

INFECÇÕES CAUSADAS PELOS PAPILOMAVÍRUS HUMANOS: ATUALIZAÇÃO SOBRE ASPECTOS VIROLÓGICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E DIAGNÓSTICO

HUMAN PAPILLOMAVIRUS INFECTION: UPDATE ON VIROLOGICAL AND EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS AND DIAGNOSIS

Silvia MB Cavalcanti¹ & Fernanda N Carestiatto²

RESUMO

Papilomavírus humanos são pequenos vírus de DNA capazes de infectar epitélio da pele e mucosas. Mais de 100 tipos já foram descritos, sendo que cerca de 40 causam doenças sexualmente transmissíveis. É também no trato genital que alguns tipos exercem poder oncogênico, sendo 13 considerados agentes etiológicos do câncer cervical, responsável pela morte de 200.000 mulheres em todo o mundo, anualmente. O diagnóstico disponível para o controle das DST e câncer causados pelos HPV baseia-se no tripé colposcopia, citologia e histopatologia, podendo ser confirmado laboratorialmente por técnicas de biologia molecular. Dentre elas: PCR e captura do híbrido. Recentemente, duas vacinas profiláticas contra os tipos 6, 11, 16 e 18 (Merck) e 16 e 18 (Glaxo) foram desenvolvidas. São compostas de VLPs (*Virus-like particles*) expressas em leveduras. Resultados promissores vêm sendo publicados, embora alguns mecanismos imunológicos de defesa contra o HPV não estejam ainda esclarecidos.

Palavras-chave: Papilomavírus humanos, câncer, prevenção, diagnóstico molecular

ABSTRACT

Human papillomavirus are small DNA viruses capable of infecting the epithelium of skin and mucosa. More than a hundred types have already been described, and nearly 40 promote sexually transmitted diseases. It is in the genital tract that 13 HPV types exert their oncogenic potential, being responsible by the death of 200,000 women worldwide, annually. The available diagnosis to STD and cancer control is based upon the colposcopy, cytology and histopathology tools, and can be laboratorially confirmed by molecular biology techniques: PCR and hybrid capture. Recently, two prophylactic vaccines against HPV types 6, 11, 16 e 18 (Merck) and 16 e 18 (Glaxo) were developed. They are composed by VLP (*Virus-like particles*) expressed in yeasts. Promising results have been published. Nevertheless, immunological mechanisms for human defense are not well elucidated.

Keywords: Human Papillomavirus, cancer, prevention, molecular diagnosis

ISSN: 0103-0465

DST – J bras Doenças Sex Transm 18(1): 73-79, 2006

HISTÓRICO

As verrugas genitais, também conhecidas como condilomas, vêm sendo descritas desde a Antiguidade. Logo após a Idade Média, a explicação postulada para sua origem foi atribuída de maneira equivocada às manifestações da sífilis e até mesmo da gonorréia. Somente no século XX, a etiologia viral das verrugas pôde ser confirmada através de experimentos inoculando extratos genitais em regiões da pele previamente escarificadas, onde apareciam lesões típicas exatamente nesses locais inoculados. A primeira associação da progressão do papiloma a câncer foi descrita por Shope¹, que realizou infecções experimentais em coelhos, nos quais as lesões benignas induzidas por papilomavírus de coelho progrediam a carcinoma invasivo. Reforçando estes achados, Rous & Beard², além de confirmarem que os papilomas benignos poderiam progredir a carcinomas de células escamosas nos coe-

lhos, estabeleceram que co-fatores não virais específicos contribuíam para acelerar este processo de malignização.

Mas o interesse pelo estudo dos papilomavírus só aumentou de forma expressiva a partir da década de 1970, quando Meisels *et al.*³ descreveram que as alterações celulares e morfológicas displásicas nos exames de Papanicolau e biópsias estavam extremamente ligadas à presença destes vírus na cérvix uterina. Neste mesmo período, zur Hausen⁴ e sua equipe iniciaram pesquisas utilizando técnicas de hibridização molecular recém desenvolvidas que permitiram a identificação do DNA dos papilomavírus. Este feito permitiu distinguir os vários tipos de papilomavírus humanos (HPV) existentes, baseando-se no grau de semelhança de suas bases nitrogenadas. Uma série de estudos sucedeu-se sobre a possibilidade de envolvimento do HPV na gênese de câncer. Dentre estes, destaca-se o trabalho de zur Hausen,⁴ que sugere o HPV como o mais importante agente na etiologia do câncer cervical.

A completa caracterização do vírus sempre foi dificultada devido à estreita relação da infecção viral com a diferenciação celular do tecido epitelial, não sendo portanto possível cultivar os

^{1,2}Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ

HPV em culturas de células ou em qualquer outro sistema de cultivo. Por isso, a princípio, o único meio de pesquisa e de diagnóstico era a simples observação clínica das lesões. Porém, nos últimos anos, o progresso das técnicas de Biologia Molecular tem possibilitado uma melhor condição tanto de pesquisa, para a completa caracterização da partícula viral e dos seus mecanismos de infecção e patogênese no organismo humano, quanto de diagnóstico, que possibilita uma definição dos diferentes tipos de HPV nas lesões, a fim de traçar o risco real de oncogênese numa dada população, permitindo assim, elaborar medidas eficientes para a prevenção do câncer.

