

ESTUDO DA PREVALÊNCIA DE PAPILOMAVÍRUS HUMANOS EM LESÕES DO TRATO GENITAL MASCULINO

PREVALENCE STUDY OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS INFECTION IN MALE GENITAL LESIONS

Sílvia MB Cavalcanti¹, Maria OO Carvalho², Erinaldo A Souza³,
Bianca B Rolim⁴, Bianca M Maciel⁴, Juliana VM Passos⁴,
Luciana M Ramos⁴, Ledy HS Oliveira¹, Mauro R L Passos⁵

RESUMO

Os Papilomavírus humanos são os principais agentes causadores de cânceres genitais. Epidemias de HPV têm se tornado cada vez mais frequentes no mundo inteiro, sendo a infecção pelo HPV hoje estimada como a mais comum das Doenças Sexualmente Transmissíveis. O nosso estudo teve como objetivo pesquisar a presença do HPV em biópsias de lesões do trato genital masculino, compatíveis com infecção por este vírus, pelo método de hibridização *in situ*. Foram examinadas 75 biópsias de lesões classificadas à peniscopia em: condilomas, lesões papulares e lesões acetobranças. A prevalência da infecção foi de 78,7% (59/75), com predominância dos tipos 6 e 11, de baixo risco, detectados em 59,3% (35/59) dos casos positivos e a presença de HPVs de alto risco em 37,2% (22/59) das amostras. A importância da detecção destes HPVs de alto risco está no fato dos pacientes do sexo masculino serem a principal fonte de infecção do trato genital feminino, onde os HPVs exercem com maior eficiência seu potencial de transformação maligna.

Palavras-chave: Papilomavirus humano, prevalência, DST

ABSTRACT

Human papillomavirus are the the etiological agents of genital cancers. HPV epidemics are increasing worldwide, and are nowadays estimated as the most common Sexually Transmitted Disease. Our study aim to search for the presence of HPV in biopsies of the male genital tract, by using *in situ* hybridization. Seventy five samples were studied and obtained by using peniscopy, afterwards they were classified as condyloma, papules and acetowhite lesions. The HPV prevalence was 78,7% (59/75). Low risk HPV 6 and 11 were detected in 59,3% (35/59) of the positive lesions and high risk HPVs 16 and 18 were found in 37,3% (22/59). It is important to point out the detection of high risk HPVs, since male patients are the most important source of infection of the female genital tract, where HPVs fully exerts their potential of malignant transformation.

Keywords: Human papillomavirus, prevalence, STD

ISSN: 0103-0465

DST - J bras Doenças Sex Transm 13(2): 29-33, 2001

INTRODUÇÃO

Os papilomavírus humanos (HPVs) são constituídos por um grupo heterogêneo de pequenos vírus ADN com pelo menos 80 genotipos virais distintos¹. Estes vírus são capazes de infectar o tecido epitelial, causando lesões produtivas, hiperproliferativas e autolimitadas. Sua importância reside no fato de que certos tipos podem ter potencial oncogênico e, desta forma contribuir para o desenvolvimento de cânceres, especialmente no trato

genital². As lesões são primariamente de caráter benigno, com crescimento limitado e em geral regredem espontaneamente, ou manifestam-se clinicamente como verrugas comuns das mãos, plantares, papilomas laríngeos e condilomas (verrugas genitais), neoplasias intraepiteliais e carcinomas invasivo.

Mais de 20 tipos de HPV podem infectar o epitélio genital³. As infecções genitais causadas pelos HPVs são consideradas Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) e, vêm se tornando cada vez mais frequentes. O início da atividade sexual e a maturidade sexual conduzem a uma alta prevalência de infecções anogenitais nos grupos com idade entre 15 e 40 anos^{4,5,6}. Dados experimentais e epidemiológicos têm demonstrado o papel central de tipos específicos de HPV na etiologia do câncer anogenital, especialmente do carcinoma cervical⁷. Conseqüentemente, os HPV podem ser classificados de acordo

