	**Mínimo**	**Máximo**
Sim	51,62	21	14,86	25	96
Não	45,35	23	11,44	20	68
Total	48,34	44	13,41	20	96

Fonte: As autoras (2023)

DISCUSSÃO

A infecção pelo HPV está associada ao carcinoma de células escamosas e à neoplasia intraepitelial no canal anal, região perianal, vulva, vagina e pênis.[7] O tecido hemorroidário, por apresentar tecido epitelial escamoso, pode ter suas células basais como alvo para a infecção pelo HPV, o que pode atuar como fator predisponente para displasias e neoplasias.[8,9] Aproximadamente 48% dos pacientes portadores de HE submetidos a hemorroidectomia e com alterações celulares compatíveis com coilócito apresentaram amostra corada pela imuno-histoquímica com o marcador p16, indicando o risco de desenvolvimento oncológico na presença de HPV em seu tecido.

Segundo a metanálise de Pelizzer et al. (2016),[10] a relação entre o câncer colorretal e o HPV é sólida: em 51,5% dos cânceres colorretais analisados foi encontrado HPV, e a maioria teve associação com o HPV tipos 16 e 18, com incidência semelhante entre os sexos. A confirmação das neoplasias estudadas foi mais frequentemente estabelecida em estágios já avançados, provavelmente por conta de seu diagnóstico tardio, que talvez possa ser justificado por falhas nos métodos de rastreio desta afecção.[10]

Ao realizar a imuno-histoquímica com o marcador p16 nos tecidos com alterações sugestivas de presença de coilocitose, este estudo observou que dos 44 pacientes submetidos à hemorroidectomia 47,73% (21) apresentaram positividade na imuno-histoquímica do p16. Este achado diverge relativamente quando comparado ao da pesquisa de Jian-xiang Geng et al. (2011),[11] que utilizou PCR quantitativo fluorescente para pesquisa do HPV e demonstrou que 69,6% de suas amostras de hemorroida externa apresentavam HPV. Tal discrepância pode ser justificada pela sensibilidade e especificidade das diferentes técnicas utilizadas nos estudos comparados, visto que o PCR quantitativo, utilizado no estudo de Jian-xiang Geng et al (2011)[11] é uma técnica muito sensível, que detecta o vírus mesmo quando presente em menor quantidade, enquanto a imunohistoquímica com p16, utilizada neste estudo, mostra-se eficaz para detectar alterações provocadas pelo HPV, as quais usualmente evoluem para lesões com alto potencial cancerígeno.[12,13]

A escolha do uso, para este estudo, do marcador p16, na imuno-histoquímica, se deu pelo seu elevado valor preditivo negativo. Dessa forma, a ausência de expressão elevada de p16 em amostras de tecido é altamente indicativa da ausência de risco de displasia pela infecção por HPV, o que torna o p16 particularmente importante na triagem para identificação de

lesões,[14] desempenhando papel crucial na prática clínica ao ajudar a determinar quais pacientes podem ser monitorados com segurança ao longo do tempo, sem a necessidade de procedimentos invasivos, uma vez que a hemorroidectomia é um procedimento menos agressivo que a remoção de porções do tecido anorretal e, além disso, a presença de infecção na hemorroida aumenta a probabilidade de haver alterações semelhantes nos demais tecidos suscetíveis a essa infecção.[15] O estudo de Lu DW et al. (2003)[16] realizado com carcinoma espinocelular anorretal encontrou em 100% dos seus casos positividade citoplasmática para p16, enquanto o epitélio escamoso e mucoso não neoplásico adjacente à neoplasia não apresentou nenhuma coloração nuclear evidente. Dessa forma, neste estudo as amostras negativas (52,27%) podem ter o HPV como um fator de risco descartado no desenvolvimento do carcinoma anorretal.

Para uma análise baseada nas faixas etárias, os pacientes foram separados em três grupos etários: 18 a 25 anos, 26 a 36 anos e maior que 36 anos. Com isso, foi possível observar que pouco mais de 84% dos pacientes portadores de DH apresentavam 36 anos ou mais, sendo a média de 48,34 anos (variando de 20 a 96 anos), corroborando com os achados de Cristea e Lewis (2023),[17] que afirmam que o intervalo de idade mais prevalente para a DH é de 45 a 65 anos. No entanto, apesar de a idade mais avançada ser fator de risco para o desenvolvimento de HE, este estudo demonstrou que não houve relação significativa entre idade e positividade (p=0,25). Desse modo, não é possível atrelar a coexistência do HPV no tecido à idade do paciente, implicando que o rastreio de infecção pelo HPV no tecido hemorroidário deve ser oferecido a todos os pacientes submetidos a hemorroidectomia por DH, independente de sua idade.

