

ESTUDO DE INFECÇÕES POR PAPILOMAVÍRUS HUMANOS EM PACIENTES DO SEXO FEMININO, DETECTADOS PELA TÉCNICA DE CAPTURA DO HÍBRIDO: LEVANTAMENTO DOS CASOS

STUDY OF HUMAN PAPILOMAVIRUS INFECTIONS IN FEMININE SEX PATIENTS, DETECTED BY HYBRID CAPTURE ASSAY IN: SURVEY OF THE CASES

Fernanda N Carestiato¹, Maria Odete O Carvalho¹, Mariza O Ribeiro², Marcia Marinho³, Fábio M Barbosa⁴, Licinio E Silva⁵, Trude Dimetz⁶, Ledy HS Oliveira⁷, Silvia MB Cavalcanti⁷

RESUMO

Introdução: Apesar de todos os esforços, a epidemia de papilomavírus humano (HPV) continua crescendo. Por esta razão, a busca de novas ferramentas de diagnóstico para as infecções causadas por estes vírus se faz necessária. **Objetivo:** Estudar as infecções genitais causadas pelo HPV, determinando a prevalência dos tipos de HPV em pacientes do sexo feminino, atendidas pelo Laboratório Sérgio Franco do Estado do Rio de Janeiro, no ano de 2001. **Método:** 1.616 amostras de pacientes femininos foram submetidas a exames para detecção de HPV pela Técnica de Captura do Híbrido, utilizando o kit Digene (USA) Hybrid Capture® II HPV Test. **Resultados:** Do total das amostras analisadas, 745 pacientes estavam infectadas pelo HPV (46,1%), contra 871 resultados negativos (53,9 %). Dos exames positivos, 436 eram do grupo de alto risco (sonda B), 64 do grupo de baixo risco (sonda A) e 245 eram positivos para ambos os grupos. A faixa etária de maior prevalência de infecção pelo HPV foi dos 20-30 anos de idade. **Conclusão:** Os resultados mostraram aproximadamente 50% das mulheres infectadas, sendo a maioria de mulheres jovens. Destas, mais de 90% estavam infectadas com tipos de HPV oncogênicos (sozinhos ou em infecções mistas). Caracterizando, desta forma, uma população com alto risco de desenvolver câncer e que, portanto, precisa ser acompanhada a fim de prevenir o processo de transformação maligna.

Palavras-chave: HPV, captura híbrida, câncer cervical

ABSTRACT

Introduction: Although all the employed efforts the epidemics of Human Papillomavirus (HPV) still growing worldwide. Hence, the search for improvements in diagnosis of HPV infection is still necessary. **Objective:** To study the genital infections caused by the HPV, determining the prevalence of HPV types in female sex patients, attended at Laboratório Sergio Franco of the State of Rio de Janeiro, in 2001. **Methodology:** 1.616 samples of female patients had been submitted the examinations for detection of HPV for the Technique of Hybrid Capture. Using the kit Digene (USA) Hybrid Capture® II HPV Test. **Results:** Among all the samples analyzed, 745 patients were infected by HPV (46.1%), against 871 negative results (53.9 %). In positive examinations, 436 were of high-risk group (Probe B), 64 of low-risk group (Probe A) and 245 were positive for both groups. The band of major prevalence of HPV infection was the 20-30 years of age. **Conclusion:** The results showed approximately 50% of the infected women, being the majority young women. Of these, more than 90% were infected with oncogenic HPV types (alone or in mixed infections), characterizing, a population with high risk to develop cancer and therefore, needs to be followed in order to prevent malignant transformation.

