

DETECÇÃO DE PAPILOMAVÍRUS HUMANOS PELA TÉCNICA DE CAPTURA HÍBRIDA: ESTUDO PRELIMINAR

DETECTION OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS INFECTION BY USING THE HYBRID CAPTURE: STUDY PRELIMINARY

Maria OO Carvalho¹, Ricardo W Almeida², Fátima MS Leite³,
Ilza B Fellows⁴, Mariza H Teixeira⁵, Silvia MB Cavalcanti⁶

RESUMO

No presente estudo, determinamos a prevalência da infecção por HPV pela técnica de Captura híbrida em 217 pacientes atendidos pelo laboratório de análises clínicas da rede privada do Rio de Janeiro. Destes, 184 eram do sexo feminino. Um total de 96 (44,24%) pacientes estavam infectadas por HPVs, sendo que 80 (83,3%) apresentavam HPV de alto risco, constituindo um grupo significativo com maior risco de transformação maligna. Tivemos a oportunidade de avaliar 18 lesões ao longo de 12 a 48 meses. Observamos 8 lesões regressivas, 7 persistentes; 1 progressão; 1 infecção latente e finalmente, 1 paciente apresentou infecção transitória que consiste de um processo recentemente descrito para infecções por HPV. Nosso maior objetivo foi o de evidenciar pacientes com infecções por HPV de alto risco e assim reconhecer aquelas com maior risco de evolução maligna. Isto porque a detecção precoce destes pacientes de risco poderá ser fundamental para prevenir o processo de transformação.

Palavras-chave: Prevalência de HPV, Técnica de captura híbrida, DST

ABSTRACT

In the present study, we determined the prevalence of HPV infection by using the Hybrid Capture Test in 217 patients attending at private clinic Laboratory of the Rio de Janeiro. Among them, 184 were female and 96 out of them were infected by HPV, with 83.3% (80 patients) being positive for high risk HPVs, and hence constituting a risk group for malignant transformation. We had the opportunity of study 18 lesions for 12 to 48 months. From them, 8 were regressive lesions, 7 were persistent, 1 progressed to carcinoma, 1 were a latent infection and, finally, 1 were a transient infection – a process recently detected for HPV infections. The aim of our study was to point out patients infected by high risk HPVs and thus recognise the group at a higher risk of malignant evolution, since their early detection can be essential to prevent the transformation event.

Keywords: Prevalence of HPV, Hybrid capture, STD

ISSN: 0103-0465

DST – *J bras Doenças Sex Transm* 13(4):32-36, 2001

INTRODUÇÃO

Papilomavírus humanos (HPVs) são pequenos vírus de DNA que infectam o tecido epitelial e causam lesões produtivas hiperproliferativas auto-limitadas. A importância dos papilomavírus, entretanto, reside no fato de que certos tipos têm potencial oncogênico e a infecção por estes tipos contribui para o desenvolvimento de cânceres, principalmente no trato genital feminino (De Villiers, 1994).

Até o momento existem cerca de 80 tipos de HPV descritos (Villa, 1997). Cerca de 20 destes genótipos podem infectar o trato genital feminino, mas estudos epidemiológicos mostram uma distinção entre tipos associados a lesões benignas, chamados de baixo risco, e os tipos de alto risco, associados predominantemente a lesões malignas (zur Hausen, 1989 ; de Villiers, 1989). Os tipos 6 e 11 são geralmente encontrados nas verrugas benignas (condiloma acuminado), que, embora representem proliferação anormal do epitélio, raramente mostram evidências de transformação maligna. Entre os tipos de alto risco, que são frequentemente encontrados em displasias de alto grau e cânceres invasivos estão o 16 e o 18, mas este grupo inclui também os tipos 31,33,35, 39, 45 , 51, 52,56, 57, 58, 59 e 68 (Villa, 1997).

Diversos estudos epidemiológicos prospectivos vem sendo realizados em diferentes países a fim de elucidar o potencial pro-

1 Estagiária do Laboratório de Virologia – MIP – UFF

2 Consultor Científico – Laboratório Sérgio Franco

3 Coordenadora do Setor de Biologia Molecular do Laboratório Sérgio Franco

4 Diretora do Laboratório Sérgio Franco

5 Gerente Técnica do Laboratório Sérgio Franco

6 Professora Adjunta de Virologia – MIP - UFF

gressivo de certas lesões induzidas pelo HPV. Syrjanen, na Finlândia, realizando um *follow-up* prospectivo de 1981 a 1989, constatou um percentual considerável de regressão espontânea (40%) das lesões causadas pelo HPV, a maioria, contudo, pareceu persistir (45%) e, mais importante, uma proporção substancial (15%) progrediu até o estágio de carcinoma *in situ*, o precursor imediato do câncer invasivo (Syrjanen, 1989).

