

Prevalência de HPV em amostras cervicovaginais sem alterações citológicas

Hpv prevalence in cervicovaginal samples without cytological changes

Joseana de Oliveira¹, Tangara Jorge Mutran¹, Vinicius Canato Santana¹

Resumo

Introdução: A detecção precoce de uma infecção por HPV em amostras cervicovaginais, sem alteração histopatológica, em mulheres assintomáticas pode trazer uma possibilidade de prevenção do câncer de colo do útero. **Objetivo:** Investigar a presença de material genético de HPV em amostras cervicovaginais, sem alterações citológicas. **Material e Métodos:** Amostras de raspado cervicovaginal de 50 mulheres sexualmente ativas entre 18 e 30 anos, sem lesão uterina à colposcopia. A extração do DNA foi realizada utilizando um sistema comercial baseado em colunas de sílica. A detecção do material genético viral se deu por meio da técnica de PCR qualitativa, com *primers* GP5 + / GP6 +, seguido de amplificação por MY09 / MY11 para comprovação de resultados. Os resultados foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 3% com 30 minutos de corrida. **Resultados:** Foi identificado material genético de HPV em 44% das amostras testadas, e, além disso, verificamos que em 55% dos casos em que a análise citológica foi normal, o DNA viral estava presente. **Conclusão:** Foi detectado DNA de HPV mesmo em amostras cervicovaginais sem alterações citológicas. Sendo assim, comprova-se a existência de infecções subclínicas que podem ser diagnosticadas pelo método de PCR.

Descritores: Papillomaviridae, Reação em Cadeia da Polimerase, Patologia.

Abstract

Introduction: Early detection of an HPV infection in cervicovaginal samples with no histopathological changes in asymptomatic women may provide a possibility of cervical cancer prevention. **Objective:** Investigate the presence of HPV genetic material in cervicovaginal samples of women without cytological abnormalities. **Material and Methods:** We collected cervicovaginal scrapings of 50 sexually active women aged from 18 to 30 years without a uterine lesion at colposcopy. DNA extraction was performed using a commercial system based on silica columns. The detection of the viral genetic material was done using the qualitative PCR technique, with primers GP5 + / GP6 +, followed by amplification by MY09 / MY11 to prove the results. The results were evaluated by electrophoresis in 3% agarose gel with 30 minutes of running. **Results:** HPV genetic material was identified in 44% of the samples tested. In addition, we found that in 55% of the cases in which cytological analysis was normal, viral DNA was present. **Conclusion:** HPV DNA was detected even in cervicovaginal samples with no cytological abnormalities, thus proving the existence of subclinical infections that can be diagnosed by the PCR method.

Descriptors: Papillomaviridae, Polymerase Chain Reaction, Pathology.

¹Universidade Anhembí Morumbi(UAM)-São Paulo-SP-Brasil

Conflito de interesses: Não

Contribuição dos autores: JO coleta, tabulação, padronização do **método**, etapas de execução dos experimentos, delineamento de estudo e redação do manuscrito. TJM orientação do projeto, discussão dos achados, delineamento do estudo e elaboração do manuscrito. VCS orientação do projeto, padronização de método, etapas de execução dos experimentos, delineamento de estudo e redação do manuscrito.

Contato para correspondência: Joseana de Oliveira

E-mail: jolive17@outlook.com

Recebido: 01/09/2016; **Aprovado:** 18/12/2016

Introdução

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO), o câncer de colo do útero é o quarto mais frequente no mundo, com um número de 266.000 mortes estimadas em 2012. Atualmente, esse é o terceiro câncer mais frequente na população feminina e o quarto maior causador de mortes entre as mulheres no Brasil. Vários estudos moleculares e epidemiológicos confirmam que a ocorrência desse tipo de câncer está intimamente relacionada com a infecção por certos tipos de vírus. O HPV é o principal precursor na gênese da neoplasia de colo do útero. Mais de 90% das mulheres que apresentam câncer de colo do útero estiveram expostas ao Papilomavírus Humano⁽¹⁾. Estudos revelam que a infecção ocorre no início da vida sexual na adolescência ou por volta dos 20 anos⁽²⁾.

A infecção pelo HPV apresenta-se, na maioria das vezes, de modo assintomático, com lesões subclínicas não aparentes. Mulheres diagnosticadas precocemente têm praticamente 100% de chance de cura, quando tratadas adequadamente⁽³⁾. Recentemente, já são detectadas lesões precoces como lesões “in situ”. O termo *carcinoma in situ* (CIS) indica lesões precursoras que ocupam todo o tecido do epitélio, porém não rompem a camada basal; ou seja, ainda não se trata de um câncer invasivo⁽⁴⁾.