Keywords: HPV, Hybrid capture, cervical cancer

ISSN: 0103-4065

DST - J bras Doenças Sex Transm 14(6): 9-12, 2002

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o interesse pelo papilomavírus humano (HPV) tem crescido em função do acúmulo de evidências do seu potencial oncogênico, principalmente no trato anogenital. Sequências de DNA de certos tipos de HPV têm sido encontradas em até 90% dos carcinomas cervicais.^{2,3,4} Mas, segundo alguns estudos este valor chega a 99,7%.^{5,6} Aliado a este fato, existem evidências de que a epidemia de HPV tem crescido nas últimas

¹ Aluna do Curso de Mestrado em Patologia Experimental, Universidade Federal Fluminense/Bolsista CAPES

² Supervisora do Setor de Biologia Molecular do Laboratório Sérgio Franco

³ Diretora do Laboratório Sérgio Franco

⁴ Responsável pelo Setor de Informática do Laboratório Sérgio Franco

⁵ Prof. Adjunto do Departamento de Estatística, Universidade Federal Fluminense

⁶ Consultora Científica do Laboratório Sérgio Franco

⁷ Profa. Adjunta do Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal Fluminense

décadas e, atualmente, as lesões relacionadas com eles são consideradas como a doença sexualmente transmissível mais prevalente em todo o mundo.

Em muitos países em desenvolvimento o câncer cervical é o câncer feminino mais freqüente, bem como representa a principal causa de mortes relacionadas com câncer entre as mulheres.³ No Brasil, a taxa de mortalidade por câncer do colo uterino continua bastante elevada. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) esta taxa era de 3,44 por 100 mil mulheres em 1979, enquanto em 1999 este valor subiu para 4,67. O que corresponde a uma variação percentual relativa de 36%. Para o ano de 2002, as estimativas de óbitos e de novos casos em todo o país eram respectivamente, 4.005 e 17.600; com taxas brutas correspondentes de 4,49/100.000 e 19,82/100.000.⁸ O aumento destas taxas ocorreu apesar de o Brasil ter sido um dos primeiros países a introduzir o Papanicolaou para detecção de lesões precursoras e do próprio câncer de colo de útero. Visto que somente 20% das mulheres faz o teste (80% das brasileiras não fazem Papanicolaou regularmente e apenas 10% repetem os exames todos os anos), descobre-se a doença em fase avançada em 70% dos casos.⁹

O papilomavírus humano apresenta uma excepcional variedade de genótipos. Até agora, 85 tipos de HPV tinham sido identificados e completamente sequenciados, porém mais de 120 novos tipos possíveis foram parcialmente caracterizados. Todos os tipos identificados parecem ser estritamente epiteliotrópicos.¹⁰ Um levantamento feito em conjunto entre o Instituto Ludwig (São Paulo) e a Universidade McGill (Canadá) realizado no Brasil propõe que cerca de 40 tipos de HPV diferentes, incluindo tipos que ainda estão aguardando classificação taxonômica definitiva, possam infectar o trato anogenital. São eles HPV 6, 11, 16, 18, 26, 31, 32, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 62, 64, 66, 67, 69, 70, 72, MM4, MM7, MM8, CP108, CP8061, CP8304, I539.¹¹

Diversos estudos mostram que a etiologia do câncer cervical tem sido ligada a vários tipos de HPV, com uma maior prevalência de HPV16.^{6,7,10} Entretanto, geograficamente, segundo Cavalcanti *et al* (2000) a distribuição de tipos de HPV na Europa é diferente no Brasil: em nosso país, infecções por HPV 18 oncogênicos foram detectadas em aproximadamente 30% das lesões cervicais, em contraste com os níveis europeus que não excedem 10%. Este fato pode explicar tão pobre prognóstico das lesões de baixo grau (LSILs) no Brasil, visto que o HPV 18 é considerado o tipo mais agressivo dentre os HPV oncogênicos.¹²

A identificação de tipos de HPV é importante no sentido de estabelecer qual tipo mais adequado de tratamento deve ser adotado pelo médico a fim de prevenir efetivamente o câncer cervical; principalmente, nas pacientes infectadas pelos HPV de maior potencial oncogênico.

Logo, o nosso trabalho tem como objetivo determinar a prevalência de HPV em pacientes atendidas pelo Laboratório Sérgio Franco, que cobre diferentes regiões do estado do Rio de Janeiro, com lesões suspeitas de infecção por HPV, levando em consideração a maior probabilidade de evolução maligna nas pacientes acometidas pelos HPV de alto-risco.

MÉTODOS

Specimens

Nosso estudo foi composto por 1616 amostras de pacientes do sexo feminino, com idades variando de 16 a 82

anos, atendidas no Laboratório Sérgio Franco (Rio de Janeiro). Estas pacientes foram submetidas a exames clínicos e tiveram esfregaços ou biópsias colhidas para diagnóstico citológico e teste de detecção de HPV por captura híbrida.