De maneira semelhante, no que se refere à presença da DH por sexo, foi observado que dos 44 pacientes selecionados, 59,09% (26) eram do sexo feminino, percentual similar ao encontrado em estudo[9] sobre a DH no Brasil, em que a incidência é de 53,9% em mulheres, demonstrando que o sexo não é um fator de risco para desenvolvimento de DH. Além disso, ao analisar o p16 no tecido hemorroidário removido, percebeu-se que quase 54% das pacientes do presente estudo apresentaram positividade, enquanto que, entre os homens, a positividade foi de 39%. Apesar de a positividade ser mais prevalente no sexo feminino nesta pesquisa, a diferença entre os sexos não foi significativa (p=0,33), reforçando que o risco neoplásico provocado pela coexistência do HPV no tecido também não pode ser atrelado ao sexo do paciente. Em concordância a esses achados, outras pesquisas sobre HPV também evidenciaram que não há distinção entre os gêneros e a incidência da infecção.[10] Nesse sentido, o sexo do paciente também não deve ser fator a ser considerado pensando no rastreamento de uma possível infecção pelo HPV no tecido hemorroidário.

Limitações do estudo

Como se trata de um estudo retrospectivo observacional, não se pôde avaliar o comportamento de risco do paciente para a infecção do vírus do HPV, de modo que não foi possível correlacionar se esses pacientes poderiam apresentar maiores taxas de incidência de lesões por HPV no tecido hemorroidário. No entanto, mesmo que esta afirmação seja verdadeira, não há motivo para pensar que esses pacientes seriam beneficiados de um segmento pós hemorroidectomia diferente do preconizado para os demais pacientes. Por fim, também por limitação do aspecto retrospectivo do estudo, não foi possível avaliar a incidência de CA anorretal em pacientes que não tiveram o seguimento ambulatorial estendido pelo período máximo de latência do HPV no tecido hemorroidário, ou seja, após cinco anos do procedimento.

Essa pesquisa não analisou lâminas com amostras de tecido retal interno. Com isso, não é possível afirmar que a presença de alterações coilocitárias no tecido hemorroidário externo indique que também existam alterações no tecido interno, o que poderia atuar como fator de risco para desenvolvimento de lesões precursoras de câncer anorretal. Associado a isso, o alto valor preditivo negativo do marcador p16 no tecido com HPV utilizado para analisar as amostras reduz o risco de lesões presentes não serem detectadas. No entanto, não há motivo para pensar que os pacientes com positividade não seriam beneficiados de um segmento pós-hemorroidectomia diferente do preconizado para os demais pacientes, visto que a infecção pelo HPV tem no seu rastreio uma importante forma de detecção precoce de lesões pré-neoplásicas e, consequentemente, prevenção de casos.

Implicações clínicas

Visto que a conduta, em casos de HE, é a hemorroidectomia associada a um acompanhamento clínico por três anos para o paciente operado, e diante do fato de a latência do HPV no tecido perdurar por até cinco anos, mostra-se necessária uma cuidadosa avaliação do tecido hemorroidário para que, em casos de pacientes com a presença de células com núcleo excêntrico e halo claro perinuclear, indicativas da presença da infecção pelo HPV, à MO, o acompanhamento pós-hemorroidectomia seja ampliado de modo a investigar o

risco de desenvolvimento neoplásico pela presença do HPV no tecido anorretal interior e contemplando o período de latência do vírus. Essa discrepância entre o período de latência do HPV em tecido hemorroidário e o tempo de seguimento clínico pós-hemorroidectomia justifica, portanto, a adoção de um protocolo investigativo que atue mais ativamente no diagnóstico precoce, tratamento e prevenção dessas lesões, para evitar, assim, a ocorrência de neoplasias ou realizar o controle de seus danos precocemente.