Uma nova possibilidade de diagnóstico precoce é a utilização de técnicas de biologia molecular. O principal marco no desenvolvimento das técnicas de diagnóstico molecular foi o método de reação em cadeia da polimerase (PCR), proposto por Kary Mullis em 1987, como uma forma de clonagem de DNA in vitro. Desde a introdução da técnica de PCR, rápidos avanços de genética molecular têm revolucionado a prática da patologia, anatomia e análises clínicas⁽⁵⁾. No processo de infecção pelo HPV, o vírus adentra as células basais do epitélio cervicovaginal efetuando a síntese de proteínas não estruturais. Os genes E (early) e L (late) do vírus permanecem na forma episomal integrando-se no núcleo da célula hospedeira, sendo uma infecção latente, o gene L1 codifica a proteína L1 que junto com a L2 contribui para a incorporação do HPV-DNA dentro do vírion, este gene pode ser amplificado por método de PCR em sequências específicas de DNA-alvo, de forma exponencial, ou seja, ainda na fase latente da doença, antes do aparecimento de lesões que podem ser visualizadas pelo método de Papanicolau, o teste molecular já é capaz de detectar células infectadas com o vírus quiescente⁽⁶⁾. Sendo assim, o uso de técnicas mais sensíveis pode detectar uma infecção de forma precoce, sendo possível prevenir o desenvolvimento de infecções de alto risco antes de atingirem a malignidade⁽⁷⁾. O estudo proposto visa analisar a prevalência de HPV-DNA em amostras cervicovaginais sem alteração histopatológica através da técnica de PCR.

Materiais e Métodos

Foram coletadas amostras de raspado cervicovaginal de 50 mulheres sexualmente ativas, sem alterações citológicas e sem lesões aparentes ao exame colposcópico, com condições físicas e psicológicas para realização da coleta. Tornaram-se voluntárias, espontaneamente, na campanha “Prevenção ao Câncer de Colo de Útero” no ano de 2014, promovido pela Universidade Anhembi Morumbi, Centro Integrado de Saúde (CIS), na ci-

dade de São Paulo. Todas as voluntárias assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido. Este estudo encontra-se vinculado ao projeto de pesquisa “Co-fatores mutagênicos para o hpv relacionados ao estilo de vida em regiões litorâneas” devidamente cadastrada na Plataforma Brasil e atendendo as exigências do CEP Institucional (Número do Parecer: 829.399. Data da Relatoria: 14/10/2014).

Coleta e extração de DNA

A coleta foi realizada com uma escova endocervical, depositando uma camada de células para preparação da lâmina de citologia. Após, a escova foi lavada 10x em movimentos de subida e descida em um tubo contendo 1 mL de etanol 95% para que o excesso de células se desprendesse. Em seguida os tubos foram conservados em freezer a -20° C até o momento da extração de DNA. Para a extração de DNA foi utilizado mini kit QIAmp DNA (Qiagen Ltda, Crawley, UK) de acordo com as instruções. Centrifugou-se a 5.000 rpm por 5 minutos para obter um *pellet* celular. O excesso de etanol foi desprezado e o *pellet* foi recuperado com 200 uL de PBS e adicionado 20 uL de proteinase K e 200 uL de Buffer AL e incubado em banho maria a 56° C por 10 minutos. Na precipitação de DNA foi adicionado 200 uL de etanol (96%). O DNA foi eluído em 200 uL de Buffer AE. A determinação da qualidade na extração foi analisada por eletroforese em gel de agarose a 0,8%, corado com brometo de etídeo.

