



## DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM MULHERES DAS CIDADES DE MARINGÁ E MARIALVA - PR

*Kallyandra Padilha<sup>1</sup>; Jessica Zironi Caitano<sup>2</sup>; Maria Augusta Furlanetto Gazola<sup>3</sup>; Valério Américo Balani<sup>4</sup>; Karen Brajão de Oliveira<sup>5</sup>*

**RESUMO:** O câncer do colo do útero tem se apresentado como o segundo tipo mais incidente de câncer diagnosticado em mulheres, sendo sua presença, sugerida em exames de prevenção para o câncer de colo de útero, e confirmadas apenas por testes moleculares. Este estudo teve como objetivo realizar a identificação do perfil de prevalência do HPV na população de Maringá e Marialva-PR, bem como a prevalência de tipos de alto risco para o carcinoma de colo uterino e análise dos fatores de risco que contribuem para a exposição da população. Foi aplicado um questionário socio-epidemiológico, onde os resultados foram analisados estatisticamente com nível de significância ajustado para  $p < 0,05$ . Foram analisadas amostras de células do epitélio cervical uterino, de 81 mulheres, com idade entre 18 à 76 anos. O DNA do HPV, foi detectado através da Reação em Cadeia da Polimerase, obtendo-se positividade em 2,5% (2/81) pacientes do estudo. Com a técnica de RFLP identificou-se os tipos HPV 62 e 81. Não foi observada diferença significativa quando relacionada a infecção, com as características sociodemográficas pesquisadas. A baixa incidência pode ser explicada por fatores comportamentais das mulheres avaliadas, que apresentam baixos índices de exposição a fatores de risco relacionados à aquisição do HPV.

**PALAVRAS-CHAVE:** Carcinoma de colo uterino; Papiloma Vírus Humano (HPV); PCR.

### 1 INTRODUÇÃO

O câncer cervical é uma das doenças malignas ginecológicas mais comuns, e também uma das principais causas de mortalidade por câncer em mulheres em todo o mundo, sendo que a infecção genital persistente por Papilomavírus Humano (HPV) de alto risco é considerada a causa central para o desenvolvimento da doença (JEMAL et al., 2011).

Os Papilomavírus Humanos (HPVs) são vírus da família Papilomaviridae, e seu material genético é representado por uma dupla hélice de DNA (SCULLY, 1985 apud XAVIER et al., 2007). O HPV pode infectar células epiteliais da pele e da mucosa, podendo causar, na maioria das vezes, infecções transitórias sem evidências clínicas da

<sup>1</sup> Acadêmica do Curso de Biomedicina, Centro Universitário de Maringá, Maringá, Paraná. Bolsista PROBIC/CESUMAR. [kally.andra@hotmail.com](mailto:kally.andra@hotmail.com)

<sup>2</sup> Acadêmica do Curso de Biomedicina, Centro Universitário de Maringá, Maringá, Paraná. [jessica-caitano@hotmail.com](mailto:jessica-caitano@hotmail.com)

<sup>3</sup> Acadêmica do Curso de Biomedicina, Centro Universitário de Maringá, Maringá, Paraná. [guta\\_gazola@hotmail.com](mailto:guta_gazola@hotmail.com)

<sup>4</sup> Pesquisador do Grupo São Camilo Medicina Diagnóstica, Divisão de Biotecnologia, Maringá, Paraná. [valerio@scbiotec.com.br](mailto:valerio@scbiotec.com.br)

<sup>5</sup> Docente do Curso de Biomedicina, Centro Universitário de Maringá, Maringá, Paraná. [karen.oliveira@cesumar.br](mailto:karen.oliveira@cesumar.br)

doença, contudo pode ocorrer também a formação de verrugas genitais ou condilomas (Rosenblatt et al., 2006).

Atualmente mais de 100 tipos de HPV são conhecidos por infectar seres humanos, e cerca de 15 tipos estão relacionados com o câncer cervical (BOSCH et al., 2002). A principal forma de classificação do vírus baseia-se na relação com a gênese do câncer. São descritos três grupos: os de alto risco oncogênico, composto principalmente pelos tipos 16 e 18; os de risco intermediário, que envolvem os tipos 31, 33, 35, 51, 52, e 58; e os de baixo risco oncogênico abrangendo os tipos 6, 11, 42, 43 e 44 (Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia, 2003).