1- Docentes da Disciplina de Virologia - MIP/CMB/CCM-UFF

2- Bióloga especialista em Virologia, estagiária do Lab de Virologia - UFF

3- Monitor da Disciplina de Virologia - Faculdade de Medicina - UFF

4- Bolsistas de Iniciação Científica - Projeto PIBIC-UFF/CNPq

5- Docente Setor de DST - MIP/CMB/CCM - UFF

com seu potencial maligno. Entre os tipos de alto risco, geralmente encontrados em displasias de alto grau e cânceres invasivos estão os tipos 16 e 18, mas este grupo inclui ainda os tipos 31,33 e 35 entre outros menos freqüentes. Os tipos 6 e 11 em geral são encontrados em lesões benignas e, apesar de causar proliferação anormal do epitélio, são raramente associados a quadros de transformação maligna¹. Atualmente, em especial nas duas últimas décadas, a prevalência de infecções por HPV tem aumentado em mundo inteiro, fato este atribuído a mudanças nos hábitos sexuais na maioria dos países, e esta é hoje estimada como a mais comum das Doenças Sexualmente Transmissíveis⁸. Enquanto nos países desenvolvidos o câncer genital é uma doença em franco declínio observa-se, ainda, uma alta prevalência de câncer genital em países em desenvolvimento. No Brasil, a incidência de câncer genital é das mais altas em todo o mundo⁹.

Apesar da grande importância clínica de se reconhecer lesões relacionadas aos papilomavírus, os critérios disponíveis para que o diagnóstico de rotina seja satisfatório ainda não estão bem definidos. A aplicação de ácido acético e a introdução da peniscopia (escopia genital armada) têm sido vistas como de grande valia na detecção das lesões por HPV no trato genital masculino¹⁰. Porém, a utilização de técnicas de Biologia Molecular, com a detecção do genoma viral por métodos de hibridização de ácido nucleico, permite identificar a presença de HPV, e ainda, classificá-los em tipos.

O nosso estudo teve como objetivo pesquisar a presença do HPV em biópsias de lesões do trato genital masculino compatíveis com infecção viral. O material das biópsias foi estudado pelo método de hibridização *in situ* para identificação e tipagem do HPV presente nas lesões

METODOLOGIA

Amostras

O presente estudo consistiu da análise de 75 biópsias obtidas de pacientes do sexo masculino atendidos no Setor de Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST) da Universidade Federal Fluminense (UFF). Os participantes do estudo, foram submetidos ao exame de escopia genital armada (peniscopia) e retirada de biópsia, para diagnóstico histológico e virológico.

Escopia Genital

Todos os pacientes que participaram do nosso trabalho foram examinados com a utilização do Colposcópico DF Vasconcellos, com aumento de 6 – 40X, após aplicação de ácido acético 5% durante 3-5 minutos. Os resultados da peniscopia foram classificados como a seguir:

- condilomas acuminado - lesões vegetativas do tipo verrucoso
- lesões papulosas - lesões elevadas circunscritas com epitélio rugoso, claramente distintos do condiloma

- lesões acetobranças - visualizadas após aplicação do ácido acético
- lesões não classificadas - lesões ulceradas, verrugas comuns, etc...

Detecção do ADN viral

Sondas - utilizamos sondas genéticas para os HPVs tipos 6,11,16,18,31,33 e 35, gentilmente cedidas pela Dr.^a de Villiers (*Papillomavirus International Reference Laboratory, Heidelberg*). A amplificação e purificação do material foram feitas em gradiente de cloreto de cézio. A marcação dos plasmídeos foi feita com biotina 11-dUTP (Sigma) usando-se um *kit de Nick translation (BRL)*.

Hibridização *in situ* - foram obtidos cortes de 5 m das amostras de biópsias parafinadas e montadas em lâminas pré-tratadas com silane. A fixação do material ocorreu a 60°C por duas horas. A desparafinização das lâminas foi feita em xilol e etanol sendo em seguida lavadas em água corrente.

Os ácidos nucleicos foram expostos pelo tratamento com proteínase K (Sigma) a 37 °C. As lâminas receberam a mistura de hibridização, contendo SSC 5X, polietilenoglicol, ADN de esperma de salmão, as sondas marcadas com biotina e formamida deionizada. O material foi desnaturado a 92°C durante 10 minutos e hibridizado a 37°C por duas horas. Em seguida, as lâminas foram lavadas em SSC.

A detecção dos híbridos foi realizada utilizando o complexo conjugado estreptavidina-fosfatase alcalina em temperatura ambiente por 30 minutos. Foi feita a remoção do conjugado não associado aos híbridos por lavagem em tampão. Para revelar a reação, as lâminas foram incubadas com o substrato NBT-BCIP (*Nitro Blue Tetrazolium-Bromocloroindolilfosfato*). O procedimento de observação foi realizado ao microscópio ótico e as células foram consideradas positivas quando apresentavam precipitado roxo-avermelhado no núcleo.

Na reação foram utilizadas biópsias de tecidos infectados e não infectados por HPV, como controles positivos e negativos.