Reação em Cadeia Polimerase (PCR)

A reação de PCR foi realizada conforme descrito por Venceslau e colaboradores⁽⁶⁾. No protocolo de amplificação do DNA utilizou-se 2 ul de amostra em alíquotas com 23 ul de mix de reagentes em cada tubo. A reação foi preparada com 15 mM de MgCl₂, Buffer 1x, 800 uM de dNTPs, 50 pmol/uL de primer GP5+ 5’TTTGTACTGTGGTAGAA CTAC3’ e GP6+ 5’GAAAAAAACTGTAAATCAATTC3’, 1,25 U de TaqDNA polymerase (Invitrogen®) e completado com H₂O. Os fragmentos foram amplificados em termociclador sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94° C por 10 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 94° C por 1 minuto, anelamento a 55° C por 1 minuto e extensão a 72° C por 40 segundos, com extensão final a 72° C por 10 minutos. Seguindo da reação de PCR, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 3%, o tempo de corrida foi de 30 minutos, posteriormente observado em luz ultravioleta. Em todas as análises foram adicionadas amostras positivas (CP), previamente conhecidas, e o controle negativo (CN) utilizando apenas água. Todas as amostras foram rastreadas por PCR, sendo realizadas 3 avaliações independentes para cada amostra, em baterias diferentes. As amostras que foram positivas em pelo menos duas avaliações foram consideradas positivas para DNA de HPV. Todas as amostras consideradas positivas foram ainda confirmadas utilizando um conjunto de *primers* diferente. As amostras com resultados positivos foram confirmadas com PCR utilizando os *primers* MY09 5’CGTCCMARRGGA-WACTGATC3’ e MY11 5’GCMCAGGGWCATAAYAA TGG3’ para um diagnóstico confirmatório. Em paralelo ao teste de PCR foi analisado, com as mesmas amostras, o teste citopatológico

pelo método de Papanicolau. Os esfregaços corados foram visualizados por microscopia óptica comum, em objetivas de 10x e 40x, eventualmente de 100x (ocular de 10x) para confirmação da flora microbacteriana. Posteriormente utilizado o sistema Bethesda/2001 para confirmação do diagnóstico.

Resultados

No total, 50 mulheres participaram da campanha, sendo a distribuição da faixa etária apresentada na Figura 1. A faixa etária mais frequente foi a de mulheres acima de 50 anos de idade (38%).

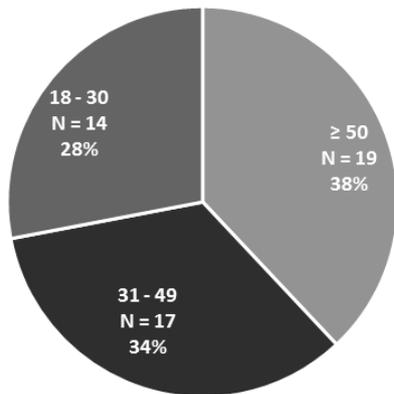


Figura 1. Distribuição do número total das mulheres participantes da campanha por faixa etária (N=50). As faixas etárias forma distribuídas em 18 – 30 anos; 31 – 49 anos e maior ou igual a 50 anos.

Das 50 amostras avaliadas, 22 foram positivas para DNA de HPV, indicando uma prevalência geral de 44%. Todas as amostras positivas foram conformadas com dois conjuntos de *primers*, em baterias de reação de PCR distintas Figura 2A. A distribuição das amostras positivas e negativas pode ser observada na Figura 2B. A faixa etária que apresentou as maiores taxas de positividade foi a das mulheres de 18 – 30 anos (57%), seguido daquelas entre 31 – 49 anos (47%).

Das 50 amostras avaliadas por PCR, 31 foram também encaminhadas para avaliação citopatológica, apresentando, portanto, resultados simultâneos para PCR e Papanicolau. Dessas, 55% foram positivas para DNA de HPV e não apresentaram alterações citopatológicas na avaliação por Papanicolau (Papa -), como pode ser observado na Figura 3.

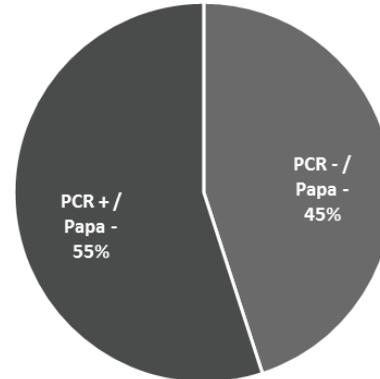


Figura 3. Distribuição das amostras Positivas (N=17) ou negativas (N=14) para DNA de HPV que apresentaram Papanicolau negativo (Papa -). (N=31).