O método de Captura Híbrida é considerado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) o padrão ouro na detecção e genotipagem do HPV, porém permite a identificação de apenas alguns tipos virais, sendo então, a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) a metodologia mais sensível na identificação do DNA viral existente nos diversos materiais clínicos (DO CARMO; FIORINI, 2007).

Considerando a relação do HPV com as progressões neoplásicas malignas e a importância da identificação precoce para o tratamento da infecção, este trabalho teve como objetivo realizar a identificação da prevalência do Papilomavírus Humano na população estudada bem como a prevalência de tipos de alto risco oncogênico em mulheres atendidas em programas de prevenção ao câncer de colo de útero do setor público de saúde das cidades de Marialva e Maringá –PR, bem como analisar os fatores de risco que contribuem para a exposição da população ao vírus, assim como os determinantes de sua manutenção.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 GRUPO DE ESTUDO**

Foi realizado um estudo transversal com 81 pacientes do gênero feminino, com idades entre 18 a 76 anos, atendidas em programas de prevenção ao câncer de colo de útero de unidades básicas de saúde localizadas na periferia das cidades de Maringá e Marialva, Paraná. A adesão das pacientes neste projeto de pesquisa ocorreu de forma voluntária, após receberem as informações e explicações sobre o estudo e seus objetivos, mediante leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, bem como participaram de uma entrevista baseada em um questionário sócio-demográfico. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Centro Universitário de Maringá em 06 de junho de 2010 sob o parecer nº152/2010, o qual esta de acordo com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

### **2.2 COLETA**

Para a análise, foram colhidas amostras de células, no período de agosto à setembro de 2010, oriundas do epitélio cervical uterino, no momento do exame ginecológico preventivo de rotina. As escovas cervicais estéreis utilizadas na confecção do esfregaço foram acondicionadas em tubos falcon contendo 2 mL de solução tampão TE, e então transportadas sob refrigeração até o laboratório e armazenadas a -20°C até o momento da extração do DNA.

### **2.3 EXTRAÇÃO DO DNA**

Para isolamento de DNA genômico foi utilizado o reagente DNAzol Reagent (Gibco BRL, Life Technologies®) conforme as recomendações descritas pelo fabricante. Os

fragmentos de DNA extraídos foram quantificados por espectrofotometria no aparelho UV-1650PC (Shimadzu, Kyoto, Japan).

## 2.4 AMPLIFICAÇÃO DE SEQUÊNCIAS DE NUCLEOTÍDEOS DO HPV

Para a detecção do DNA do HPV, foi empregada a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), devido a sua alta especificidade e sensibilidade. Foram utilizados iniciadores *forward* MY09 e *reverse* MY11, de acordo com o *GenBank Accession number*: AJ236888 que amplificam uma região conservada de 450 pb do gene L1 do HPV (BAUER *et al*, 1991 *apud* KANESHIMA *et al*, 2001), sendo as condições da reação em cadeia da polimerase: 1X PCR Buffer, 1,325mM de MgCl, 0,33mM de desoxinucleotídeos trifosfatado (dNTP), 825 nM de cada iniciador específicos MY09 e MY11, 0,75U de Taq DNA polimerase, 100 – 200 ng/μL de DNA extraído. Todas as reações foram efetuadas com um controle negativo, sem DNA, a fim de assegurar ausência de contaminação. Os fragmentos foram amplificados em um termociclador (*Thermo Electron Corporation*), utilizando-se uma temperatura de anelamento de 55°C.

## 2.5 AMPLIFICAÇÃO DO GENE DA β-actina

Para o controle da eficiência do método de extração do DNA e avaliação da presença de possíveis inibidores da PCR, foi amplificado o gene constitutivo da β-actina humana, utilizando-se *primers* específicos que amplificam uma região de 353pb. Os iniciadores utilizados para a amplificação foram obtidos de acordo com o *GenBank Accession number*: BC014861, como descrito por Amarante *et al.*, (2005). Os produtos resultantes das PCRs foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com brometo de etídio, para a detecção da presença do genoma do HPV.