CONCLUSÃO

Os dados obtidos neste estudo demonstram que dos pacientes submetidos a hemorroidectomia e que apresentaram alterações à MO similares a coilócitos, indicativos de HPV, cerca de metade expressava positividade para o p16, sendo que a idade e o sexo não se demonstraram como fator de risco.

Nesse sentido, reforça-se que pacientes submetidos à hemorroidectomia que apresentarem tais achados à MO podem se beneficiar de um acompanhamento e pesquisa para p16 a fim de detectar lesões pré-cancerosas.

REFERÊNCIAS

1. Mateos-Lindemann ML, Pérez-Castro S, Rodríguez-Iglesias M, Pérez-Gracia MT. Diagnóstico microbiológico de la infecção por vírus do papiloma humano. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2017;35(9):593-602.
2. Magalhães GM, Vieira EC, Garcia LC, de Lourdes Ribeiro De Carvalho-Leite M, Guedes ACM, Araújo MG. Update on human papilloma virus - part I: epidemiology, pathogenesis, and clinical spectrum. An Bras Dermatol. 2021;96(1):1-6.
3. McBride AA. Oncogenic human papillomaviruses. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2017;372(1732):1-9.
4. Kombe AJK, Li B, Zahid A, Mengist HM, Bounda G, Zhou Y, et al. Epidemiology and burden of human papillomavirus and related diseases, molecular pathogenesis, and vaccine evaluation. Front Public Health. 2020;8:552028.
5. Monsonego J. Cancer anal et papillomavirus humains: une pathologie en miroir de celle du cancer du col utérin. Gynécologie Obstétrique & Fertilité. 2010;38(4):250-254.
6. Kranjec C, Doorbar J. Human papillomavirus infection and induction of neoplasia: a matter of fitness. Curr Opin Virol. 2016;20:129-136.
7. Mahajan A. Practical issues in the application of p16 immunohistochemistry in diagnostic pathology. Hum Pathol. 2016;51:64-74. doi:10.1016/j.humpath.2015.12.021.
8. Petca A, Borislavschi A, Zvanca ME, Petca R, Sandru F, Dumitrascu MC. Non-sexual HPV transmission and role of vaccination for a better future (Review). Exp Ther Med. 2020;20(6):1-5.
9. Da Cruz GM, Ferreira RMRS, Neve PM. Doença hemorroidária: aspectos epidemiológicos e diagnósticos de 9.289 pacientes portadores de doença hemorroidária. Rev Bras Colo-Proctol. 2006;26(1):6-23.
10. Pelizzer T, Dias CP, Poeta J, Torriani T, Roncada C. Prevalência de câncer colorretal associado ao papilomavírus humano: uma revisão sistemática com metanálise. Rev Bras Epidemiol. 2016;19(4):791-802.
11. Geng JX, Fan ZM, Ding YJ, Chen JN, Zhang SM, Zhou W, Huang SL, Han DM. [Analysis on human papillomavirus 16 and 18 types infection among 805 patients with common anorectal lesions]. Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi. 2011;14(12):958-60.
12. Castello F, Vidal B, Do M, Soares D, Nascimento B, Tereza C, et al. Análise crítica dos métodos moleculares para detecção do papilomavírus humano: revisão da literatura. Rev Bras Patol Med Lab. 2012;40(5).
13. Yonamine P, Junqueira M, Rodrigues J, Pereira S, Pandossio T, Rodrigues D, et al. Associação entre a expressão de p16 e neoplasia intra-epitelial cervical. Arq Cienc Saude. 2009;16(4):161-6.
14. Salim RC, Lima TM, Heinke T, Prigenzi KCK, Speck NMG, Focchi GRA. Cervical squamous intraepithelial lesions grades 1 and 2: value of an alternative morphological classification and of p16 immunohistochemistry in the prediction of clinical outcome. J Bras Patol Med Lab. 2017;53(5):313-9.
15. Gonçalves JES, et al. The role of p16 as putative biomarker for cervical neoplasia: A controversial issue? MedExpress. 2017;4(6).
16. Lu DW, El-Mofty SK, Wang HL. Expression of p16, Rb, and p53 proteins in squamous cell carcinomas of the anorectal region harboring human papillomavirus DNA. Mod Pathol. 2003;16(7):692-9. doi:10.1097/01.MP.0000077417.08371.CE.
17. Cristea C, Lewis CR. Hemorrhoidectomy. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023.