Captura Híbrida para HPV

Foi utilizado o kit Digene (USA): Hybrid Capture® II HPV Test (sistema em microplaca. Os esfregaços foram coletados em frascos contendo tampão de transporte (Specimen Transport Medium - STM). Em seguida, foram desnaturados em solução de NaOH (500mL), misturados em vortex por 5 segundos e, então, incubados a 65° por 45 minutos em banho-maria. A etapa seguinte é de hibridização

O teste de Captura Híbrida® II de HPV usa dois coquetéis que distinguem tipos virais de baixo-risco (sonda A = HPV 6, 11, 42, 43 e 44) e alto-risco (sonda B = HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68). São adicionados 25mL de cada coquetel de sonda e 75mL da amostra. O material é adicionado mantido em *shaker* rotatório por 2 a 3 minutos a 1.000 rpm. Depois de 1 hora de incubação a 65°C em banho-maria, é iniciada a captura do híbrido, transferindo-se 100mL do frasco de hibridização para uma microplaca recoberta com anticorpo anti-híbrido DNA-RNA (amostra-sonda). Mantém-se a placa por 1 hora no *shaker* a 1.000 rpm. Lava-se em tampão 3X. Acrescentam-se 75mL do reagente de detecção 1 (conjugado anti-anticorpo e fosfatase alcalina) e incuba-se por 30 minutos a 25°C. Lava-se em tampão 6X. Finalmente são acondicionados 75mL do substrato quimioluminescente (reagente de detecção 2) para detecção dos híbridos, que é feita após 15 minutos de incubação a 25°C.

A leitura é feita em luminômetro DML 2.000 imediatamente após o término da amplificação do sinal, onde os valores superiores ao valor de corte (*cut off* >1.0) são considerados positivos para sonda A, B ou ambos. A luz emitida é medida em unidade relativa de luz (URL) neste aparelho. Em cada reação são incluídos controles negativo e positivo A e B em triplicata.

RESULTADOS

O nosso estudo avaliou 1616 amostras de pacientes do sexo feminino com idades variando de 16 a 82 anos. Deste total, 745 pacientes tiveram resultado positivo para o teste de captura híbrida, contra 871 resultados negativos o que representa 46,1% das pacientes infectadas por algum tipo de HPV e 53,9% pacientes não-infectadas.

Dos casos positivos, 436 pacientes estavam infectadas com HPV do grupo de alto-risco (sonda B), 64 eram do grupo de baixo-risco (sonda A) e 245 pacientes foram positivos para ambos grupos (sondas A e B). A prevalência respectiva destes valores foi de 58,5%; 8,6% e 32,9%. Dados apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Divisão dos resultados positivos para HPV por grupos de risco

	Classificação	Pacientes (N)	Prevalência (%)
CAPTURA HÍBRIDA	Alto risco (B)	436	58,5
	Baixo risco (A)	64	8,6
	Infecção mista (A+B)	245	32,9

O **Gráfico 1** apresenta a quantidade de exames positivos encontrados para cada faixa etária. (Observação: As idades superiores a 65 anos foram agrupadas na mesma faixa etária devido à escassez de resultados positivos até os 82 anos.) A faixa etária que apresentou o maior número de exames positivos foi a dos 21 aos 25 anos, contando com 220 resultados. Neste gráfico, observamos ainda um decréscimo gradual do número de pacientes infectados conforme o aumento das idades. A prevalência relativa dos valores em questão está representada no **Gráfico 2**. Neste gráfico, ficou evidenciado que as faixas etárias dos 21-25 anos e dos 26-30 anos de idade concentraram o maior número de pacientes infectadas pelo HPV. Juntas, representam 53,3% de todas as infecções por HPV.

A **Tabela 2** e o **Gráfico 3** apresentam a relatividade entre os exames positivos e os negativos distribuídos pelas faixas etárias. Os dados apontaram que a prevalência relativa dos resultados positivos sobre os negativos das mulheres mais jovens, com menos de 30 anos, foi muito maior do que a das mulheres com mais de 30 anos. O único resultado que foge deste contexto é o da faixa etária de 61 aos 65 anos, que poderia ser atribuído ao fato de ter sido testado um número de amostras muito pequeno (17 exames), requerendo estudos futuros.