A PARTÍCULA VIRAL E O GENOMA

O papilomavírus humano é um pequeno vírus não envelopado, com um diâmetro de aproximadamente 55 nm. A partícula viral apresenta seu genoma constituído de DNA de fita dupla circular, medindo entre 7.500 a 8.000 pares de base, associado a histonas celulares; e seu capsídeo é formado por 72 subunidades protéicas, denominadas capsômeros, que estão arranjadas em conformação icosaédrica, e cujas proteínas estruturais são do tipo L1 (proteína maior) que é gênero-específica e L2 (proteína menor) que é altamente tipo-específica.⁵

O genoma é dividido em regiões gênicas denominadas seqüências abertas de leitura, do inglês *open reading frames* (ORF) que estão localizados na mesma fita de DNA. Estas ainda podem ser funcionalmente separadas em três regiões principais: a primeira é uma região regulatória, não codificadora, de 400 a 1.000 pares de bases que é conhecida pelas denominações *long control region* (LCR) ou *upper regulatory region* (URR), situada entre os genes L1 e E6. É nesta região pouco conservada que estão localizados os genes reguladores e iniciadores da replicação viral. A segunda é chamada de região precoce ou E (*early*), constituída pelos ORF E1, E2, E4, E5, E6 e E7, que estão envolvidos na replicação viral, no controle da transcrição e na oncogênese. E a terceira região denominada tardia L (*late*), codifica as proteínas L1 e L2 do capsídeo viral.⁵

REPLICAÇÃO VIRAL, INTEGRAÇÃO E CARCINOGENESE

A infecção pelo HPV ocorre nas células da camada basal do epitélio escamoso estratificado e sua replicação é vinculada ao processo de diferenciação destas células. Por esta razão, os mecanismos de patogênese no hospedeiro, induzidos por esses vírus, permaneceram muito tempo sem condições de serem estudados, tendo em vista a impossibilidade de recriação da estrutura estratificada do epitélio *in vitro*. Recentemente, foram criados sistemas de culturas de células organotrópicas capazes de propagar alguns tipos de HPV, como os tipos HPV 6, 11, 16 e 40, quando cultivadas sob uma matriz de colágeno mantida num suporte sólido em meio contendo tetra-decanoil forbol-acetato (TPA), que induz à diferenciação celular⁶.

Tanto na infecção produtiva do HPV quanto na não-produtiva, a replicação do HPV inicia-se com a interação de fatores celula-

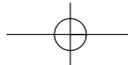
res do hospedeiro com a região LCR do genoma do HPV, dando início à transcrição dos genes virais E6 e E7, cujas proteínas interferem nas vias de regulação do ciclo celular e modificam o ambiente celular para facilitar a replicação do vírus dentro da célula. Isso se dá por meio da ligação e inativação das proteínas supressoras de tumor, alteração das ciclinas celulares e quinases dependentes de ciclinas (CDK)⁶.

Nos processos produtivos, a ligação cooperativa entre E1 e E2 dentro da origem do vírus tem um papel chave na regulação da transcrição dos genes virais e na replicação do DNA. Durante os estágios precoces da infecção viral, a proteína E2 reprime a transcrição dos oncogenes E6 e E7, permitindo que o produto do gene E1 se ligue à origem de replicação viral. A partir dessa ligação, o genoma viral passa a ser replicado como elemento extracromossomal na fase S do ciclo celular. O número de cópias do genoma é mantido constante nas células, e com um nível baixo de transcritos sendo expresso. Esta regulação negativa mediada por E2 sob a transcrição de E6 e E7 resulta na liberação das proteínas p53 e pRB, permitindo assim a continuação do processo de diferenciação celular normalmente. Em seguida, o produto do gene E5 induz o aumento da atividade de uma proteína quinase mitogênica, que aumenta a resposta celular de proliferação e diferenciação.⁷ Já o produto do gene E4 tem um papel importante na maturação e na liberação das partículas dos papilomavírus, pois esta proteína leva ao colapso da rede de citoqueratina, que resulta no aspecto típico das células infectadas pelo HPV também chamadas de coilócitos.

Finalmente, os genes tardios L1 e L2 são ativados pelo promotor tardio, permitindo que as partículas virais sejam montadas no núcleo. E a completa liberação dos vírions ocorre na camada córnea do epitélio quando as células se desprendem durante o processo de descamação do epitélio⁶.

Nos processos não-produtivos, seguindo-se à integração, o produto do gene E6 liga-se com alta afinidade a p53 promovendo uma rápida degradação desta proteína via uma ubiquitina-ligase celular. Esta degradação simula o mesmo efeito da inativação resultante de mutação do gene da p53. Vale lembrar que, quando ocorrem erros no DNA, a proteína p53 interage com outras proteínas para que o DNA seja reparado. Se isto não for possível, a p53 sinaliza para outras proteínas reguladoras induzirem a apoptose, a fim de eliminar as células mutantes. A inativação da p53 leva à regulação repressora da ciclina B, proteína que forma um complexo com a CDK1 e apresenta um papel de fator promotor de mitose, regulando a transição de G2 para a fase M no ciclo celular normal. Logo, a inativação da p53 resulta na perda dessas funções⁶.