Discussão

Nesta pesquisa a prevalência para HPV demonstrou-se alta, se comparada a análises de prevalência realizadas em países como Japão 16,2% e China 10,3%⁽⁸⁾. Entretanto, a prevalência de HPV em amostras do colo do útero e da vagina de pacientes assintomáticas apresenta muita variabilidade, como demonstram estudos conduzidos na Grécia 51,2%⁽⁹⁾; Turquia 30,6%⁽¹⁰⁾; Venezuela 40%⁽¹¹⁾; Alemanha 54,3%⁽¹²⁾; sendo que esses valores corroboram os dados obtidos neste estudo. Vários são os fatores que podem contribuir para a infecção pelo HPV, dentre esses se destacam as características dos vírus e as do hospedeiro. O número de parceiros sexuais durante a vida é uma das causas associadas mais importantes, vem sendo também estudado

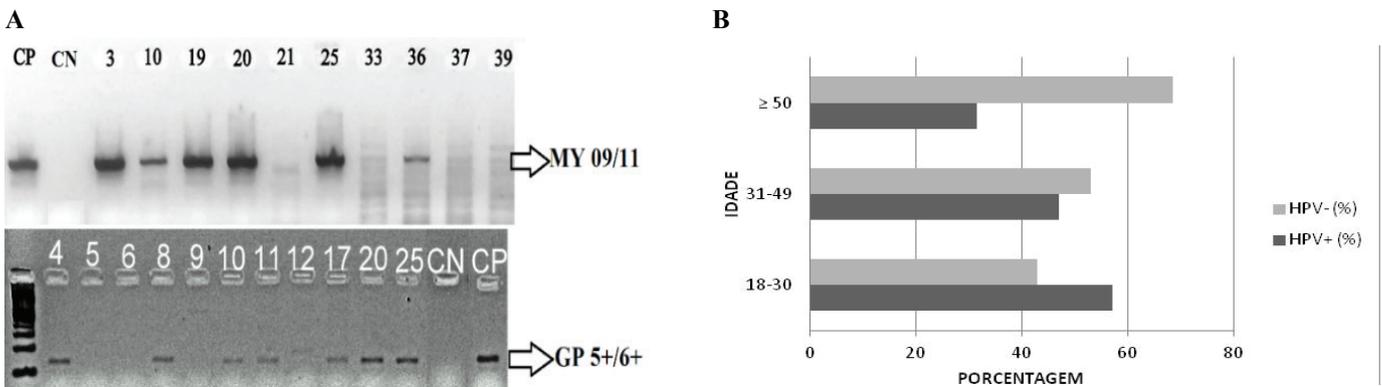


Figura 2. Reação de PCR para detecção de DNA de HPV em amostras cervicovaginais. A) Reação de PCR seguida de corrida eletroforética em gel de agarose a 2% inspecionado a luz ultravioleta. Amostras são demonstradas em números. CN: controle negativo. CP: controle positivo. *Amplicons* obtidos com GP5+/GP6+ demonstrados na parte de baixo da figura (150pb). *Amplicons* obtidos com MY09/MY11 (450pb) demonstrados na parte de cima da figura. B) Distribuição do número de amostras positivas e negativas para DNA de HPV por faixa etária (N=50). As faixas etárias foram distribuídas em 18 – 30 anos; 31 – 49 anos e maior ou igual que 50 anos.

fatores, como gravidez, tabagismo, método anticoncepcional, infecções genitais e fatores educacionais/sociais⁽¹³⁾.

Quanto à faixa etária, as mulheres de 30 a 50 anos de idade tiveram maior interesse em participar da campanha. A maior prevalência da infecção era de mulheres de 18 a 30 anos, demonstrando maior taxa de infecção pelo HPV após o início da atividade sexual, coincidindo com outros dados da literatura⁽¹⁴⁾. Sabe-se que, mesmo em lesões de baixo grau, o genoma viral já se encontra integrado ao genoma da célula hospedeira. Nesta fase, o quadro encontra-se sem sintomas aparentes, refletindo numa baixa procura da população feminina por um ginecologista para exames de rotina. Apenas 30% das mulheres submetem-se ao exame citopatológico pelo menos três vezes na vida, o que resulta em diagnósticos já em fase avançada em 70% dos casos⁽¹³⁾. Poucos dados epidemiológicos estão disponíveis, contribuindo para que os casos assintomáticos permaneçam ignorados, favorecendo as complicações inerentes à doença causada por esse agente. Apesar do diagnóstico por meio de esfregaços citopatológicos terem contribuído para a drástica diminuição de câncer de colo do útero, a eficácia deste teste para detecção de lesão intraepitelial tem sido contestada⁽⁵⁾.