Gráfico 1 - Exames positivos x distribuição por faixa etária

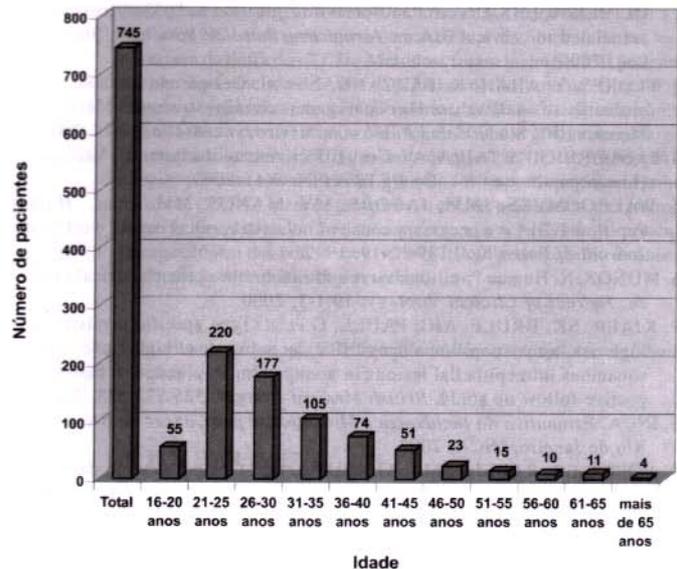


Tabela 2 - Prevalência relativa dos resultados positivos e negativos distribuídos por faixa etária

Casos Femininos	Positivos	%	Negativos	%	Total	%
16-20 anos	55	71,4	22	28,6	77	100
21-25 anos	220	63,4	127	36,6	347	100
26-30 anos	177	50,1	176	49,9	353	100
31-35 anos	105	37,9	172	62,1	277	100
36-40 anos	74	35,9	132	64,1	206	100
41-45 anos	51	31,5	111	68,5	162	100
46-50 anos	23	29,9	54	70,1	77	100
51-55 anos	15	27,8	39	72,2	54	100
56-60 anos	10	30,3	23	69,7	33	100
61-65 anos	11	64,7	6	35,3	17	100
mais de 65 anos	4	30,8	9	69,2	13	100
Total	745	46,1	871	53,9	1616	100

Gráfico 2 - Prevalência de exames positivos x distribuição por faixa etária

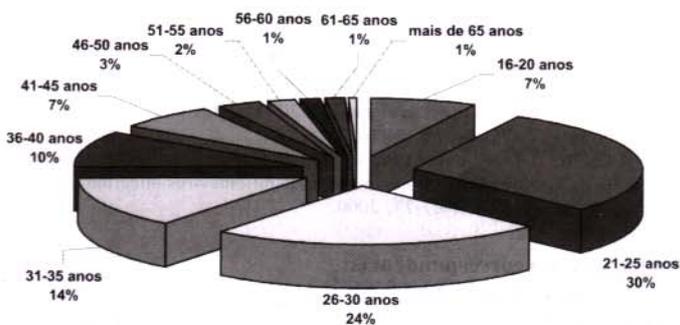
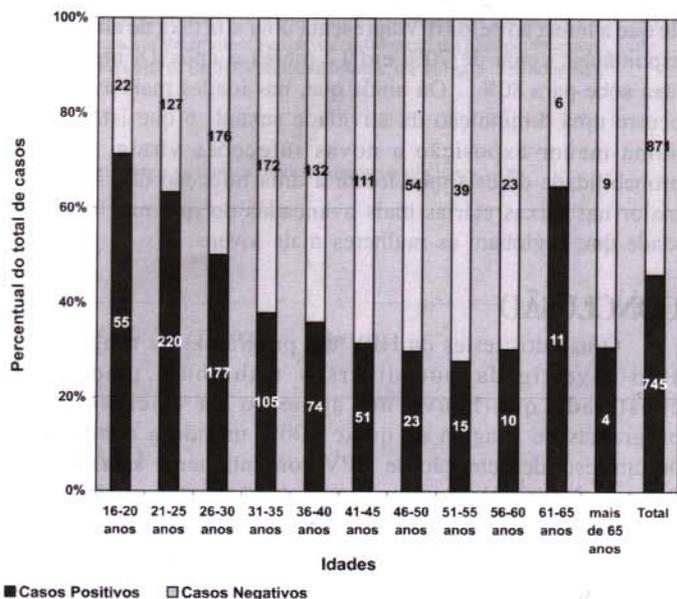