O produto do gene E7 liga-se à forma hipofosforilada da proteína RB, e esta ligação quebra o complexo formado entre a proteína RB e o fator de transcrição celular E2F-1, liberando-o para a transcrição dos genes cujos produtos são necessários para a célula entrar na fase S do ciclo celular. A proteína E7 pode associar-se também a outras proteínas mitogênicas. Como consequência, a síntese de DNA e a proliferação celular são estimuladas, prolonga-se a fase S, induzindo à instabilidade do DNA, que leva à transformação das células⁶.

**Tabela 1** – Tipos de HPV e suas manifestações clínicas**Papilomavírus humano (HPV)**

HPV 1 (a, b, c)
 HPV 2 (a – e)
 HPV 3 (a, b)
 HPV 4
 HPV 5 (a, b), HPV 8
 HPV 6 (a - f)
 HPV 7
 HPV 9, HPV 12, HPV 15, HPV 19, HPV 23, HPV 24, HPV 25, HPV 47, HPV 50
 HPV 10 (a, b)
 HPV 11 (a, b)
 HPV 13 (a, b)
 HPV 14 (a, b), HPV 17 (a, b), HPV 20
 HPV 16
 HPV 18
 HPV 21
 HPV 22
 HPV 26, HPV 27
 HPV 28, HPV 49
 HPV 29, HPV 60
 HPV 30
 HPV 31, HPV 35, HPV 45, HPV 51, HPV 52, HPV 56
 HPV 32
 HPV 33
 HPV 34
 HPV 36
 HPV 37
 HPV 38
 HPV 39
 HPV 40
 HPV 41
 HPV 42
 HPV 43, HPV 44, HPV 53, HPV 58, HPV 59
 HPV 46
 HPV 48
 HPV 54
 HPV 55
 HPV 57
 HPV 58
 HPV 59
 HPV 60
 HPV 61, HPV 62, HPV 64, HPV 66, HPV 67, HPV 68, HPV 69, HPV 71, HPV 74
 HPV 63
 HPV 65
 HPV 70
 HPV 72, HPV 73
 HPV 75, HPV 76, HPV 77
 HPV 78

Manifestação clínica

Verrugas plantares
 Verrugas vulgares, verrugas filiformes, verrugas palatais
 Verrugas planas, verrugas juvenis, formas leves de EV
 Verrugas palmares e plantares do tipo hiperkeratótico
 Lesões maculares da EV, carcinoma de células escamosas
 Condiloma acuminado, NIC I – III, papilomas de laringe
 Verrugas vulgares da mão de açougueiros
 Lesões verrucosas maculares e planas da EV

Verrugas planas
 Condilomas, NIC I-III, papilomas de laringe, conjuntivais
 Hiperplasia focal epitelial na mucosa oral
 Lesões verrucosas da EV, carcinoma de células escamosas
 Condiloma acuminado, NIC I-III, carcinoma da cérvix, de pênis
 Condiloma acuminado, NIC I-III, carcinoma da cérvix, de pênis
 Lesões verrucosas planas da EV
 Lesões maculares da EV
 Verrugas cutâneas (pacientes imunodeprimidos)
 Lesões verrucosas planas cutâneas
 Verrugas cutâneas
 Carcinoma escamoso de laringe, NIC I, II
 NIC I-III, carcinoma da cérvix
 Hiperplasia epitelial focal em mucosa oral, papiloma oral
 NIC I-III, carcinoma da cérvix
 Doença de Bowen, NIC
 Ceratose actínica, lesões benignas da EV
 Ceratoacantoma (tumor benigno de pele)
 Melanoma maligno
 Carcinoma da cérvix, NIC I, II, papulose bowenóide
 Neoplasia intraepitelial peniana e NIC
 Verrugas múltiplas planas da pele, câncer de células escamosas
 Papilomas genitais, condilomas planos, NIC
 NIC
 Lesões benignas da EV
 Carcinoma de células escamosas da pele
 Condiloma acuminado
 Papulose bowenóide
 NIC, verrugas da pele, papilomas invertidos nasais
 NIC
 NIC
 Verrugas cutâneas
 Displasias anogenitais e neoplasmas

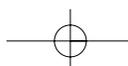
Verrugas *Myrmecia*
 Verrugas pigmentadas
 Papiloma vulvar
 Papilomas orais (em pacientes HIV-positivos)
 Verrugas genitais de pacientes com transplante renal
 Verrugas cutâneas

NIC (neoplasia intra-epitelial cervical) e EV (epidermodisplasia verruciforme).

