

Prevalência de Papilomavírus humano em lesões benignas e malignas do Trato genital feminino

Flávia Cristina Carvalho de Deus*, Lucília da Gama Zardo**, Mauro Romero Leal Passos***, Ledy do Horto Santos Oliveira****, Sílvia Maria Baêta Cavalcanti****¹

* Bolsista do CNPq (PIBIC-UFF)

** Médica citopatologista do Hospital Ginecológico Luíza Gomes de Lemos, INCa

*** Professor Doutor Chefe do Setor de Doenças Sexualmente Transmissíveis, UFF

**** Professor Doutor do Departamento de Microbiologia do Instituto Biomédico, UFF

¹ Doutoranda do Instituto de Microbiologia da UFRJ

Financiamento CNPq, UFF-PROPP

Resumo:

Recentemente, os papilomavírus humanos foram implicados como possíveis agentes etiológicos dos cânceres genitais, destacando-se alguns tipos virais (HPV 16 e 18), ditos oncogênicos. A fim de determinar a prevalência do ADN dos papilomavírus (HPVs) em lesões genitais femininas, foram avaliadas 35 biópsias obtidas de pacientes atendidas no Hospital Luíza Gomes de Lemos (INCa, Rio de Janeiro) e no Setor de Doenças Sexualmente Transmissíveis (UFF, Niterói). As biópsias foram submetidas ao diagnóstico histológico e à detecção dos HPVs pela técnica de hibridização *in situ*. A hibridização foi realizada empregando-se sondas biotiniladas dos HPVs tipos 6, 11, 16 e 18.

Com relação à prevalência dos tipos virais, constatamos que 39,4% das biópsias apresentavam HPV16; 34,8% apresentavam HPV6 enquanto os HPVs 11 e 18 mostraram-se menos frequentes (6,1% e 19,7%). O HPV 6 só foi encontrado isoladamente em lesões benignas (condilomas e NIC I). Nas lesões pré-malignas e malignas do cervix feminino foram encontrados os HPVs oncogênicos: 16 e 18. Foi observado que um alto percentual das lesões de baixo grau apresentavam estes tipos virais de alto risco, sendo este fato relevante uma vez que a detecção precoce de HPVs oncogênicos em lesões iniciais poderá determinar conduta clínica e terapêutica mais adequadas, a fim de prevenir a evolução destas lesões ao câncer. O início precoce da atividade sexual mostrou correlação direta com a infecção viral e a severidade da lesão; já a cor da pele não apresentou qualquer relação significativa, embora maior número de pacientes atendidas tenha sido de mulheres brancas.

Concluindo, a hibridização *in situ* do ADN dos HPVs confere possibilidade de detecção e tipagem precoces de genomas virais oncogênicos em lesões potencialmente pré-malignas, sendo considerada eficiente ferramenta de prevenção do câncer.

Unitermos: Papilomavírus; HPV; Hibridização.

Summary

In the last years, human papillomaviruses (HPVs) have been implicated as possible etiologic agents of anogenital cancers, especially HPVs types 16 and 18, recognized as oncogenic genomes. In order to determine the prevalence of HPVs DNA in female genital lesions, 35 biopsies from patients attending Hospital Luíza Gomes de Lemos (INCa) and Setor de Doenças Sexualmente Transmissíveis (UFF) were studied.

The specimens were evaluated by histopathologic criteria and *in situ* hybridization (ISH). Procedures to ISH included the use of biotinylated probes specific to HPVs types 6, 11, 16 and 18. Regarding the prevalence of the types, we detected HPV 16 in 39,4% of the biopsies, HPV 6 in 34,8%, HPV 18 in 19,7% and HPV 11 in 6,1% of all the biopsy specimens. HPV 6 were exclusively found alone in benign lesions such as condyloma or CIN I. In premalignant and malignant lesions, high risk HPVs 16 and 18 were invariably found. It is noticeable that a high rate of low grade lesions presented these oncogenic viruses. Hence, the early detection of oncogenic HPVs in initial lesions is of great value since it offers the possibility of a closer and more accurate clinical and therapeutic procedure to prevent transformation of these lesions into cancers.

Associated risk factors for HPV infection were studied. The early onset of sexual activity presented significant correlation with HPV infection and the severity of the lesion. Race did not show relation to viral infection, although a greater number of white women attended the Hospitals.

Finally, HPV *in situ* hybridization offers the possibility of early detection and typing of oncogenic HPV genomes in potentially premalignant lesions, and thus is considered by us as an efficient tool for cancer prevention.