Enquanto na Europa e na América do Norte o câncer cervical não mais representa um problema clínico maior, como o foi até o final da década de 60; nos demais continentes, este continua a representar um grave problema (Boshart *et al*, 1984). Estima-se que ocorram 600.000 casos de carcinomas cervicais anuais nessas regiões, sendo que cerca de 50% das pacientes atingem o óbito por esta doença. Assim, tais regiões são tidas como de alto risco não só para esta doença como também para infecções pelo HPV, com elevadas taxas da prevalência e incidência nessas populações (Cook e Mozaffari, 1982 *apud* Syrjanen, 1989). Na América Latina, o câncer do colo uterino é a neoplasia maligna mais frequente, representando cerca de 10% da mortalidade pelo câncer, sendo esta também a segunda causa em incidência do câncer feminino em todo o mundo (Lowy *et al*, 1994; Registro Nacional de Patologia Tumoral, INCa, 1997).

Segundo Souza e Villa (1989), o Brasil é o país que apresenta a maior incidência de câncer genital em todo o mundo. Em 1977, Segi já havia descrito que a região Nordeste do Brasil apresentava taxas extremamente altas de câncer genital feminino e masculino, alcançando níveis até 6 vezes maiores que a média mundial.

É importante lembrar que nas últimas décadas houve um aumento estimado em 4 vezes tanto nas lesões iniciais (benignas) como das pré-malignas e malignas associadas ao HPV, em todo o mundo (Crawford, 1984; Lowy, 1994).

Já em 1983, Durst *et al* sugeriram a existência de algumas peculiaridades geográficas na incidência do câncer genital e também na prevalência de tipos específicos de HPV. De um modo geral, o HPV 16 parece ser o mais frequente em todo o mundo, o sendo ainda mais expressivamente na Alemanha (60% dos casos) e na Inglaterra (90% dos casos) contrastando com a menor incidência no Brasil e na África (35%). Nestes 2 últimos países, o HPV 18 seria bastante frequente (25%, segundo Boshart *et al*, 1984), contrastando com a baixa prevalência na Europa (8%). Riou *et al* (1991), na França, detectaram a presença do HPV em 84% dos carcinomas cervicais, sendo cerca de 55% para HPV16 e 16% para HPV 18.

Estudos epidemiológicos de cunho tanto prospectivo como retrospectivo vêm sendo realizados em busca de maiores conhecimentos acerca do comportamento epidemiológico dos HPV em todo o mundo, a fim de compreender sua importância para a Saúde Pública.

No Rio de Janeiro, Cavalcanti *et al* (1996) constataram uma alta taxa de progressão das lesões por HPV ao câncer cervical (30%). Além disso, também foi descrita a ocorrência de HPV 18 em quase 20% dos quadros neoplásicos (Cavalcanti *et al*, 2000). Esta alta prevalência de HPV 18 em pacientes brasileiras poderia explicar o mau prognóstico destas pacientes, que claramente contrasta com os dados da literatura internacional. Entretanto outros fatores parecem contribuir para o câncer.

No presente estudo, determinamos a prevalência da infecção por HPV pela técnica de Captura híbrida em pacientes atendidas em laboratório de análises clínicas da rede privada do Rio de Janeiro, apontando lesões infectadas por HPV oncogênicos, reconhecendo assim pacientes com maior risco de evolução maligna. Isto porque a detecção precoce destes pacientes de risco poderá ser fundamental para prevenir o processo maligno.

PACIENTES E MÉTODOS

Specimens

Nosso estudo avaliou 217 pacientes do sexo masculino e feminino atendidos no Laboratório Sérgio Franco (Rio de Janeiro). Estes pacientes, após serem submetidos a exame clínico, tiveram esfregaços ou biópsias colhidos para diagnóstico citológico e teste de detecção de HPV (Captura híbrida).

Captura Híbrida

A técnica utiliza o *kit Digene* (USA) para detecção e tipagem dos HPV.

Os esfregaços utilizados são coletados em frascos contendo tampão de transporte (*Digene Specimen Collection Kit*). Em seguida, são desnaturadas em solução de NaOH (500ul), misturados em Vortex por 5'' e, então incubados a 65°C por 45min em banho-maria. A etapa seguinte é de hibridização.