O DNA do vírus pode se apresentar de diferentes formas nos diversos tipos de lesões. Normalmente, nas lesões benignas o DNA, está na forma circular, chamada epissomal, não integrado ao genoma da célula hospedeira, e em grande número de cópias. Nas lesões malignas, apresenta-se na forma integrada ao genoma da célula hospedeira. Entretanto, é possível encontrar formas

epissomais nas células malignas e, uma vez estando integrado, o vírus não pode ser revertido à sua forma epissomal.⁵

A afinidade entre as proteínas derivadas dos genes supressores de tumores com as proteínas virais E6 e E7 determina o grau de oncogenicidade dos diferentes tipos de HPV, permitindo assim que alguns tipos de HPV sejam mais oncogênicos que



outros, como por exemplo os produtos dos genes E6 e E7 do HPV 16 e 18, que apresentam grande afinidade com as proteínas p53 e pRB, e a do HPV 6 e 11, que possuem baixa afinidade pelas mesmas proteínas.

A integração do genoma do vírus ao genoma da célula hospedeira é um evento necessário para o processo de imortalização dos queratinócitos, e por tanto da carcinogênese. As células infectadas por HPV podem tornar-se imortais pela proteína E6, que ativa a telomerase, e pela E7, que inativa a pRB, porém ainda não são consideradas tumorigênicas. Para que essa condição se estabeleça é necessário que mutações adicionais ocorram nessas células para que possa haver a progressão maligna. Portanto, além da indução da carcinogênese pelas próprias proteínas do HPV que facilitam a aquisição das mutações, é necessária a interação de fatores genéticos, epigenéticos, hormonais, imunológicos. Dentre eles, a indução da transcrição da telomerase humana mediada por E6 intervém no oncogene *c-myc*, que leva à perda de inibidores celulares de telomerase, que são considerados mecanismos importantes no processo de imortalização da célula infectada por HPV de alto risco.⁸

CLASSIFICAÇÃO

Recentemente, os papilomavírus passaram a pertencer a família *Papillomaviridae*, reconhecida pelo *International Committee on the Taxonomy of Viruses* (ICTV)⁹. Desde os estudos pioneiros de zur Hausen (1977), a classificação antiga dos tipos de HPV era feita baseando-se na hibridização. A cada novo tipo de papilomavírus era atribuída uma denominação numérica conforme a ordem de sua identificação. Com o surgimento da técnica de seqüenciamento genômico, a taxonomia está sendo voltada para a completa identificação da seqüência nucleotídica do DNA viral. Em torno de 118 papilomavírus já foram descritos, incluindo cerca de 100 tipos de HPV que foram totalmente seqüenciados, porém, muitos ainda estão sem classificação.⁹

PATOGENIA

Os HPV são espécie-específicos e exclusivamente epiteliotrópicos. Podem infectar células da camada basal tanto dos epitélios da pele quanto dos epitélios de mucosas que recobrem a boca, garganta, trato respiratório e trato anogenital. Por isso, são divididos em tipos cutâneos e mucosos.⁴ A infecção viral pode gerar lesões clínicas de forma localizada, subclínica ou latente. De uma maneira geral, o HPV segue o ciclo produtivo viral clássico: adsorção, penetração, transcrição, tradução, replicação do DNA, e maturação.⁵ Mas em alguns casos esse processo não chega a acontecer completamente, uma vez que o vírus pode integrar-se ao genoma das células hospedeiras e induzir à carcinogênese dessas células. Dos 118 tipos descritos,⁹ cerca de 40 são capazes de infectar o trato anogenital, e ainda podem ser separados em grupos quanto ao risco de câncer cervical. Como exemplos de HPV do grupo de baixo risco, temos os tipos 6, 11, 42, 43 e 44, e do grupo de alto risco, os tipos 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52,

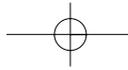
56, 58, 59, 66, 68 e 70. Entretanto, vale ressaltar que tipos de baixo risco, também podem, excepcionalmente, ser encontrados em casos de câncer cervical.¹¹

Uma variedade de condições clínicas pode ser atribuída aos HPV, desde lesões inócuas ao câncer. Primeiramente, estes vírus foram reconhecidos como causas das verrugas cutâneas (verrugas plantares, comuns e planas). As verrugas podem ser descritas como áreas de hipertrofia da pele repletas de queratina e geralmente têm uma resolução espontânea dentro de 1 a 5 anos. Os tipos que acometem a face podem produzir câncer de pele mais facilmente, assim como os tipos de HPV que produzem pequenas elevações nodulares na boca. A epidermoplastia verruciforme é uma doença de caráter genético associado aos HPV. Nela, as verrugas surgem principalmente no tronco e nas extremidades altas do corpo, e podem também evoluir ao câncer invasivo de células escamosas. Finalmente, as papilomatoses conjuntival e respiratória estão relacionadas à contaminação durante o nascimento dos bebês, visto que muitas mulheres apresentam lesões no canal do parto⁶.