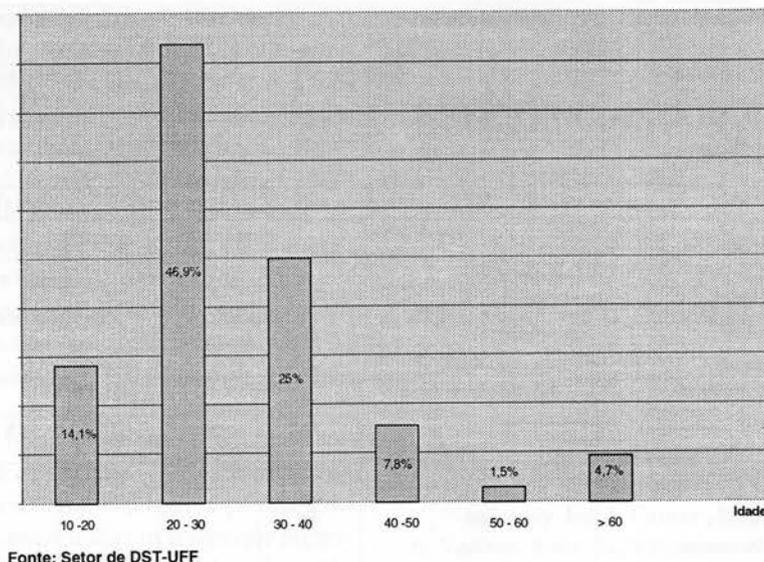
RESULTADOS

Em nosso estudo foram avaliadas 75 amostras de biópsias obtidas de lesões do trato genital masculino. As lesões estudadas, foram avaliadas por peniscopia e hibridização *in situ*. De acordo com os resultados obtidos da peniscopia, as lesões foram classificadas em: 53 (70,6%) lesões condilomatosas, 11 (14,7%) lesões papulosas, 9 (12,0%) lesões acetobranças e 2 (2,7%) lesões não classificadas.

A média de idade dos participantes foi de 30,8 anos, variando de 16 a 75 anos. A faixa etária de maior incidência das lesões observadas pela peniscopia foi de 20 – 30 anos, período da maturidade sexual (**gráfico 1**).

Conforme apresentado na **tabela 1**, a correlação dos achados da peniscopia e da hibridização *in situ* para detecção do ADN viral foi de 78,7% (59/75). Das 53 lesões condilomatosas diag-

Gráfico 1 – Distribuição de idade de pacientes infectados pelo HIV



nosticadas pela peniscopia, 10 não demonstraram relação com HPV pela hibridização *in situ*, resultando em uma prevalência da infecção em 81,1% (43/53) dos casos. Em lesões papulosas, o ADN viral foi detectado em 90,9% (10/11) dos pacientes. Nas lesões acetobranças a hibridização apresentou positividade em 55,5% (5/9). Observamos ainda na **tabela 1**, que nas lesões não classificadas pela peniscopia 50% (1/2) apresentaram positividade na hibridização *in situ*.

Na **tabela 2**, estão representados os resultados obtidos pela peniscopia de acordo com os tipos encontrados na hibridização *in situ*. Nos condilomas acuminados o ADN viral foi detectado em 81,1% das lesões com predominância dos tipos benignos (6 e 11) em 62,8% casos. Nas lesões papulosas, 90,9% das amostras demonstraram positividade, com 50% das lesões apresentando HPV de alto risco (16 e 18). A presença do ADN viral nas lesões acetobranças foi de 55,5% (5/9), havendo maior prevalência dos tipos benignos (6 e 11) com 60% dos casos.

No **gráfico 2**, está ilustrada a prevalência dos tipos de HPV. Apenas os tipos virais 6 e 16 foram detectados em infecções sem associação com outro tipo viral.

DISCUSSÃO

Nos últimos anos, várias metodologias vêm sendo desenvolvidas para demonstrar a presença de papilomavírus humanos de forma eficiente em indivíduos apresentando lesões genitais. Métodos de hibridização do ácido nucleico são utilizados em associação aos exames à vista armada para que diagnósticos mais conclusivos sejam obtidos pelo paciente de forma mais rápida, a fim de que medidas de prevenção e controle possam ser introduzidas.

Pacientes que apresentam as verrugas genitais visíveis, denominadas condilomas acuminados, com alta prevalência na população infectada, são facilmente identificadas clinicamente. Nosso

maior problema reside nas lesões epiteliais planas, nas quais o exame clínico à vista desarmada pode não ser eficiente.

Em 75 amostras de biópsias analisadas em nosso estudo, 59 foram positivas à hibridização (78,7%). Dos casos com resultado positivo houve maior prevalência dos tipos 6 e 11 (HPVs de baixo risco), sendo estes detectados em 35 (59,3%) dos casos.