Gráfico 3: Relatividade entre os exames femininos positivos e os negativos por faixa etária



DISCUSSÃO

Os resultados apresentados mostraram que aproximadamente 50% das mulheres estão infectadas por algum tipo de HPV. Destas, mais de 90% com tipos de HPV oncogênicos (sozinhos ou em infecções mistas), caracterizando, desta forma, uma população com alto risco de desenvolver câncer. E, portanto, precisa ser acompanhada clinicamente para pesquisa de possíveis lesões ou, ainda, se surgirão lesões futuras.

A faixa etária de maior prevalência de infecção pelo HPV está compreendida entre os 20 aos 30 anos de idade. Este perfil está de acordo com os resultados de diversos estudos, dentre eles os dirigidos por Morrison *et al.* (1991), Schiffman *et al.* (1993), Doros (1994) Jacyntho & Barcelos (1999) e Sedlacek (1999) que foram citados por Bringhenti, Gonçalves e Bedin (2001) num trabalho realizado por eles, e que também encontrou uma maior incidência de HPV nas pacientes jovens.¹³ É importante lembrar que a faixa etária dos 20 aos 30 anos coincide com o pico de atividade sexual das mulheres e que a lesão provocada por estes vírus é uma doença sexualmente transmissível (DST).

Considerando a faixa etária dos 16 aos 20 anos, os resultados mostraram a maior relação de exames positivos pelo número de exames realizados. A explicação para estes valores, segundo o CDC, deve-se dentre outros fatores, à cérvix do adolescente ser ativamente transformada de epitélio colunar para epitélio escamoso, fazendo com que seja mais vulnerável às DST como o HPV.¹⁴ Outra questão que deve ser levantada é que o início precoce da atividade sexual das adolescentes constitui um fator de risco importante para o desenvolvimento do câncer.¹⁵ Visto que, quanto mais cedo for o contato com o vírus, mais cedo poderá ocorrer a persistência dele no organismo, aumentando assim as chances de ocorrerem transformações malignas em pacientes mais jovens.

Ainda podemos observar neste levantamento um declínio na prevalência de infecções pelo HPV conforme o aumento da idade das pacientes. Esta análise está em conformidade com os dados apresentados no Barcelona HPV 2000 (Conferência Internacional sobre Papilomavirus).¹⁵ Uma explicação possível para este fenômeno pode ser dada pelo fato de que a infecção pelo HPV apresenta uma alta taxa de eliminação espontânea, cerca de 70% em 12 meses e após 18 meses esta taxa sobe para 80%.¹⁶ Ou ainda que, nas idades mais avançadas ocorre uma diminuição da atividade sexual; e que isto resulta numa menor exposição a novas infecções virais. Logo, a probabilidade de estarmos frente a uma infecção não recente é maior nas faixas etárias mais avançadas do que nas faixas de idade que englobam as mulheres mais jovens.

CONCLUSÃO

O uso dos testes de HPV em programas de triagem tem sido investigada por diversos trabalhos, tendo sido constatado que houve um aumento da eficiência dos programas de triagem de quase 100% usando a combinação de um teste de detecção de HPV conjuntamente ao exame de Papanicolaou.¹⁵ No entanto, em países em desenvolvimento como o Brasil, o custo da implantação destes testes juntamente ao exame de Papanicolaou encareceria muito o custo dos programas de prevenção do Ministério da Saúde.