Uniterms: Papillomavirus, HPV, *in situ* hybridization.

Introdução

As infecções genitais causadas pelos papilomavírus humanos (HPVs), anteriormente consideradas um problema menor, tornaram-se das mais frequentes doenças sexualmente transmissíveis, em todo o mundo¹. Acumularam-se evidências apontando uma íntima associação entre os HPVs e o desenvolvimento de condições pré-malignas infectados². Meisels cols. (1976)³ descreveram a frequente correlação entre as lesões clássicas induzidas pelos HPVs no cervix uterino, como condilomas acuminados, planos ou invertidos, e as neoplasias intrapiteliais cervicais (NICs). Estas neoplasias constituem três entidades patológicas distintas: NIC I – correspondendo à displasia leve, NIC II – displasia moderada e

NIC III – displasia severa ou carcinoma *in situ*, precursora imediata do carcinoma invasivo das células escamosas (CCE).

Como os HPVs podem replicar-se no trato genital mas não o fazem em cultivos celulares ou animais de laboratório, não foi possível desenvolver técnicas sorológicas de diagnóstico das infecções. O diagnóstico das lesões induzidas pelos HPVs baseia-se em aspectos cito e histopatológicos característicos tais como: coilocitose, binucleação, atipias mitóticas, acantose e disqueratose. O diagnóstico virológico é feito pela demonstração de seqüências de ADN viral nos tecidos infectados. Tais seqüências podem ser encontradas no núcleo celular, tanto na forma extracromossômica como na forma integrada. O estado extracromossômico tem sido identificado em lesões benignas enquanto a forma integrada do genoma viral tem sido exclusivamente detectada em casos de neoplasias avançadas e carcinomas invasivos, sendo considerada pré-requisito para a progressão maligna. Este fenômeno de integração leva ao estabelecimento de infecções não produtivas, isto é, sem a formação de novas partículas infecciosas. Desta forma, somente a detecção do genoma viral permite identificar a presença do HPV e ainda fazer sua classificação em tipos, por técnicas de hibridização molecular. Diversos autores descreveram que alguns tipos de HPV (HPV 16 e 18) são regularmente detectados em carcinomas cervicais, da vulva e do pênis e são portanto considerados de alto risco de progressão ao câncer; enquanto outros (HPVs 6 e 11) são associados a lesões benignas como condilomas e NIC I⁴. Desta forma, o diagnóstico virológico específico, apontando os tipos de HPV presentes nas lesões clínicas, permite avaliar os riscos de progressão das lesões ao câncer.

Objetivos

Constaram dos objetivos do nosso estudo, identificar e tipar, por meio da hibridização *in situ*, os HPVs presentes em lesões compatíveis com a infecção viral. Além disso, associamos os resultados fornecidos pelo diagnóstico histopatológico à hibridização, correlacionando o grau da lesão pesquisada ao tipo viral infectante (oncogênicos e não-oncogênicos). A fim de realizar estudo epidemiológico, pesquisamos possíveis fatores de risco envolvidos no estabelecimento da lesão induzida pelo HPV bem como na sua progressão.

Material & Métodos

Espécimens

O material de estudo consistiu de biópsias obtidas de pacientes atendidas no Hospital Ginecológico Luíza Gomes de Lemos e no Setor de Doenças Sexualmente Transmissíveis da Universidade Federal Fluminense. As biópsias foram processadas para análise histopatológica, sendo fixadas em formalina tamponada e embebidas em parafina. Os blocos foram então cortados em micrótomo, de modo a fornecer cortes de 5µm, os quais foram montados em lâminas e corados pelo método de Hematoxilina-Eosina.

Hibridização *in situ*

Os cortes histológicos obtidos para avaliação histopatológica

foram montados em lâminas pré-tratadas com silane. O material foi fixado a 60°C por 2h. Em seguida as lâminas foram desparafinizadas em xileno e etanol e, desproteinizadas após tratamento com Proteinase K. As lâminas receberam a mistura de hibridização contendo as sondas virais para os tipos 6, 11, 16 e 18 (as sondas eram previamente marcadas com biotina 11dUTP). O material foi então desnaturado a 92°C por 10min. e hibridizado a 37°C por 2h. Após a hibridização, o material recebe o complexo de detecção estreptavidina-fosfatase alcalina, por 20min. à temperatura ambiente. Finalmente, a reação é revelada pela adição do substrato da fosfatase: o Bromo-Cloro-Indolil-Fosfato (BCIP) e o NitroBlue-Tetrazolium (NBT). As leituras foram realizadas em microscópio óptico e os núcleos das células epiteliais apresentando coloração roxo-avermelhada foram considerados positivos para a infecção pelo HPV.