## 2.6 GENOTIPAGEM DO HPV

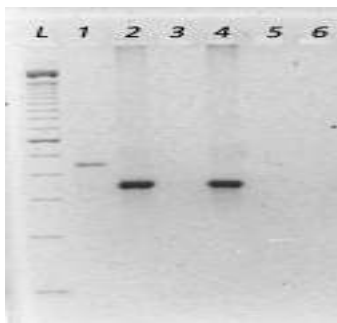
As amostras positivas para o vírus foram submetidas a clivagem com enzimas de restrição para identificação dos tipos de HPV. Os resultados foram analisados segundo a metodologia descrita por Kaneshima *et al.*, (2001) seguida de algumas modificações. Esse procedimento foi realizado no Laboratório São Camilo Divisão de Biotecnologia.

## 2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos dos questionários foram analisados estatisticamente utilizando-se o programa SPSS Statistics 17.0 (SPSS inc., Chicago, Illinois, USA). Foram realizados testes de qui-quadrado de Pearson e análise de correlação pelo teste de Spearman Rho e testes não paramétricos com correção de Yates. Para todos os dados o nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ .

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise molecular da presença do HPV foi realizada em 81 amostras, sendo que as amostras foram consideradas positivas quando observou-se a geração de um padrão de bandas de 450pb (Figura 1).



**FIGURA 1:** Perfil eletroforético do fragmento de HPV e da  $\beta$ -actina. Eletroforese em gel de agarose a 2%, mostrando a forma de avaliação dos padrões de bandas obtidos da PCR para o DNA do HPV e PCR para gene da  $\beta$ -actina humana, onde: L = padrão de tamanho molecular 100pb; Canaleta 1: amostra positiva para o HPV cerca de 450 pb; Canaleta 2 e 4: bandas para o gene da  $\beta$ -actina humana, para amostra 1 e 3, compreendendo aproximadamente 353 pb; Canaleta 3: amostra negativa para o HPV; Canaleta 5 e 6: Branco da PCR da  $\beta$ -actina humana e branco da PCR para HPV.

A presença do DNA do HPV foi observada em 2,5% (2/81) da população estudada. Porém não foi observada diferença significativa em relação às características sociodemográficas pesquisadas ( $p > 0,05$ ), o que pode ser explicado devido a participação aleatória, bem como a idade elevada das pacientes estudadas.

Nesta pesquisa participaram pacientes com idades entre 18 a 76 anos, onde 45,7% (37/81) relataram idade inferior a 35 anos; 27,2% (22/81) das pacientes encontravam-se na faixa etária de 36 a 45 anos e a mesma porcentagem com idade superior a 46 anos. Estudos mostram que há controvérsias em relação a presença do HPV e a idade de manifestação das infecções por ele causadas, sendo frequentemente relatadas em mulheres jovens.

Em relação ao grau de escolaridade das pacientes, 3,7% (3/81) relataram nunca ter frequentado a escola; 51,9% (42/81) haviam cursado o ensino fundamental incompleto e/ou completo e 12,3% (10/81) possuíam formação universitária incompleta/completa. O aumento do grau de escolaridade entre as pacientes deste estudo mostrou-se inversamente correlacionado a idade das mesmas, ( $p < 0,001$ ;  $Rho = -0,514$ ) o que nos permite associar à fatos antropológicos, onde as mulheres não deveriam frequentar a escola. Também foi observado que mulheres com elevado grau de escolaridade relataram uma maior frequência de infecções ginecológicas ( $p = 0,036$ ;  $Rho = 0,234$ ), o que pode estar relacionado a uma visão mais liberal em relação a sua sexualidade. A idade média de início da vida sexual em 63,0% (51/81) das participantes encontra-se entre 16 e 20 anos; 16,0% (13/81) tiveram sua primeira relação sexual com idade entre 11 e 15 anos, o que revela o início precoce da atividade sexual em nosso estudo. A idade de início da vida sexual faz diferença quando relacionada ao HPV, pois aumenta o tempo de exposição do indivíduo ao vírus, e conseqüentemente, o seu risco de contaminação. Observou-se que apenas 3,7% (3/81) das pacientes possuíam hábitos tabagistas, sendo que estas apresentaram também um início precoce da atividade sexual ( $p = 0,042$ ;  $Rho = -0,227$ ).

Quanto aos números de parceiros sexuais, até o momento da aplicação do questionário, 50,6% (41/81) das mulheres mantiveram relações sexuais com apenas um parceiro, 21,0% (17/81) com dois parceiros e 16,0% (13/81) admitiram mais de quatro parceiros. Quanto ao número de parceiros sexuais nos últimos seis meses, 11,1% (9/81)

relataram não ter relações sexuais durante esse período, enquanto 86,4% (70/81) das mulheres relacionaram-se sexualmente com apenas um parceiro, e 2,5% (2/81) tiveram dois parceiros sexuais.