Mas, devido ao risco relativo de câncer associado a certos tipos de HPV (oncogênicos), tem sido sugerido uma detecção da infecção viral direcionada somente para os tipos de HPV de alto-risco para complementar o exame de Papanicolaou na evidência das mulheres com maior risco de desenvolver o câncer cervical.¹³ Portanto, o uso da sonda B (grupo de alto-risco) da captura híbrida junto com o Papanicolaou aumentaria a eficiência da triagem, e desta forma não encareceria tanto os programas de prevenção de câncer. Por esta razão, podemos dizer que a melhor rotina de identificação e acompanhamento das lesões pelo HPV é a combinação das técnicas de Papanicolaou com a Captura Híbrida, de forma a prevenir o câncer cervical.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MONTERO, JA; LARKIN, JA; HOUSTON, SH *et al.* Examining the complex relationship of human Papillomavirus to cervical dysplasia and carcinoma. *Medscape Women's Health Journal*, 2(3), 1997. (<http://www.medscape.com>)
2. CAVALCANTI, SMB; PASSOS, JVM; RAMOS, LM; ZARDO, LG & OLIVEIRA, LHS. Human Papillomavirus infection and p53 overexpression associated to cervical cancer. *Jornal Brasileiro de Patologia*, 36(4):257-262, 2000.
3. FLORES, Y; AHAH, K; LAZCANO, E *et al.* Design and methods of the evaluation of an HPV-based cervical cancer screening strategy in México: The Morelos HPV Study. *Salud Pública de México*, vol.44(4):335-344, 2002.
4. SANDERS, GD & TAIRA, AV. Cost-Effectiveness of a Potential Vaccine for Human papillomavirus. *Emerg Infect Dis* 9(1), 2003.
5. WALBOOMERS, JMM; JACOBS, MV; MANOS, MM *et al.* Human Papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology*, 189:12-19, 1999.
6. MUÑOZ, N. Human Papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *Journal of Clinical Virology*, 19:1-5, 2000.
7. KJAER, SK; BRULE, AJC; PAULL, G *et al.* Type specific persistence of high risk human papillomavirus (HPV) as indicator of high grade cervical squamous intraepithelial lesions in young women: population based prospective follow up study. *British Medical Journal*, 325:572-578, 2002.
8. INCA. *Estimativa da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil 2002*. Rio de Janeiro, INCA, 2002.
9. LOPES, ER; RABELO, MS; ABREU, E *et al.* Comportamento da população brasileira feminina em relação ao câncer cérvico-uterino. *J Bras Ginecol*, 105(11/12):505-515, 1995.
10. ZUR HAUZEN. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host cell control in early events in carcinogenesis. *Journal of The National Cancer Institute*, 92(9):690-698, 2000.
11. FRANCO, E; VILLA, L; ROHAN, T *et al.* Design and methods of the Ludwig-Mc Gill longitudinal study of the natural history of human Papillomavirus infection and cervical neoplasia in Brazil. *Pan. Am. J. Public Health*, 6(4):223-233, 1999.
12. CAVALCANTI, SMB *et al.* Epidemiological aspects of human Papillomavirus infection and cervical cancer in Brazil. *Journal of Infection*, 40:80-87, 2000.
13. BRINGHENTI, MEZ; GONÇALVES, TL & RODRIGUES, YB. HPV na gênese de lesões cérvico-uterinas – Métodos diagnósticos (Citopatologia - Tipagem viral). *RBAC*, vol.33 (3):117-120, 2001.
14. SULAK, P. Adolescent Sexual Health: Providing Factual Information, 2002. (<http://www.worththewait.org>)
15. BOSCH, FX; ROHAM, T; SCHNEIDER, A *et al.* Papillomavirus research update: highlights of the Barcelona HPV 2000 International Papillomavirus Conference. *J Clin Pathol*, 54:163-175, 2001.
16. DILLNER, J. Trends over time in the incidence of cervical neoplasia in comparison to trends over time in human Papillomavirus infection. *Journal of Clinical Virology*, 19:7-23, 2000.

Endereço para correspondência:

SILVIA MB CAVALCANTI

Rua Ernani Melo, 101 – Lab Virologia – Dep Microbiologia e Parasitologia – Instituto Biomédico – UFF
CEP: 24210-030 – Centro – Niterói - Rio de Janeiro
E-mail: silviabc@ism.com.br