Resultados e Discussão

Trinta e cinco biópsias de pacientes suspeitas de infecção pelo HPV foram submetidas à análise do tipo viral pelo método de hibridização *in situ*. As lesões estudadas foram classificadas em condiloma (n=7, 20%), NIC (n=9, 25,7%), NIC II (n=8, 22,8%), NIC III (n=6, 17,1%) e CCE (n=4, 11,4%). Empregou-se ainda um tecido histologicamente normal como controle negativo da reação. Das 35 biópsias avaliadas, 33 (94,3%) apresentavam ADN de HPV, sendo que apenas 48,4% dos resultados histopatológicos indicavam infecção compatível com HPV. Este resultado permitiu-nos observar a heterogeneidade nos diagnósticos, devida sobretudo a ainda incipiente associação do HPV com lesões diferentes dos clássicos condilomas.

A prevalência dos tipos de HPV é ilustrada na Figura I. As infecções mistas ocorreram em 62,8% dos casos sendo o HPV 16 encontrado em 39,4% das lesões e o HPV 6 em 34,8%. Os tipos virais 18 e 11 foram detectados em taxas menores: 19,7% e 6,1%, respectivamente. Uma biópsia diagnosticada como histologicamente normal (CIN 0) apresentou HPV 6, deste modo o acompanhamento da paciente é de grande importância visto que, como descrito por Nuovo e cols⁵, tecidos histologicamente negativos infectados por HPV tem risco aumentado de desenvolvimento de neoplasias.

A idade das pacientes estudadas variou de 16 a 69 anos, com média de 39,8 anos. A faixa etária de maior incidência das lesões foi acima de 30 anos, de modo similar ao descrito por outros autores⁶ (Fig. II).

Com relação aos diferentes fatores de risco analisados, temos que: 48,6% das pacientes relatou início da atividade sexual anterior aos 21 anos. Apenas 8,6% iniciou atividade após os 21 anos e o restante das pacientes (42,8%) não revelou este dado (Fig. III). O início precoce da atividade sexual apresentou correlação com a presença de infecção pelo HPV e a severidade das lesões, concordando com outros autores¹.

Com relação à cor da pele, 11 pacientes eram brancas (31,4%), 7 eram mulatas (20%) e 5 eram negras (11,4%). Não foram obtidos dados referentes a 12 pacientes (Fig. IV). Analisando-se a infecção pelo HPV nestas pacientes, observamos não haver diferen-

ças estatísticas significativas entre cor da pele e infecção pelo HPV, embora número maior de pacientes brancas tenham sido atendidas no período. Estes dados estão em acordo com aqueles descritos por Cavalcanti e cols. (1994)⁷.

Analisando a prevalência dos tipos de HPV nas diferentes lesões histológicas, observamos que nos condilomas, 42,8% dos HPVs encontrados eram oncogênicos e 57,2% eram tipos benignos. Nas NICs I, 39% eram HPVs benignos sendo o restante constituído pelos tipos oncogênicos. O HPV 6 foi identificado isoladamente, somente em lesões benignas (condiloma e NIC I) (Fig. V). É de fundamental importância acompanhar estas pacientes que apresentam HPVs de alto risco em lesões iniciais, visto que o acompanhamento e o tratamento precoce destas lesões potencialmente pré-malignas pode prevenir o estabelecimento do câncer. Nas lesões pré-malignas e malignas (NIC II, NIC III e CCE), os tipos oncogênicos 16 e 18 foram detectados em todas as lesões positivas para o HPV, sendo que os tipos benignos aí encontrados mostraram-se sempre associados a tipos malignos (Fig. V e VI). Estes achados corroboram o conceito de serem estes tipos virais, fatores etiológicos do desenvolvimento do câncer cervical.

Nossos resultados confirmam a história natural da infecção pelo HPV quando observamos a variação de idade das pacientes em relação ao grau das lesões histológicas: pacientes com NIC I apresentavam média de idade de 35,4 anos; com NIC II apresentavam média de 31,8 anos; com NIC III a média era de 39,6 e com carcinoma (CCE), de 57 anos (Tabela I). Estes resultados apontam para a evolução das lesões iniciais induzidas pelos HPVs oncogênicos, ao longo do tempo; reforçando a associação de tipos virais com o estabelecimento de câncer. Já as infecções causadas por tipos benignos parecem regredir espontaneamente de modo que raramente algum HPV de baixo risco é detectado, isoladamente, em lesões malignas⁸.