Os produtos das amostras positivas para HPV foram clivados com enzimas de restrição (PCR-RFLP) gerando fragmentos que permitiram a identificação dos tipos 62 e 81 de HPV, que são classificados como causadores de infecções benignas (SCHIFFMAN et al, 2009).

Contudo, a presença de tipos de alto risco não é suficiente como parâmetro na predição do diagnóstico morfológico e do prognóstico. O mecanismo carcinogênico dos vários tipos de HPV é pouco conhecido. Alguns tipos, como o HPV 6 e HPV 11, são raramente identificados em cânceres humanos, mas são comuns na população (de SANJOSÉ et al., 2010). Desta forma são necessárias novas evidências e mais estudos a fim de compreendermos em que condições esses tipos podem levar ao câncer.

#### **4 CONCLUSÃO**

Esse estudo demonstrou uma baixa prevalência de infecções pelo HPV na população pesquisada das cidades de Marialva e Maringá, PR, não sendo observada diferença significativa quando relacionada à presença da infecção por HPV nas pacientes, com as características sociodemográficas pesquisadas, o que pode ser explicado pelas características da amostragem, que apresenta um comportamento de baixo risco para a infecção.

A baixa prevalência do HPV neste estudo pode também ser justificada pela elevada faixa etária apresentada, não descartando a hipótese da frequência do vírus aumentar com a diminuição da idade bem como a monogamia, fatores esses que deixam a população estudada menos exposta ao vírus.

Em relação a fatores como: grau de escolaridade, idade da primeira relação sexual, faixa etária e número de parceiros sexuais ao longo da vida foi observado que as pacientes com maior grau de escolaridade demonstraram um maior conhecimento acerca da transmissão do HPV, entretanto as mesmas apresentaram maior frequência de infecções ginecológicas, o que pode parecer contraditório, porém observou-se com o aumento do grau de escolaridade ocorria um aumento no número de parceiros sexuais.

Este trabalho possibilitou a detecção de tipos de HPV considerados causadores de infecções benignas ou classificados como indeterminados por diversos autores. Diante disso, torna-se necessário um melhor estudo sobre a classificação destes tipos virais para melhor compreensão do assunto. Além disso, a classificação adequada para esses tipos de HPV possibilita um programa de profilaxia através da vacinação de maneira mais eficaz.

#### **REFERÊNCIAS**

AMARANTE, M.K. et al. Expression of noncoding mRNA in human blood cells activated with synthetic peptide of HIV. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, v. 35, p. 286-290, 2005.

BOSCH, F.X.; LORINCZ, A.; Munoz, N.; MEIJER, C.J; SHAH, K.V.. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*. 2002;55:244–265.

de SANJOSÉ, S. et al. Cervical human papillomavirus infection in the female population in Barcelona, Spain. *Sexually Transmitted Diseases*, v. 30, n. 10, p. 788- 793, 2003.

DO CARMO, E.F.S.; FIORINI, A. Principais técnicas moleculares para detecção do Papilomavírus Humano. *SaBios-Rev. Saúde e Biol.*, Campo Mourão, v.2, n.1, p. 29-31, jan./ jun., 2007.

FEDERAÇÃO BRASILEIRA DAS SOCIEDADES DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA. *Papilomavírus Humano (HPV): Diagnóstico e Tratamento*. Projeto Diretrizes. set. 2002.

JEMAL, A. et al. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011; 61:69-90

KANESHIMA, E.N. et al. Aplicação do método PCR-RFLP para tipagem de HPV em infecções cervicais de pacientes atendidas no Lepac, Universidade Estadual de Maringá. *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 23, n. 3, p. 731-737, 2001.

ROSENBLATT, C. et al. *HPV na prática clínica*. São Paulo: Atheneu, 2006.

SCHIFFMAN, M. CLIFFORD, G. BUONAGURO, F.M. Classification of weakly carcinogenic human papillomavirus types: addressing the limits of epidemiology at the borderline. *Infectious Agents and Cancer*, v. 4, n. 8, 2009.

XAVIER, S. D. et al. Frequência de aparecimento de papilomavírus humano (HPV) na mucosa oral de homens com HPV anogenital confirmado por biologia molecular. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* São Paulo, v. 11, n. 1, p. 36-44, 2007.