



DETECÇÃO DE DNA DE HPV EM AMOSTRAS CERVICAIS

Alana Suertegaray de Souza¹

Mirela Gehlen²

Ana Carla Marques da Costa³

Maria Lúcia Rossetti⁴

Resumo

O Papillomavírus humano (HPV) é a infecção sexualmente transmissível (IST) mais prevalente no mundo todo. A doença induzida por este vírus está na dependência de vários outros fatores que afetam o hospedeiro. O principal fator é a imunossupressão, principalmente associada à infecção por HIV. Portanto, este trabalho teve como objetivo identificar DNA de HPV em mulheres com HIV na região Leste Maranhense. Foram utilizadas 125 mostras cervicais de mulheres com HIV que eram acompanhadas pelo Serviço de Atendimento Especializado (SAE) na cidade de Caxias, Maranhão. O DNA das amostras de células endocervicais foi extraído com o kit comercial High Pure Viral Nucleic Acid (Roche, EUA), extraído e amplificado por PCR com os *primer* consenso (GP5+/GP6+) de uma região conservada em todos os subtipos de HPV, que geraram um fragmento de 150 pares de base da região L1 do genoma viral. Os amplicons obtidos foram visualizados em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio. A detecção dos genótipos de alto risco foi por hibridização em placa de ELISA com sondas específicas para cada genótipo. A prevalência de DNA de HPV em pacientes infectadas por HIV foi de 44,8%. Os genótipos mais frequentes foram HPV 18, HPV 16. O HPV menos frequente encontrado foi o HPV 52. Apenas o genótipo HPV18 foi detectado sozinho. Os demais genótipos foram detectados como múltiplas infecções. Neste estudo foi possível verificar a elevada prevalência de DNA de HPV em mulheres com HIV e também de infecções com mais de dois tipos de HPV estudado.

Palavras chave: IST; Papillomavírus humano; PCR;

1 Aluna do curso de graduação Biomedicina – Bolsista CNPq – alana_suertesouza@hotmail.com

2 Programa de Pós-Graduação em Ciência Pneumológicas, UFRGS – mirelagehlen@gmail.com

3 Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde

4 Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde – mrossett@terra.com.br

INTRODUÇÃO

O HPV (vírus do papiloma humano) é uma infecção sexualmente transmissível (IST), provocada por vírus que atacam, especialmente, as mucosas (oral, genital ou anal), tanto nas mulheres como nos homens. A infecção por Papillomavírus humano (HPV) é a IST mais frequente no mundo. O desenvolvimento destas lesões está diretamente relacionado com a presença dos diferentes tipos de HPV (TROTIER et al., 2006).

Por genotipagem, já foram identificados mais de 200 tipos de HPV classificados conforme seu potencial oncogênico em alto e baixo-risco. Entre os tipos de baixo risco encontra-se 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 e 8, os de alto-risco, apresentam-se os tipos 16 e 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68. A infecção pelo HPV é um importante fator de risco para o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas e neoplásicas do colo uterino, com maior chance de desenvolvimento em portadoras do HIV, em decorrência da imunossupressão. A coinfeção HIV e HPV têm sido relatadas devido aos fatores de risco para essas duas infecções serem bastante similares, como múltiplos parceiros sexuais, idade precoce para a primeira relação sexual, sexo com homens que tiveram múltiplas parceiras, baixo nível socioeconômico e prática sexual sem proteção, são importantes fatores ou risco comuns às duas infecções virais (AMARAL et al., 2011).

A infecção por HPV é fortemente associada ao desenvolvimento do câncer de colo do útero (SOTLAR et al., 2004; NONENMACHER et al., 2003). No Brasil, estima-se que 15.590 mulheres adoeçam anualmente, com taxa de incidência bruta de 15,33/100 mil, o que torna a prevenção e o controle do câncer do colo do útero prioridades nos pactos de gestão da saúde voltados para a saúde da mulher. (FACINA, 2014). A variação nas prevalências encontradas entre diversos estudos pode em parte ser devido ao delineamento dos estudos e o uso de técnicas de identificação de DNA viral de diferentes sensibilidades. Entretanto, a maior positividade do HPV em mulheres HIV é observada independentemente do exame realizado.

Portanto, este trabalho teve como objetivo identificar DNA de HPV em amostras cervicais de mulheres com HIV na região do leste maranhense.

METODOLOGIA

As análises foram realizadas em amostras cervicais de pacientes portadoras de HIV que são acompanhadas pelo Serviço de Atendimento Especializado/Centro de