São utilizados dois conjuntos de sondas de ARN: sondas A hibridizando HPV 6,11,42,43 e 44 (HPV de baixo risco) e sonda B para HPV 16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59 e 61 HPV de alto risco). São adicionados 25ul de cada *kit* de sonda e 75ul da amostra. O material é mantido em shaker rotatório por 2 a 3 min a 400 rpm. Após 1h de incubação a 65°C em banho-maria, é iniciada a captura do híbrido, transferindo-se o conteúdo dos frascos de hibridização (100ul) para uma microplaca recoberta com anticorpo anti-híbrido ARN/ADN (sonda/amostra). Mantem-se a placa por 60min em shaker a 400rpm. Lava-se em tampão 3X. Acrescenta-se então o Reagente de detecção 1 (conjugado anti-anticorpo e fosfatase alcalina) e incuba-se 30min a 25°C. Lava-se 6X em Tampão. Finalmente é adicionado o substrato quimio-luminescente (Reagente de detecção 2) para detecção dos híbridos, após 15min de incubação a 25°C.

A leitura é feita em Luminômetro DML 2000, onde os valores superiores ao valor de corte (*cut off* > 1.0) são considerados positivos para sonda A ou B, ou ambos.

Em cada reação são incluídos controles negativo e positivo, em triplicata.

RESULTADOS

Em nosso estudo, 217 amostras de pacientes de ambos os sexos foram avaliados. Estas amostras foram encaminhadas ao laboratório, por médicos de diferentes regiões do Estado do Rio de Janeiro, para pesquisa de lesões pela citologia e/ou para

deteção do DNA de diferentes tipos de HPV, pelo teste de captura híbrida.

Dos pacientes estudados, 184 eram do sexo feminino e 33 eram do sexo masculino. A média de idade dos participantes foi de 31,7 anos, variando de 13 a 70 anos.

Com relação à infecção pelos HPV, 104 pacientes foram positivos pelo teste de captura híbrida (48%). Destes, 20 apresentaram tipos de baixo risco, 44 de alto risco e 40 de ambos os tipos.

Como apresentado na **tabela 1**, das 184 pacientes do sexo feminino, 96 apresentaram infecção por HPV (52,2%), sendo 16 infectadas por tipos de baixo risco (16,7%), 41 por tipos de alto risco (42,7%) e 39 apresentaram infecções mistas (40,6%).

Os resultados da citologia estavam disponíveis para 97 das 184 pacientes avaliadas e apontaram: 15 esfregaços com resultado Pap I (metaplasia), 62 com resultado Pap II e 20 Pap III (16 NIC I, 3 NIC II e 1 NIC III).

Conforme apresentado na **tabela 2**, das 15 pacientes com diagnóstico citológico Pap I (normal), 5 apresentaram infecção por HPV (33,3%) sendo que todas tinham HPV de alto risco. Com relação às 62 pacientes com Pap II, observamos ainda na Tabela II, que 36 não referiam sugestão de infecção por HPV. Destas, 20 foram de fato negativas à captura híbrida (55,5%). Entretanto, 16 (44,5%) foram positivas. As demais 26 PAP II sugestivas de HPV apresentaram os seguintes resultados: 8 positivas para alto risco e 7 infecções múltiplas, num total de 15 lesões positivas (57,7%). Dezesesseis lesões Pap III/ NIC I foram avaliadas. Destas, 12 foram positivas (75%): sendo 4 positivas para HPV de baixo risco, 4 para alto risco e 4 para infecções mistas.

Três pacientes tiveram resultados na citologia de Pap III/NIC II e 1 paciente apresentou Pap III/NIC III. Todas (100%) apresentaram HPV de alto risco.

Dezoito pacientes foram acompanhadas por exames citológicos por períodos de 36 a 48 meses e 12 meses à captura híbrida: oito pacientes apresentaram lesões com regressão espontânea sendo 3 infectadas por HPV de baixo risco, 3 com alto risco e 2 com ambos; 7 apresentaram lesões persistentes sendo 6 com tipos oncogênicos; 1 paciente progrediu ao Carcinoma *in situ* e apresentou infecção mista; 1 paciente apresentou infecção latente com a captura híbrida positiva para HPV de baixo risco mas sem lesão e; finalmente, 1 paciente teve infecção transitória, com

a primeira captura híbrida positiva para HPV de alto risco e a segunda negativa para todos os HPV.

Dos 33 pacientes do sexo masculino, somente 8 foram positivos pela captura híbrida, sendo 4 infectados por tipos benignos (50%), 3 por tipos oncogênicos (37,5%) e 1 com ambos os tipos (12,5%).