A presença de coilocitos em uma amostra cervicovaginal se correlaciona com a presença de HPV⁽¹⁵⁾. Entretanto, não somente a alteração citológica e nem somente a detecção por PCR do DNA viral deve ser considerada isoladamente. Uma pesquisa mostrou que uma parte da região L1 pode ser perdida em alguns casos, durante a integração do genoma viral, ao passo que outras regiões continuam sendo expressas⁽¹¹⁾, principalmente em casos mais avançados, podendo justificar o resultado negativo no teste de PCR.

Em um estudo conduzido na Índia, 100 mulheres que apresentaram alterações citológicas foram avaliadas por PCR, com a finalidade de detectar DNA viral de HPV. Apenas 10% das pacientes testaram positivas no ensaio de PCR utilizado, sendo o tipo mais frequente o HPV-18⁽¹⁶⁾. Desse modo fica evidente que há outras causas de alterações citológicas senão infecções por HPV e, assim, tanto a análise citológica quanto testes de biologia molecular, que embora, esses últimos sejam altamente sensíveis e específicos, se complementam na avaliação de rotina ginecológica.

Conclusão

De todas as amostras testadas que apresentaram resultado negativo no teste citopatológico, mais da metade foram positivas para presença de HPV utilizando o método por PCR. Sendo assim, esse teste qualitativo detecta a presença do vírus precocemente e poderia ser utilizado como método de triagem, além do exame citopatológico, e não ficar restrito a um teste confirmatório como atualmente vem sendo utilizado. Sabe-se que a infecção genital por HPV pode se apresentar nas formas clínica (condilomas) e as subclínica ou latente, na qual não é possível visualizar lesões macroscopicamente, neste caso, somente identificado por técnicas de biologia molecular. Estas duas últimas formas são as mais frequentes e nocivas, pois, por não apresentarem sintomas clínicos, a infecção pode se tornar um câncer de colo do útero. Por se tratar de uma doença sexualmente transmissível frequen-

te, é necessário um diagnóstico correto a partir da clínica e de exames complementares, levando em consideração inclusive os indivíduos subclínicos. Assim, é possível realizar o tratamento e o acompanhamento desse paciente a fim de reduzir os índices de transmissão e o desenvolvimento de doenças relacionadas, como neoplasias. Portanto, o presente estudo contribui para ampliar os horizontes de possibilidades para o diagnóstico, na perspectiva de refinar o processo de triagem das pacientes ginecológicas.

Referências

- Leto MGP, Santos Junior GF, Porro AM, Tomimori J. Infecção pelo papilomavírus humano: etiopatogenia, biologia molecular e manifestações clínicas. *An Bras Dermatol*. 2011;86(2):306-17. <http://dx.doi.org/10.1590/S0365-05962011000200014>.
- Cirino FMSB, Nichiata LYI, Borges ALV. Conhecimento, atitude e práticas na prevenção do câncer de colo uterino e hpv em adolescentes. *Esc Anna Nery*. 2010;14(1):126-34. <http://dx.doi.org/10.1590/S1414-81452010000100019>.
- Souza SV, Ponte KM, Gomes DA. Prevenção do HPV nas Mulheres: estratégia adotada por enfermeiros na atenção primária à saúde. *Sanare*. 2015;14(1):46-51.
- Carvalho MCMP, Queiroz ABA. Lesões precursoras do câncer cervicouterino: evolução histórica e subsídios para consulta de enfermagem ginecológica. *Esc Anna Nery (Impr.)*. 2010;14(3):617-24. <http://dx.doi.org/10.1590/S1414-81452010000300026>.
- Wolschick NM, Consolaro MEL, Suzuki LE, Boer CG. Câncer do colo do útero: tecnologias emergentes no diagnóstico, tratamento e prevenção da doença. *Rev Bras Análises Clín*. 2007;39(2):123-9.
- Venceslau EM, Bezerra MM, Lopes ACM, Souza EV, Onofre ASC, Melo CM. HPV detection using primers MY09/MY11 and GP5+/GP6+ in patients with cytologic and/or colposcopic changes. *J Bras Patol Med Lab*. 2014;50(4):280-5. <http://dx.doi.org/10.5935/1676-2444.20140028>.
- Santos IM, Maioral MF, Haas P. Infecção por HPV em homens: importância na transmissão, tratamento e prevenção do vírus. *Estud Biol*. 2010/2011;32/33(76-81):111-8.
- Imai H, Nakao H, Shinohara H, Watarai M, Matsumoto N, Yamagishi T, et al. Prevalence, potential predictors, and genotype-specific prevalence of human papillomavirus infection among sexually active students in Japan. *PLoS One*. 2015;10(7):1-9. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0132462>.
- Adamopoulou M, Vairaktaris E, Nkenke E, Avgoustidis D, Karakitsos P, Sioulas V, et al. Prevalence of human papillomavirus in saliva and cervix of sexually active women. *Gynecol Oncol*. 2013;129(2):395-400. doi: 10.1016/j.ygyno.2013.02.015.
- Sahiner F, Gümra R, Sener K, Yiğit N, Dede M, Yapar M, et al. Investigation of HPV-DNA in cervical smear samples by two different methods: MY09/11 consensus PCR and type-specific real-time PCR. *Mikrobiyol Bul*. 2012;46(4):624-36.
- Michelli E, Téllez L, Mendoza JA, Jürgensen C, Muñoz M, Pérez S, et al. Comparative analysis of three methods for HPV DNA detection in cervical samples. *Invest Clín*. 2011;52(4):344-57.
- Meyer MF, Huebbers CU, Siefer OG, Vent J, Engbert I, Eslick GD, et al. Prevalence and risk factors for oral human