A transmissão do HPV ocorre pelo contato direto, através de microlesões na pele que expõem a membrana basal do epitélio. No caso da infecção genital, a transmissão se dá principalmente pelo contato genital durante o ato sexual. Prova disso é que entre mulheres que não tiveram nenhuma relação sexual prévia, o índice de infecção é de apenas de 0-8%. Como os HPV são bastante resistentes ao calor e a dessecação, também é possível que ocorra a transmissão não sexual, via fômites, sendo que numa proporção bastante reduzida. Outros tipos de contato genital com ausência de penetração, incluindo o sexo-oral, também têm sido descritos como vias de transmissão, entretanto são bastante raros. Além destas, existem outras vias de transmissão de HPV genitais como a transmissão vertical, da mãe para o recém-nascido⁶.

A infecção genital pelo HPV pode resultar em três possibilidades de manifestação clínica: (a) verrugas anogenitais, também chamadas de condilomas acuminados, que se localizam ao redor dos genitais e do ânus. Estão geralmente relacionadas aos HPV 6 e 11 (baixo risco), e não levam ao câncer. Muitas são assintomáticas e podem ter uma resolução espontânea em 3 a 4 meses, caso contrário, podem permanecer na mucosa ou até aumentarem de tamanho e número; (b) infecção latente ou inativa, neste tipo de manifestação o indivíduo não apresenta sintomas aparentes da infecção; (c) infecção ativa, que está associada aos tipos de HPV de alto risco, responsáveis pelas alterações celulares que podem resultar em neoplasias intra-epiteliais.

Estudos têm mostrado que 70% das infecções genitais por HPV são eliminadas espontaneamente do organismo dentro de 1 ano, e em 2 anos este valor aumenta para 91%. Estas infecções são caracterizadas como transitórias, enquanto as demais são caracterizadas como infecções persistentes, e geralmente são estas infecções que estão associadas à progressão ao câncer cervical CDC.¹² O câncer cervical surge principalmente numa região da cérvix uterina chamada “zona de transformação”, que fica situada entre transição do epitélio colunar da endocérvix e o epitélio escamoso da ectocérvix, expondo as células basais. Isto porque é justamente nesta região que ocorrem mudanças metabólicas constantemente. Tais mudanças são mais expressivas



durante a puberdade, na primeira gravidez e declina após a menarca.

EPIDEMIOLOGIA

Evidências moleculares e epidemiológicas indicam claramente que certos tipos de HPV são a principal causa de câncer cervical.¹¹ Atualmente, sabe-se que o DNA do HPV pode ser detectado em 95% a 100% dos cânceres cervicais e a Organização Mundial de Saúde já reconhece este vírus como agente etiológico de câncer de cérvix uterina. Em todo o mundo, a infecção por estes vírus é uma das causas mais comuns de doenças sexualmente transmissíveis (DST), tanto em homens quanto em mulheres. Por isso, o HPV ainda é considerado um tema relevante em Saúde Pública, pois os níveis de infecção por estes vírus continuam crescendo, apesar de todos os esforços em sentido contrário.

O câncer cervical é o segundo câncer mais freqüente em mulheres (o primeiro é o câncer de mama) e é responsável por considerável morbidade e mortalidade em todo o mundo. São diagnosticados cerca de 470.000 novos casos de câncer de útero anualmente e, aproximadamente, 230.000 mulheres morrem todos os anos. A média mundial estimada de sobrevivência após 5 anos é de 49%.¹³ A maioria dos casos (80%) ocorre em países pobres e em desenvolvimento. As taxas de incidência em países desenvolvidos é em torno de 10 por 100.000, mas ultrapassa os 40, chegando acima de 100 por 100.000 em alguns países mais pobres.

No Brasil, segundo os dados do Instituto Nacional do Câncer, as taxas brutas de mortalidade estimadas por 100.000, foram de 3,44 em 1979; 4,59 em 2000 e 4,58 em 2003, mostrando que não houve modificação significativa deste quadro. A explicação dada para diferença entre os anos de 1979 e 2000 foi de que, além do aumento real dos casos pela disseminação dos HPV, houve também melhoras do sistema de notificação dos casos.¹³ O Brasil permaneceu por muito tempo carente de estudos mais profundos sobre o HPV, mas essa situação tem melhorado nos últimos anos. O estudo longitudinal realizado em colaboração entre o Instituto Ludwig e a Universidade McGill (Canadá), foi realizado em São Paulo, no período entre 1993 e 1997, e investigou 2.528 mulheres com idade média de 32 anos, com o objetivo de traçar um perfil das infecções genitais na população geral e identificar aquelas de caráter persistente. Como resultados dos testes, o estudo encontrou uma incidência de HPV em 13,8% dos casos, sendo o HPV 16 o mais prevalente (2,8%), seguido do HPV 53 (1,5%), HPV 58 (1,2%), HPV 6/11 (1,0%), HPV 31 (1,0%) e HPV 18 (0,8%).¹⁴

No Rio de Janeiro, um estudo realizado durante os últimos 10 anos, investigou as infecções por HPV em lesões cervicais de mulheres atendidas em diversos hospitais e laboratórios, públicos e privados, do estado (Instituto Nacional do Câncer, Hospital Universitário Antônio Pedro – Clínica de Doenças Sexualmente Transmissíveis – UFF, Laboratórios Sergio Franco), onde foram avaliadas 3.369 amostras envolvendo condilomas, LSIL, SIL e carcinomas cervicais. O percentual de amostras infectadas por algum tipo de HPV foi de 47% (1.826/3.369). O HPV16 foi o tipo mais prevalente (50%), seguido do HPV18 (27%). Os

estudos de integração apontaram um papel relevante na progressão ao câncer, que foi de aproximadamente de 28% nessas amostras^{15,16}.