DISCUSSÃO

É interessante observar que das 96 pacientes infectadas, 80 (83,3%) apresentavam HPVs de alto risco, constituindo um grupo significativo com maior risco de transformação maligna (Tabela 1).

Com relação aos pacientes do sexo masculino, dos 8 positivos para HPV, 4 apresentaram HPV oncogênicos (**tabela 1**). Entretanto, por ser a amostra muito pequena, não foi possível avaliar estatisticamente estes dados que, inclusive, discordam da literatura corrente, a qual aponta uma maior prevalência de HPVs de baixo risco em lesões do trato genital masculino (Syrjanen, 1989).

Conforme apresentado na **tabela 2**, cinco pacientes com citologia Pap I apresentaram infecção por HPV de alto risco, assim sugerimos tratar-se de infecções latentes, sem replicação viral e consequente lesão. Entretanto, não podemos descartar a possibilidade de colpocitologia falso-negativa, devido à baixa sensibilidade inerente à técnica.

Observamos, ainda na **tabela 2**, que, dentre as 62 PAP II, 36 não referiam sugestão de infecção por HPV. Destas, 20 foram de fato negativas à captura híbrida (55,5%). Entretanto, 16 (44,5%) foram positivas sugerindo assim como no caso acima descrito, infecção latente ou colpocitologia falso-negativa. As demais 26 PAP II sugestivas de HPV apresentaram os seguintes resultados: 8 positivas para alto risco e 7 infecções múltiplas, num total de 15 lesões positivas (57,7%). Um total de 42,3% das lesões foram negativas. Pode-se levantar a hipótese de um resultado falso-negativo da captura híbrida. Entretanto, trata-se de um teste de segunda geração, no qual estima-se uma sensibilidade superior às demais técnicas de hibridização, como *dot blot* ou hibridização *in situ*. Alguns estudos apontam sensibilidade intermediária entre o PCR e o *dot blot*. Assim, retornamos à possibilidade de uma baixa eficiência da citologia. De fato, Cavalcanti *et al*, em

Tabela 1 – Amostras avaliadas quanto à prevalência da infecção por HPVs pelo método de captura híbrida

Pacientes	Amostra (N)	Captura híbrida			Prevalência (%)
		Baixo risco (A)	Alto risco (B)	Infecção mista (A + B)	
Mulheres	184	16	41	39	96 (52,2)
Homens	33	4	3	1	8 (24,2)
Total	217	20	44	40	104 (48)

Tabela 2 – Diagnóstico citológico das pacientes avaliado de acordo com o resultado da captura híbrida

Diagnóstico citológico	Amostra (n)	Captura híbrida			
		A	B	A + B	(-)
PAP I	15	-	2	3	10
PAP II	36	4	8	4	20
PAP II + HPV	26	-	8	7	11
PAP III (NIC I)	16	4	4	4	4
PAP III (NIC II)	3	1	-	2	-
Total	97	9	22	21	45

Tabela 3 – Acompanhamento das pacientes por análise da lesão à citologia e detecção da infecção pela Captura híbrida

Follow-up das pacientes	Amostra (n)	Captura híbrida		
		A	B	A + B
Lesão regressiva	8	3	3	2
Lesão persistente	7	1	3	3
Lesão progressiva	1	-	-	-
Infecção latente (sem lesão)	1	1	-	-
Infecção transitória (sem lesão)	1	-	1	-
Total	18	5	7	6

1996, já haviam demonstrado um percentual de falsos-negativos e falsos-positivos à citologia, em geral os falso-positivos sendo corrigidos após análise histopatológica.

Neste trabalho, tivemos a oportunidade de avaliar resultados da citologia combinados a resultados de captura híbrida para 18 pacientes, ao longo de 12 a 48 meses (tabela 3). Observamos 8 lesões regressivas, sem referência a tratamento, o que corresponde a um percentual de regressão de 44,4%. Estes percentuais de regressão já haviam sido descritos por Syrjanen (1989). Sete pacientes apresentaram lesões persistentes (38,9%), concordando também com a literatura internacional (Meekin *et al*, 1992). Uma paciente apresentou progressão ao carcinoma *in situ* e estava infectada por HPV oncogênicos. Uma paciente apresentou HPV de baixo risco com citologia normal, resultado que se manteve por 10 meses, sugerindo infecção latente.

