

PAPILOMAVIRUS HUMANO ONCOGÊNICO RELACIONADO À CITOLOGIA ONCOLÓGICA EM MULHERES HIV POSITIVO NA CIDADE DE PELOTAS, RS

NUNES, Emily Montosa^{1,4}; ENTIAUSPE, Ludmila Gonçalves^{1,4}; SILVEIRA, Mariângela Freitas da²; COLLARES, Tiago^{3,4}; SEIXAS, Fabiana Kömmling^{1,4}

¹Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Laboratório de Genômica Funcional. ²Universidade Federal de Pelotas, Centro de Estudos Epidemiológicos, Faculdade de Medicina. ³Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Laboratório de Embriologia Molecular e Transgênese. ⁴Grupo de Pesquisas em Oncologia Celular e Molecular – RS, Brasil. emontosa.biotec@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

O Vírus do Papiloma Humano (HPV) foi identificado pela primeira vez há quatro décadas por Harald zur Hausen, como agente causal de câncer cervical (CC). O DNA do HPV encontra-se presente em até 99,7% dos casos de CC (Sellors *et al.*, 2003) e estimativas mundiais mostram que existem 300 milhões de infectados por HPV assintomáticos (WHO, 2009). O câncer cervical é o segundo câncer que mais acomete mulheres, levando ao óbito 31.400 mulheres por ano na América Latina (WHO, 2006) e 11.000 no Brasil (INCA, 2010).

Os HPV podem ser classificados quanto ao seu potencial oncogênico como baixo risco ou alto risco. Tal divisão explica porque somente os tipos de alto risco de lesões possuem uma maior capacidade de gerar progressão maligna (Kinney *et al.*, 2011).

Em condições de baixa da imunidade, as quais podem ser geradas por doenças autoimunes ou co-infecção pelo vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) existe uma maior possibilidade de ativação do HPV (Franceschi e Ronco *et al.*, 2010). Assim, uma elevada produção de cópias poderá levar a uma infecção no tecido gerando a lesão (Gross e Tyring, 2011).

Segundo Franceschi e Ronco (2010), o risco relativo de infecção por HPV entre os co-infectados por HIV comparado aos não-infectados varia entre as populações dependendo do grau da imunossupressão. Referente ao câncer cervical, esse aumento de risco relativo pode variar de 2 a mais de 20 vezes, uma vez que envolve morte prematura por outras causas, detecção precoce e tratamento de lesões pré-cancerosas.

Uma vez que o CC é o mais comum entre mulheres na população HIV positivas (CDC, 2011), este trabalho objetivou determinar a prevalência do HPV em um grupo de mulheres HIV positivo com idades entre 18 e 45 anos na cidade de Pelotas, RS, e relacionar as amostras positivas com o resultado do exame citopatológico.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

O estudo contou com a participação de 100 mulheres, as quais assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, e das quais foram coletadas amostras de secreção cervical. As análises citopatológicas foram realizadas no Laboratório de Patologia e Citologia (LAPACIT) e os testes moleculares ocorreram no laboratório de Genômica Funcional do Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). O DNA genômico foi extraído

(Gentra Puregene Buccal Cell Kit, QIAGEN) e submetido à amplificação do gene L1 do HPV pela técnica de reação em cadeia da polimerase *nested* (nPCR), com os primers MY09/11 (MANOS *et al.*, 1989) e GP5/6 (GRAVITT *et al.*, 2000). Os *amplicons* gerados (450pb) foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% e 2%, respectivamente, corados com GelRed, a 100 V por 60 minutos. As amostras positivas para HPV foram purificadas e sequenciadas através do sequenciador automático MegaBACE 500 (Amersham Biosciences) para investigação dos genótipos através da comparação com sequencias depositadas no GenBank pertencente ao National Center for Biotechnology Information (NCBI). As análises estatísticas foram realizadas no software STATA v.16®, e foi considerado como valor significativo $P \leq 0,005$

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em 10 das 100 amostras coletadas não foi possível obter os resultados citopatológicos, totalizando 90 amostras analisadas. Destas, 62,2% apresentou normalidade celular (Tab. 1). A análise molecular detectou a presença de HPV em 65,6% (n=59) das amostras. Foram encontrados oito genótipos, sendo que os de alto risco oncogênico correspondem a 22,1% (n=13). Entre estes, os mais prevalentes foram o HPV-16 (8,5%) e HPV-31 (6,8%) presentes em citologia normal (11,1% e 8,3%, respectivamente), como exposto na tabela 2.

Tabela 1 – Resultado das análises citopatológicas.

Exame citopatológico	% (n) ^a
Normal	62,2 (56)
Inflamatório	30,0 (27)
AGUS ^b	2,2 (2)
ASCUS ^c	2,2 (2)
NIC III ^d	1,1 (1)
Inconclusivo	2,2 (2)
Total	100,0 (90)

^a $P < 0,005$. ^bCélulas Glandulares Atípicas de Significado Indeterminado; ^cCélulas Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado; ^dNeoplasia Intra-epitelial Cervical de Grau III.

Dados de um estudo de metanálise realizado em diferentes países da Europa, África, Ásia e América mostraram que a prevalência de HPV em mulheres HIV positivas foram maiores no Brasil e México (57,3%) comparados às médias globais (36,5%), com maior prevalência do HPV-16. Este genótipo também foi encontrado como o mais prevalente no Brasil e Índia (30,9% e 33%, respectivamente) (Clifford *et al.*, 2006).