Outra questão importante a ser levantada trata da deficiência na prevenção e controle do câncer cervical na população, apesar do país ter sido um dos primeiros a implantar o Papanicolaou para a detecção das lesões precursoras e do próprio câncer de colo de útero, poucas mulheres fazem o exame ou, se o fazem, não o repetem regularmente. Situação que explica as altas taxas de incidência de câncer cervical encontradas no Brasil, devidas principalmente ao diagnóstico tardio das lesões.¹³

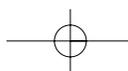
A infecção genital pelo HPV é mais freqüente em mulheres jovens sexualmente ativas, entre 18 e 30 anos de idade. Depois dos 30 anos ocorre uma acentuada diminuição nos casos de novas infecções. Por outro lado, o câncer cervical é mais comum em mulheres acima dos 35 anos, atingindo o pico de incidência geralmente na faixa etária de 45 a 49 anos, sugerindo que as infecções se dão realmente em mulheres mais jovens, e as infecções persistentes provocadas principalmente por HPV de alto risco são responsáveis pela maioria dos casos que evoluem lentamente até o câncer cervical⁶.

A infecção persistente por HPV oncogênico é considerada o fator de risco mais importante para o câncer cervical. Mulheres com testes positivos para DNA de certos tipos de HPV têm quatro vezes mais chance de desenvolverem lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau (LSIL) e 13 vezes mais chances de desenvolverem lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (HSIL), que são lesões precursoras do câncer de colo do útero. Se forem considerados os três últimos testes para HPV (ao longo de 3 anos), sendo todos positivos para tipos de alto risco, o risco de desenvolverem câncer cervical é 14 vezes maior quando comparadas às mulheres que apresentam resultados negativos. Entretanto, segundo alguns estudos longitudinais, 60% das LSIL regredem espontaneamente e raramente progridem ao câncer, enquanto as HSIL o índice de eliminação diminui para 30% a 40% e cerca de 10% a 20% progridem a carcinoma invasor.¹²

A presença de HPV de alto risco é necessária, mas não é suficiente para o desenvolvimento do câncer cervical. Estudos sugerem uma variedade de fatores adicionais que atuam de forma conjunta aos HPV no processo de oncogênese⁶. Os fatores de risco clássicos para essa neoplasia são basicamente os mesmos relacionados à infecção pelo HPV.

Dentre os fatores de risco para o câncer cervical podemos citar: início precoce da vida sexual; ter vários parceiros sexuais ao longo da vida; multiparidade; tabagismo; outras doenças sexualmente transmissíveis; redução da imunidade celular pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV); uso de anticoncepcional oral; variantes do HPV com diferenças nas propriedades biológicas e de patogenicidade; deficiências nutricionais; consumo de álcool; falha da utilização da camisinha; herança genética ligada aos antígenos de histocompatibilidade HLA classe I e II.

Diante destas evidências relacionando possíveis fatores de risco associados tanto à infecção pelo HPV quanto ao desenvolvimento de câncer por estes vírus, fica claro que medidas visando informar a população seriam decisivas para controlar e até mesmo erradicar uma doença tão prevenível como o câncer de



colo de útero. Lembrando que as lesões genitais por HPV são uma DST, e portanto devem ser prevenidas pelo uso de preservativos, escolha de parceiros mais seguros, fazerem parte de campanhas educativas por parte da Saúde Pública, bem como dos programas de triagem e acompanhamento das pessoas infectadas pelos HPV⁶.

Vale ressaltar que o tratamento das infecções e lesões provocadas por HPV é bastante ponderado, tendo em vista a possibilidade de remissão espontânea pelo organismo. A decisão de tratar ou não cabe aos médicos, que levam em consideração os fatores envolvidos, manifestações clínicas, sintomas e potencial de malignidade. Vale ressaltar que ainda não existe nenhuma substância antiviral específica capaz de eliminar completamente o HPV. Portanto, todos os tratamentos não excluem a possibilidade de retorno da doença. Algumas terapias com substâncias medicamentosas, ou não, têm sido utilizadas, incluindo podofilina, ácido tricloroacético, retinóides, indol-3-carbinol, cidofivir, imiquimod, interferon, dentre outras. No tratamento das lesões intra-epiteliais associadas aos HPV oncogênicos podem-se realizar desde medidas invasivas como excisão cirúrgica, por *laser*, ou eletrocauterização, e também crioterapia, fototerapia entre outras⁶.

Recentemente, duas vacinas profiláticas e terapêuticas contra os tipos 6, 11, 16 e 18 (Merck) e 16 e 18 (Glaxo) foram desenvolvidas. São compostas de VLP (*virus-like particles*) expressas em leveduras¹⁷. Resultados promissores vêm sendo publicados, embora alguns mecanismos imunológicos de defesa contra o HPV não estejam ainda esclarecidos.