Podemos concluir que a alta prevalência de HPVs oncogênicos em lesões benignas constitui fator relevante. Assim, o diagnóstico e a tipagem dos genomas virais pela hibridização *in situ*, nestas lesões, é muito útil como medida de prevenção do câncer, permitindo o estabelecimento precoce de conduta clínica e terapêutica adequadas. E ainda, a detecção viral em lesões pré-malignas e malignas não leva à interferência na conduta terapêutica, visto serem estas lesões comumente tratadas por excisões cirúrgicas. Deste modo, entendemos ser de pouca importância a realização rotineira do diagnóstico virológico em lesões severas mas de grande valia em lesões precoces mas com maior potencial de evolução maligna.

Tabela 1 – Média de idade das pacientes de acordo com o diagnóstico histológico das lesões

	Diagnóstico histológico das lesões					
	NIC 0 (n=1)	Condiloma (n=2)	NIC I (n=8)	NIC II (n=6)	NIC III (n=5)	CCE (n=4)
Xidade	34,5	26	31,8	35,4	39,6	57

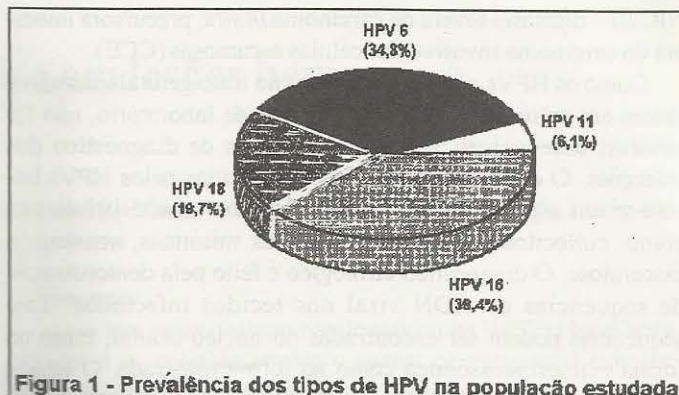


Figura 1 - Prevalência dos tipos de HPV na população estudada

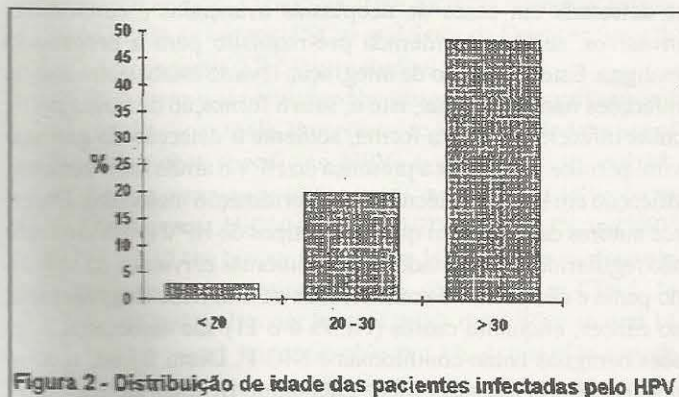


Figura 2 - Distribuição de idade das pacientes infectadas pelo HPV

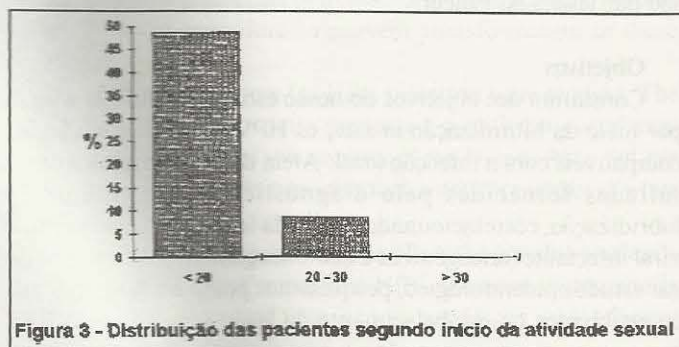


Figura 3 - Distribuição das pacientes segundo início da atividade sexual

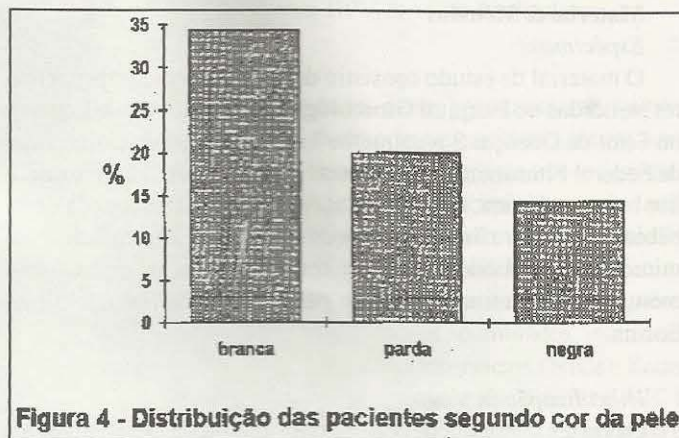


Figura 4 - Distribuição das pacientes segundo cor da pele

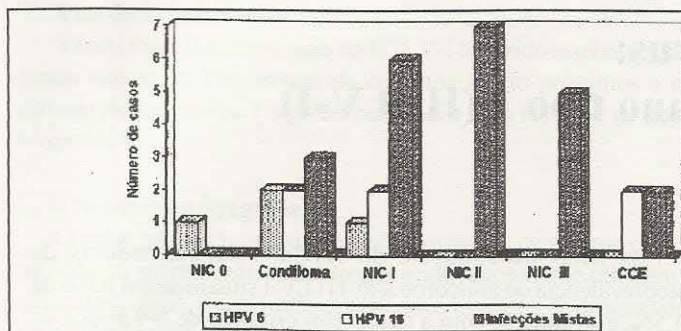


Figura 5 - Prevalência dos tipos de HPV nas diferentes lesões

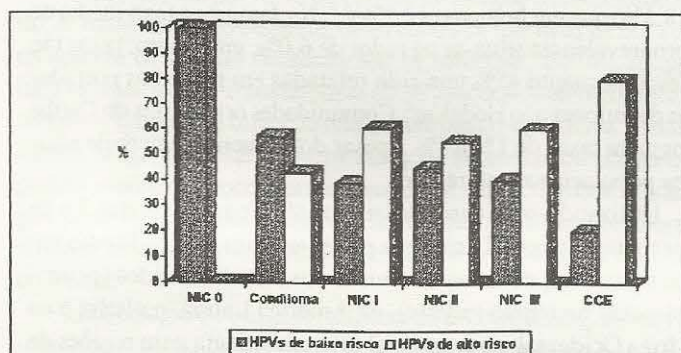