Das 53 lesões condilomatosas, 43 foram confirmadas pela hibridização *in situ* (81,1%) sendo 27 infectadas por HPVs de baixo risco (62,8%). Estes dados estão em concordância com o já descrito por outros autores de que os HPVs 6 e 11 estão relacionados às infecções benignas, com frequente regressão espontânea⁸. Em 10 (18,9%) lesões com diagnóstico de condiloma acuminado pela peniscopia, a hibridização *in situ* não detectou a presença do ADN viral, o que pode ser atribuído à utilização de número restrito de sondas moleculares, bem como à sensibilidade da técnica, de cerca de 90%.

A técnica de hibridização *in situ* vem sendo vista como apropriada para detecção de ácido nucleico em exames de rotina⁸. Embora, dentre as técnicas moleculares, esta apresente menor sensibilidade, demonstra ter especificidade bastante elevada. Técnicas de amplificação podem também ser utilizadas mas são mais dispendiosas e demoradas. A grande vantagem da hibridização *in situ* está no fato dela poder ser realizada diretamente sobre esfregacos e biópsias, possibilitando ainda a avaliação histológica da lesão.

O diagnóstico clínico de lesões papulosas também mostrou-se altamente sensível pelo exame de peniscopia. A hibridização *in situ* para detecção do ADN viral demonstrou concordância em 90,9% das lesões avaliadas. Nossos resultados apontam um percentual de 50% de prevalência dos tipos considerados de alto risco, o que resulta na necessidade de acompanhamento criterioso do paciente e seu(s) parceiro(s), tendo em vista o potencial oncogênico dos vírus presentes.

Nas lesões acetobranças, diferente do observado nos outros tipos de lesões, a hibridização *in situ* confirmou a presença do

Tabela 1 – Correlação entre os resultados da peniscopia e da hibridização *in situ*.

Peniscopia	Nº de pacientes	Hibridização		Prevalencia %
		+	-	
Condiloma Acuminado	53	43	10	43/53 (81,1)
Lesão Papulosa	11	10	01	10/11 (90,5)
Lesão Acetobranca	09	05	04	05/09 (55,5)
Lesão não classificada	02	01	01	01/02 (50,0)
Total	75	59	16	59/75 (78,7%)

Fonte: Setor de DST-UFF

Tabela 2 – Distribuição dos diferentes tipos de HPV de acordo com o resultado da peniscopia.

Peniscopia	Nº de pacientes	Tipos de HPV				
		06	11	16	18	Mista*
Condiloma Acuminado	53	18	-	06	-	19
Lesão Papulosa	11	05	-	01	-	04
Lesão Acetobranca	09	02	-	-	-	03
Lesão não classificada	02	-	-	01	-	-
Total	75	25	-	08	-	26

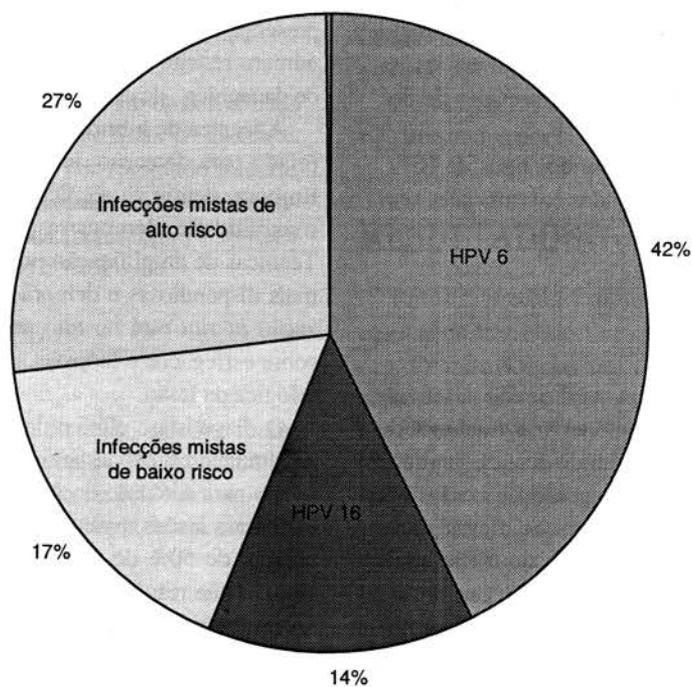
Fonte: Setor de DST-UFF

* Infecções Mistas

Condiloma Acuminado – 9 (6, 11); 4 (6, 16); 2 (6, 11, 16); 1 (6, 16, 18); 1 (6, 11, 16, 18); 2 (21, 33, 35)

Lesão Papulosa – 2 (6, 18); 2 (6, 11, 16, 18)