DIAGNÓSTICO

A necessidade de se fazer a detecção e o tratamento precoces em lesões pré-malignas causadas por HPV podem perfeitamente prevenir a progressão ao câncer. Prova disso são os estudos indicando a elevação das taxas de progressão das lesões conforme o aumento do tempo das infecções: num prazo de 1 ano o risco de progressão da displasia moderada para displasia severa é de 1%; dentro de 2 anos esse valor sobe para 16% e num prazo de 5 anos o risco eleva-se para 25%⁶.

O diagnóstico do HPV restringiu-se primeiramente à citopatologia e à histopatologia, até que foram desenvolvidos os métodos de biologia molecular capazes de detectar as seqüências do DNA do HPV no material clínico. Para essa detecção ser eficiente é necessário que os testes empregados apresentem alta sensibilidade e especificidade, além de serem seguros, reproduzíveis, de baixo custo e automatizados. Por tanto, a busca de novas técnicas de detecção que possam ser usadas nos rastreamento das infecções causadas por HPV continuam sendo objeto de estudo.

Citopatologia

A primeira forma de detecção de alterações compatíveis com a infecção pelo HPV foi a coloração feita pelo método de Papanicolaou, introduzida no ano de 1949, antes mesmo da causa do câncer cervical ser conhecida. Até hoje é o teste utilizado no ras-

tratamento das lesões provocadas pelo HPV nos programas de triagem⁶, tendo em vista a sua grande abrangência, o baixo custo e a facilidade de execução. Entretanto, o teste apresenta um número elevado de resultados falso-negativos que varia em torno de 15% a 50% e percentuais de resultados falso-positivos de 10% em média, que correspondem a uma sensibilidade de 50% a 90% e especificidade de 70% a 90%. Mesmo assim, nos últimos, os países desenvolvidos que empregaram o teste nos programas de triagem como medida preventiva diminuíram muito os casos de cânceres cervicais.¹²

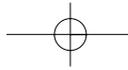
O método utiliza esfregaços celulares que são fixados em lâmina e posteriormente corados. A observação de alterações celulares típicas como presença de coilócitos, disceratose, anomalias celulares, etc, compatíveis com a infecção pelo HPV é definida em graus variados. Estas classificações dos resultados do Papanicolaou sofreram algumas modificações desde a introdução do método. Atualmente, a classificação seguida é a do sistema Bethesda, separando em quatro categorias as anormalidades das células escamosas: Bethesda III – 1ª categoria: ASC (*atypical squamous cells*) subdividida em ASC-US (*atypical squamous cells of undetermined significance*) e ASC-H (*atypical squamous cells cannot exclude HSIL*); 2ª categoria: LSIL (*low grade squamous intraepithelial lesions*), 3ª categoria: HSIL (*high grade squamous intraepithelial lesions*) e a 4ª categoria: SCC (*squamous cell carcinoma*)⁶.

Histopatologia

Neste exame, o material é preparado para a observação dos tecidos no microscópio onde é feita uma análise da distribuição e arranjo das células na pele. O método não identifica o HPV, ele apenas observa as alterações patológicas características da infecção por estes vírus, como hiperplasia (acantose), coilocitose (vacuolização do citoplasma), disceratose, paraceratose, atipias nucleares etc⁶. O resultado baseia-se na graduação das lesões cervicais, que são classificadas conforme o sistema Bethesda III.

Colposcopia

O colposcópico tem uma lente que amplia de 4 a 40 vezes o epitélio, no qual se aplica uma solução de ácido acético entre 3% a 5%, e onde houver anormalidades histológicas o epitélio torna-se esbranquiçado (acetobranco) devido a precipitação de proteínas. A vascularização também pode ser observada com o auxílio de uma luz com filtro verde. Durante o exame amostras das regiões suspeitas podem ser coletadas e biopsiadas. É um exame de extremo valor para a detecção das lesões causadas pelos HPV, entretanto, outras situações como, por exemplo, inflamações intensas, mosaicismos, também expressam um epitélio branco. Logo, existe um risco de se tratar uma lesão que não é a pretendida.



Detecção pela reação em cadeia da polimerase

A técnica amplifica uma seqüência específica do DNA, delimitada por um par de *primers*, com a ajuda de uma enzima termoestável (Taq-polimerase). Existem quatro tipos de *primers* genéricos que amplificam uma região dentro do gene L1 do HPV, que é comum a 43 tipos de HPV: MY09/11, PGMY09/11 (do sistema Amplificor MWP) GP5+/GP6+, e SPF1/2 (do sistema Innogenetics), que amplificam fragmentos de 450 bp, 170 bp, 100 bp e 65 bp, respectivamente. A revelação das amostras amplificadas (amplicons) pode ser feita de diversas formas, dentre elas a análise da seqüência do polimorfismo do fragmento de restrição, hibridização com sondas tipo-específicas, eletroforese em gel.