Figura 6 - Prevalência de HPVs de baixo e alto risco nas lesões analisadas

Referências bibliográficas

- 1 - Syrjanen KJ. Epidemiology of human papillomavirus (HPV) infections and their association with genital squamous cell cancer. *APMIS*, 97: 957-970, 1989.
- 2 - Zur Hausen H. Human papillomavirus in the pathogenesis of anogenital cancers. *Virology*, 184: 9-13, 1991.
- 3 - Meisels, A & Fortin, R. Coudylomatous lesions of the cervix and vagina: I. Cytologic patterns. *Acta cytol*, 20(6): 505-509, 1976.
- 4 - Gissman, L; Wolnik, L & Ikenberg, H. Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 80: 560-563, 1983.
- 5 - Nuovo, JG; Hochman, HA; Elvezri, YD; Lastarria, D; Comite, SL & Silvers, DN. Detection of human papillomavirus DNA in penile lesions histologically negative for condylomata. Analysis by *in situ* hybridization and the polymerase chain reaction. *Am. J. Surg. Pathol.*, 14: 829-836, 1990.
- 6 - Cuzick, J; Terry, G; Hollingworth, T & Anderson, M. Type-specific human papillomavirus DNA in abnormal smears as predictor of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Brit. J. Cancer*, 69: 167-171, 1994.
- 7 - Cavalcanti, SMB; Frugulhetti, ICP; Passos, MRL; Fonseca, ME; Oliveira, LHS. Prevalence of human papillomavirus DNA in female cervical from Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Osv. Cruz*, 89: 575-580, 1994.
- 8 - Crum, CP, Ikenberg, H; Richart, RM & Gissman, L. Human papillomavirus type 16 and early cervical neoplasia. *N. Engl. J. Med.*, 310: 880-883, 1984.

unimed
SÃO GONÇALO - NITERÓI