Finalmente, 1 paciente apresentou infecção transitória com Captura híbrida positiva para HPV de alto risco, negatizando 12 meses depois. O conceito de infecção transitória tem sido recentemente descrito na literatura. Metodologias modernas de detecção viral possibilitaram evidenciar a eliminação do vírus ao longo de alguns meses. Acredita-se que pacientes imunológica-

mente competentes podem eliminar o HPV; ao contrário do que se aceitava anteriormente quando era aceito que após a entrada do vírus no organismo ou ele se manifestaria, induzindo lesão ou determinaria infecções latentes (sem replicação) ou persistentes (com replicação lenta sem induzir lesão), permanecendo indefinidamente no núcleo das células originalmente infectadas (Villa, 1997).

Em nosso estudo, resultados preliminares apontam um alto percentual de infecções por HPV oncogênicos, sendo que estas pacientes são consideradas de risco para evolução ao câncer. Aquelas pacientes que apresentam lesões iniciais com citologia Pap I ou II são o grupo alvo de interesse na prevenção ao câncer. Isto porque pacientes com lesões já expressivas serão tratadas e acompanhadas, mas aquelas com lesões brandas, embora em fase inicial do processo neoplásico devem ser acompanhadas com maior rigor clínico. Inúmeros autores sugerem que exames citológicos devam ser recomendados a estas pacientes em intervalos de 6 ou 4 meses afim de detectar precocemente a progressão destas lesões por HPV e tratá-las adequadamente, o que resultaria em método eficiente de prevenção ao câncer (Lowy, 1994).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Boshart, M; Gissman, L; Ikenberg, H; Kleinheinz, A; Scheurlen, W & zur Hausen A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. **EMBO J. 3:** 1151-1157. 1984.
- Cavalcanti SMB, Deus FCC, Zardo LG, Frugulhetti ICP, Oliveira LHS. Human papillomavirus infection and cervical cancer in Brazil: a retrospective study. **Mem Inst Oswaldo Cruz 91:** 433-440. 1996.
- Cavalcanti SMB, Zardo LG, Passos MRI, Oliveira LHS (2000). Epidemiological and virological aspects of Human papillomavirus infection in Brazil. **Journal of Infection 40:** 81-87.
- Crawford, L. Papillomaviruses and cervical tumors. **Nature 310:** 16. 1984
- de Villiers, EM Heterogeneity of the human papillomavirus group. **J. Virol. 63:** 4898-4903. 1989.
- De Villiers, EM Human pathogenic papillomavirus types: na update: **Curr. Top. Microbiol. Immunol. 186:** 1-12. 1994.
- Durst, M; Gissman, L; Ikenberg, H & Zur Hausen, H A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:** 3812-3814. 1983.
- Francheschi, S; Doll, R; Gallwey, J; LA Vecchia, C; Peto, R & Spriggs, AI. Genital warts and cervical neoplasia: an epidemiological study. **Brit. J. Cancer 48:** 621-628. 1983.
- Lowy DR, Kimbauer R, Schiller JT Genital human papillomavirus infection. **Proc Nat Acad Sci USA 91:** 2436-2440. 1994.
- Meekin GE, Sparrow MJ, Fernwicke RJ, Tobias M Prevalence of genital human papillomavirus infection in Wellington women. **Genitorin Med 68:** 228-232. 1992.
- Registro Nacional de Patologias Tumorais.** Diagnóstico de Câncer INCa (Pro-Onco), Ministério da Saúde, Brasil. 1991/1997. 1997.
- Segi, M. Graphic presentation of cancer incidence by site and by area and population. **Segi Institute for Cancer epidemiology.** Nagoya. 1997.
- Souza, PCP & Villa, LL Prevalence of human papillomavirus (HPV) DNA in pathology specimens of carcinomas of the penis. **4º Encontro Nac. Virologia, MG - Brasil,** p116. 1988.
- Syrjanen, KJ Epidemiology of human papillomavirus (HPV) infections and their association with genital squamous cell cancer. **APMIS 97:** 957-970. 1989.
- Villa LL Human papillomavirus and cervical cancer. **Adv Cancer Res 71:** 321-341. 1997.
- zur Hausen, H Papillomavirus in anogenital cancer as a model to understand the role of viruses in human cancers. **Cancer Res. 49:** 4677-4681. 1989.
- Zur Hausen, H Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific human papillomaavirus types. **Curr. Top. Microbiol. Immunol. 186:** 131-150. 1994.

Endereço para correspondência:

Maria Odete Carvalho
 UFF/CCM/CMB/MIP – Virologia
 Rua Prof. Hernani Pires de Melo, 101
 Centro, Niterói, RJ – CEP: 24210-130