papillomavirus infection in 129 women screened for cervical HPV infection. *Oral Oncol.* 2014;50(1):27-31. doi: 10.1016/j.oraloncology.2013.10.009.

Pinto VFC, Barbosa VFC, Paiva SG. Aspectos epidemiológicos e citológicos de infecções pelo Papiloma Virus Humano (HPV) em adolescentes: uma revisão. *Rev Cient ITPAC.* 2012;5(4):1-10.

Rama CH, Roteli-Martins CM, Derchain SFM, Longatto-Filho A, Gontijo RC, Sarian LOZ, et al. Prevalência do HPV em mulheres rastreadas para o câncer cervical. *Rev Saúde Pública.* 2008;42(1):123-30. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102008000100016>.

Chen L, Sun MJ, Shi HY, He Q, Liu DG. Association of human papillomavirus L1 capsid protein with koilocytosis, expression of p16, and Ki-67, and its potential as a prognostic marker for cervical intraepithelial neoplasia. *Anal Quant Cytopathol Histopathol.* 2013;35(3):139-45.

Kaur P, Aggarwal A, Nagpal M, Oberoi L, Sharma S. Prevalence and clinical utility of human papilloma virus genotyping in patients with cervical lesions. *J Obstet Gynaecol India.* 2014;64(4):279-83. doi: 10.1007/s13224-014-0508-5.

Joseana de Oliveira é Biomédica com habilitação em Diagnóstico por Imagem e Biologia Molecular pela Universidade Anhembi Morumbi (UAM). Formada em Técnica de Radiologia (2013) pela Escola Lopes. Atualmente é Professora de técnicas radiológicas e supervisora de estágio no curso técnico da Escola Lopes (Suzano). E-mail: jolive17@outlook.com

Tangara Jorge Mutran é graduado em Biomedicina pela Universidade Metodista de Piracicaba (1986), Doutor em Ginecologia pela Universidade Federal de São Paulo UNIFESP- SP(2011), Mestrado em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada) pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (1997) e Mestrado em Odontologia (Fisiologia e Biofísica do Sist. Estomatognático) [Piracicaba] pela Universidade Estadual de Campinas. Atualmente é professor da Universidade Cidade de São Paulo(UNICID), Diretor do Instituto Paulista de Biomedicina(IPB), Coordenador do curso de Pós-Graduação e Hematologia Clínica Laboratorial da Universidade Cidade de São Paulo - UNICID, professor titular de Pós Graduação da Universidade Tecnológica Federal do Paran(UFTPR-PR), professor titular de Pós Graduação da Universidade Comunitária de Chapecó(UNOCHAPECÓ-SC), Coordenador do Curso de Biomedicina da Universidade Anhembi Morumbi até 2016, Atualmente é Diretor da Saúde da Faculdade Innovare. E-mail: tangarajorge@gmail.com

Vinicius Canato Santana é Professor da Escola de Ciências da Saúde da Universidade Anhembi Morumbi. Doutor pela Faculdade de Medicina da USP e Mestre pelo Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Especialista em Análises Clínicas e Moleculares. Graduado em Biomedicina. Área de atuação: Imunologia, Biologia Celular e Molecular. E-mail: vinicsantana@gmail.com