Lesão Acetobranca – 1 (6, 11); 1 (6, 16, 16, 18)

Gráfico 2 – Prevalência dos tipos de HPV na população estudada

Fonte: Setor de DST-UFF

HPV em apenas 55,5% dos casos diagnosticados pela peniscopia. Nossos resultados estão de acordo com o já visto por outros autores⁸ que demonstraram a possibilidade de resultados falso positivos pela peniscopia. Porém, os tipos de HPV de alto risco foram observados em apenas 40% dos casos contrariando a literatura¹⁰, que descrevem a presença dos tipos 16 e 18 em grande parte das lesões subclínicas. Tais lesões vem sendo intensamente estudadas pois não há um padrão clínico para seu diagnóstico. Elas podem ser resultado de infecções por HPV mas também de processos inflamatórios inespecíficos e dermatoses, entre outros. Há que se considerar a importância da detecção de HPV em lesões subclínicas, visto que pacientes do sexo masculino são a principal fonte de infecção do trato genital feminino, onde os HPVs exercem com maior eficiência seu potencial de transformação maligna (Villa, 1997).

Duas lesões observadas em nosso estudo não obtiveram classificação quanto ao exame de peniscopia, entretanto em uma dessas a hibridização apresentou como resultado a presença do HPV do tipo 16, correntemente encontrado em lesões que progredem ao carcinoma invasivo. Este diagnóstico é insatisfatório para o clínico no que diz respeito à conduta a ser empregada. Observa-se entretanto que o uso combinado da peniscopia após a aplicação do ácido acético 5%, seguido da detecção do ADN viral nas lesões observadas resultam em diagnósticos conclusivos indicando a necessidade do diagnóstico de suas parceiras expostas à infecção pelo vírus, que nos pacientes resultou em lesões clínicas.

No gráfico 2, observamos ainda a presença de infecções mistas em 44,1% (26/59) dos casos, onde a presença de dois ou mais tipos virais é comumente observada. Nestas lesões com infecções mistas existe a predominância de casos com o ADN viral dos tipos de alto risco (16/26) em 61,1% dos pacientes. As infecções mistas com tipos de baixo risco ocorreram em apenas 38,4% (10/26) dos casos.

Em nosso estudo, avaliamos amostras de lesões genitais de pacientes do sexo masculino: 78,7% destas foram positivas para infecção por HPVs. Embora o câncer genital masculino causado pelo HPV seja um evento raro, o homem é a principal fonte de contaminação da mulher. É no trato genital feminino que a infecção pelo HPV tem maior risco de levar ao estabelecimento

de lesões malignas. Desta forma, a avaliação criteriosa e o diagnóstico preciso de lesões masculinas são etapas fundamentais no processo de prevenção do câncer cervical em todo o mundo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Villa LL Human papillomavirus and cervical cancer. *Adv. Cancer Res.* **71**: 321-341,1997.
2. De Villiers. Human pathogenic papillomavirus types. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **186**:1-12,1994.
3. De Villiers. Heterogeneity of the human papillomavirus group. *J. Virology.* **63**: 4898-4903,1989.
4. De Villiers, EM, Wagner D, Scheneider A, Wesch H, Miklaw H et al. Human papillomavirus infection in women with and without abnormal cervical cytology. *Lancet.* **2**: 703-6,1987.
5. Morrison EA, Ho GY, Vermud SH, et al. Human papillomavirus infection and other risk factors for cervical neoplasia: a case-control study. *Int. J. Cancer.* **49**:6-13,1991.
6. Van den Brule AJ, Walbooners JMM, Du Maine M, Kenemans P, Meijer CJLM. Difference in prevalence of human papillomavirus genotypes in citomorfologically normal cervical smears is associated with a history of cervical intraepithelial neoplasia. *Int. J. Cancer* **48**: 404-8,1991.
7. Schiffman MH. Epidemiology of cervical human papillomavirus infections. *Cur Microbiol. Immunol* **186**:56-78,1994.
8. Syrjanen KJ. Epidemiology of human papillomavirus (HPV) infections and their association with genital squamous cell cancer. *APMIS* **97**: 957-970,1989.
9. Lowy DR, Kimbauer R Schiller JT. Genital human papillomavirus infection. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **91**: 2436-2440,1994.
10. Wikstrom, A; Hedblad, MA; Ktari, M.; Syrjanen, S.; Lindberg, M; Von Krogh, G. The acetic-acid evaluation of subclinical genital papillomavirus infection: a comparative study on peniscopy, histopathology, virology and scanning electron microscopy findings. *Genitourin. Med.*, **68**: 90-99,1992.

Endereço para correspondência:

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