Existem variações da técnica que pode ter diferentes objetivos: tipagem por PCR, que usa seqüências dos genes E6 e E7 dos diferentes tipos de HPV; PCR em tempo real (*real-time* PCR), que é quantitativo, determinando a carga viral através de oligonucleotídeos marcados com fluorescência; PCR multiplex dos genes E2 e E6, que permite a distinção de formas epissomais e integradas do genoma viral; PCR *in situ*, que é realizado em cortes histológicos desparafinizados, dentre outros. A sensibilidade é de 0,1 a 0,001 pg de DNA viral/célula. Entretanto, esta alta sensibilidade reflete no aumento dos resultados falso-positivos por causa da contaminação entre as amostras¹⁸. O produto do PCR genérico pode ser utilizado no sistema de detecção de *Microarray* (HPV *genotyping chips*). O PCR é feito com oligonucleotídeos marcados com fluoresceína, depois são hibridizados sob um *chip* onde é feita uma varredura por um *laser* fluorescente.¹⁷

Captura do Híbrido

Utiliza um coquetel de sondas do grupo de baixo risco (grupo A) e um de alto risco (grupo B), que se hibridizam com o DNA do HPV presente na amostra, depois os híbridos são capturados por anticorpos presentes nas paredes da microplaca, e então revelados por quimioluminescência. A revelação é feita por um luminômetro que capta a luz emitida pela reação e a converte em uma unidade de luz relativa (RLU), comparando-a com um valor de *cut-off*. Este valor tem sido usado como referência de carga viral. Por ser bastante sensível e automatizada, a técnica tem sido utilizada em várias pesquisas e em laboratórios de rotina⁶. Apresenta alguns problemas de resultados falso-positivos, resultantes de reações cruzadas e de falso-negativos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Shope RE, Hurst W. Infectious papillomatosis of rabbits. J Exp Med 1933; 58:607-625.
- Rous P, Beard JW. The progression to carcinoma of virus-induced rabbit papillomas J Exp Med 1935; 62: 523-548.
- Meisels A, Fortim R, Roy M. Condylomatous lesions of the cérvix I. Cytologic patterns. Acta Cytol 1976; 20: 505-509.
- zur Hausen H. Human papillomavirus and their possible role in squamous cell carcinomas. Microbial Immunol 1977;78;1-30.
- Tyring SK. Human papillomavirus infections: epidemiology, pathogenesis, and host immune response. J Am Acad Dermatol 2000; 43: 518-526.
- Fehrmann F, Laimins LA. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. Oncogene 2003; 22: 5201-5207.
- Villa LL. Molecular variability of Human papillomavirus and susceptibility to cervical neoplasia. J Braz Assoc for Advancement of Science 1999; 51:212-217.
- Spinelli OM. HPV, p53, Apoptosis; una interacción peligrosa. Conferencia presentada en: XII Congreso Latinoamericano, I Congreso Boliviano y X Reunión Iberoamericana: Citologia; 2000.
- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Minireview: Heterogeneity of the Human papillomavirus group. Virology 2004; 324: 17-27.
- zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host cell control in carcinogenesis. Journal of the National Cancer Institute 2000; 92(9): 690-698.
- Muñoz N, Bosch FX, Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Keerti VS, Snijders PJF, Meijer CJLM. For the International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of Human papillomavirus types associated with cervical cancer. N Engl J Med 2003; 348:518-27.
- CDC – A Centers for Disease Control and Prevention – Prevention of Genital Human papillomavirus Infection. Gerberding JL (Director) Department of Health and Human Services. Report to Congress 2004.
- INCA. Estimativa da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil 2006: Rio de Janeiro: INCA; 2006. <http://> acessado em 10/abril/2006.
- Franco E, Villa L, Rohan T, Ferenczy A, Petzl-Erler M, Matlashewski G. Design and methods of the Ludwig-McGill longitudinal study of the natural history of human Papillomavirus infection in Brazil. Pan Am J Public Health 1999; 6(4):223-233.
- Cavalcanti SM, Zardo L, Passos MRL, Oliveira LH. Epidemiological aspects of human papillomavirus infection and cervical cancer in Brazil. J Infect 2000; 40(1): 80-87.
- Cavalcanti SMB, Oliveira LHS. Epidemiological aspects of Human papillomavirus infection in the female genital tract. Virus Reviews and Research 2003; 1(8): 42-47.
- Iftner T, Villa LL. Chapter 12: Human papillomavirus technologies. J Nat Cancer Inst Monographs 2003; 31: 80-88.
- Bigio CT, Barbosa FA, Cavalcanti SMB. Detecção e tipagem viral para Papilomavírus humanos: progressos recentes e perspectivas clínicas. DST – J bras Sex Transm 2002; 14 (4): 32-35.

Endereço para correspondência:

SILVIA MARIA BAETA CAVALCANTI.

Laboratório de Diagnóstico Viroológico, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense. Rua Professor Ernani Melo, 101, sala 321, Centro, Niterói, RJ. 24210-130 – Tel.: 55 21 2629-2431
E-mail: silviabc@ism.com.br

Recebido em: 17/06/2006

Aprovado em: 20/07/2006