Nas análises bivariadas, foi encontrado que 64,3% (n=36) das pacientes com citologia normal apresentavam DNA-HPV. Além disso, os tipos de lesões encontrado na análise citopatológica estavam em grande parte relacionadas com a presença do DNA- HPV: Inflamatório com 66,7%, Células Glandulares Atípicas de Significado Indeterminado (AGUS) 50%, Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado (ASCUS) e Neoplasia Intra-epitelial Cervical (NIC) III com 100% cada.

Tabela 2 – Análise bivariada entre resultados citopatológicos e genótipos.

	Normal ^b	Inflamatório ^c	AGUS ^d	ASCUS ^e	NIC III ^f	Inconclusivo ^g	Total
HPV-16	11,1 (4)	-	-	-	100,0 (1)	-	8,5 (5)
HPV-18	-	5,6 (1)	-	-	-	-	1,7 (1)
HPV-31	8,3 (3)	5,6 (1)	-	-	-	-	6,8 (4)
HPV-35	-	5,6 (1)	-	-	-	-	1,7 (1)
HPV-45	-	5,6 (1)	-	-	-	-	1,7 (1)
HPV-55	-	-	-	50,0 (1)	-	-	1,7 (1)
Não oncogênicos	58,4 (21)	38,9 (7)	100,0 (1)	50,0 (1)	-	-	50,9 (30)
HPV-X*	22,2 (8)	39,9 (7)	-	-	-	100,0 (1)	27,1 (16)
Total	100,0 (36)	100,0 (18)	100,0 (1)	100,0 (2)	100,0 (1)	100,0 (1)	100,0 (59)

^bCélulas Glandulares Atípicas de Significado Indeterminado; ^cCélulas Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado; ^dNeoplasia Intra-epitelial Cervical de Grau III.

*HPV-X – amostras sequenciadas, mas que não foi possível identificar os genótipos

Quanto às análises citopatológicas, a alta prevalência de HPV encontrada neste estudo está de acordo com Luz *et al.* (2012) que observou 75,7% de DNA-HPV em amostras de pacientes HIV positivas. Além disso, também apresentou porcentagens próximas para AGUS (0,3%) e ASCUS (6,7%). Acredita-se que tais valores devem-se ao fato de que a alteração celular mediada por HPV seja um fenômeno lento e progressivo, dependente de fatores ambientais e do hospedeiro, e sua presença possivelmente não tenha sido capaz de causar transformações detectáveis pelos métodos citopatológicos convencionais (Vaz *et al.*, 2011).

4 CONCLUSÃO

Este estudo ressalta a importância do uso do diagnóstico biomolecular complementar ao exame citopatológico convencional, possibilitando uma detecção e acompanhamento precoce das alterações celulares subclínicas causadas pelo HPV, uma vez que esta malignidade é prevenível através de estratégias de informação, detecção precoce e monitoramento das pacientes com risco aumentado de desenvolvimento de câncer cervical.

5 REFERÊNCIAS

Centers for Disease Control and Prevention. **Sexually Transmitted Diseases (Genital HPV Infection - Fact Sheet)**. Disponível on-line em <http://www.cdc.gov/std/hpv/stdfact-hpv.htm/>. 2011

CLIFFORD, GM; Gonçalves MAG; Franceschia, S. Human papillomavirus types among women infected with HIV: a meta-analysis for the HPV and HIV Study Group. **AIDS**, v. 20, n. 1, p. 2337-44, 2006.

FRANCESCHI, S; Guglielmo, R. The prevention of cervical cancer in HIV-infected women. **AIDS**, v. 24, n. 1, p. 2579-80, 2010.

GROSS, G; TYRING, SK. **Sexually Transmitted Infections and Sexually Transmitted Diseases**. Berlin: Springer, 2011.

GRAVITT, PE. *et al.* Improved amplification of genital human papillomaviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 1, 357-361, 2000.

HUSNJAK, K *et al.* Comparison of five different polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus in cervical cell specimens. **Journal of Virological Methods**, v. 88,125-134, 2000.

KINNEY, W *et al.* Characteristics of 44 cervical cancers diagnosed following Pap-negative, high risk HPV-positive screening in routine clinical practice. **Gynecologic Oncology**, v. 121, n. 2, p. 309-313, 2011.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). (2009) **Estimativas 2010: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, p. 94, 2009.

LEVI, JE *et al.* Presence of multiple human papillomavirus types in cervical samples from HIV-infected women. **Gynecologic Oncology**, v. 92, n. 1, p. 225-31, 2004.

LUQUE, AE *et al.* Prevalence of human papillomavirus genotypes and related abnormalities of cervical cytological results among HIV-1-Infected Women in Rochester, New York. **Journal of Infectious Diseases**, v. 194, n. 1, p. 428-34, 2006.

LUZ, PM *et al.* Cervical cytological abnormalities and factors associated with high-grade squamous intraepithelial lesions among HIV-infected women from Rio de Janeiro, Brazil. **International Journal of STD & AIDS**, v. 23, n. 1, p.12-17, 2012.

MANOS, MM. *et al.* The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. **Cancer Cells**, v. 7, p. 209–214, 1989.

SELLORS, JW. *et al.* Incidence, clearance and predictors of human papillomavirus infection in women. **Canadian Medical Association Journal**, v. 168, n. 4, p. 421-425, 2003.

VAZ, LP *et al.* Epidemiologia da infecção pelo HPV em mulheres infectadas pelo HIV. **Femina**, v. 39, n. 1, p. 35-40, 2011.

World Health Organization (WHO). **Comprehensive cervical cancer control: a guide to essential practice**. Geneva, p.259, 2006.

WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). **Summary report on HPV and cervical cancer statistics in Brazil**, p.28, 2007 Disponível on-line em www.who.int/hpvcentre