Testagem e Aconselhamento (SAE/CTA) na cidade de Caxias, Maranhão, no período de setembro de 2014 a setembro de 2016. Para realização da pesquisa, foi estimado um número (n) de 126 de mulheres com o HIV. O DNA das amostras de células endocervicais foi extraído utilizando um kit comercial High Pure Viral Nucleic Acid kit (Roche, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Após a extração, o DNA foi armazenado a -20°C. O DNA extraído foi amplificado por PCR com os *primer* consenso (GP5+/GP6+) de uma região conservada de HPV, que geram um fragmento de 150 pares de base (pb) da região L1 do genoma viral. A reação de PCR foi realizada com tampão (50nM de KCl, 10mM Tris_HCl ph 8,5), 2,5 mM de MgCl₂, 0,25 mM de dNTPs (desoxirribonucleosida 5'-triofosfatos – dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 50 ng de cada *primer*, 2,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, Life Technologies®, São Paulo, Brazil), 5 µl de DNA no controle positivo (plasmídeo), por fim adicionado água ultrapura para completar o volume final de 50 µl. As condições da PCR utilizadas foram: desnaturação inicial 5 min a 95°C; 40 ciclos de 1 min a 95°C, seguidos de 1 min a 52°C e 1 min a 72°C; e extensão final 10 min a 72°C. Os amplicons obtidos foram visualizados em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo. A detecção dos genótipos de alto risco foi realizada por hibridização em placa de ELISA com sondas específicas para os genótipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fim de verificar a presença de HPV nas pacientes, foram amplificadas todas as 125 amostras. Dessas, 56 (44,8%) foram consideradas positivas, pois as amostras apresentaram fragmentos de tamanho de 150 pb correspondentes à região L1. As amostras negativas não apresentavam amplificação do fragmento. Os genótipos mais frequentes foram HPV 18 (96,4%), seguido do HPV 16 (89,3%). O HPV menos frequente encontrado foi o HPV 52 (1,8%). Apenas o genótipo HPV18 foi detectado sozinho (3,5%). Os demais genótipos foram detectados como múltiplas infecções (96,5)

Nesse estudo a prevalência de HPV foi de 44,8% em mulheres com HIV. Essa prevalência está dentro do esperado, uma notícia divulgada pela Secretaria da Saúde de Minas Gerais (2017) sobre uma pesquisa feita pelo Ministério da Saúde indica que 54,6% dos brasileiros entre 16 e 25 anos têm prevalência de HPV, sendo que 38,4% são de tipos de alto risco para desenvolvimento de câncer.

De tudo que já se conhece a respeito da infecção pelo HPV e neoplasia cervical em mulheres portadoras do HIV, muitas dúvidas levantadas permanecem sem resposta, incluindo o melhor seguimento para essas pacientes, estratégia de vigilância, o papel dos diferentes tipos de HPV e a identificação de fatores independentes, preditivos do desenvolvimento da doença.

Figura 1: Fotografia de eletroforese em gel de agarose 2% de produtos amplificados por PCR. Canaleta 1: Marcador; Canaleta 2: Controle positivo; Canaleta 3 – 10: Amostras amplificadas por PCR; Canaleta 11: Controle negativo.

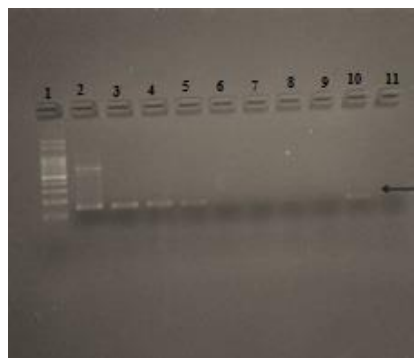


Figura 2: Placa de ELISA com sonda específica para o genótipo 18.

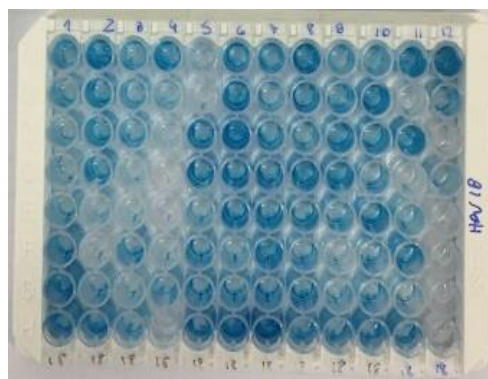


Tabela 1: Frequência de coinfeção HPV/HIV

HPV Alto Risco	%
HPV 18	96,4%
HPV 16	89,3%
HPV 58	46,4%
HPV 56	33,9%
HPV 33	28,6%
HPV 59	10,7
HPV 39	8,9%
HPV 31	7,1%
HPV 45	3,6%
HPV 52	1,8%

CONCLUSÕES

Neste estudo foi possível verificar a elevada prevalência de DNA de HPV em mulheres com HIV positivo e também de infecções com mais de dois tipos de HPV estudado. A identificação da prevalência de HPV de alto risco pode auxiliar na identificação de mulheres sob maior risco de evolução desta lesão.

REFERÊNCIAS

AMARAL, W. N.; MANOEL, W. J.; SADDI, V. A.; VAZ, L. P. Epidemiologia da infecção pelo HPV em mulheres infectadas pelo HIV. **RBGO [online]** - v. 23, nº 6, 2011.

FACINA T. Estimativa 2014 – **Incidência de Câncer no Brasil**. **Rev Bras Cancerol**. 2014 [citado 30 jun 2017];60(1):63-4. Disponível em: http://www.inca.gov.br/rbc/n_60/v01/pdf/11-resenhaestimativa-2014-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf. Acesso em: 31. Maio. 2018, 21:10:35

NONNENMACHER B, PINTOS J, BOZZETTI MC. Epidemiologic correlates of antibody response to human papillomavirus among women at low risk of cervical cancer. **Int J STD AIDS**. Porto Alegre, v. 14, p. 258-65, 2003.

Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais SES, 2017/2018. Disponível em: <http://www.saude.mg.gov.br/hpv>. Acesso em: 31. maio. 2018, 21:08:10.

SOTLAR K, STUBNER A, DIEMER D, MENTON S, DIETZ K, WALLWIENER R, et al. Detection of high-risk human papillomavirus E6 and E7 oncogene transcripts in cervical scrapes by nested RT-polymerase chain reaction. **J Med Virol**. Germany, v. 74, p.107-16, 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15258976>].

TROTTIER H, FRANCO E. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. **Vaccine**. v. 24, p.4-15, 2006.