

ESTUDO DO TIPO DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) NO APARELHO GENITAL FEMININO E MASCULINO

CÉU SANTO, ÂNGELA PISTA, ELVIRA BARTOLO, MATOS ALMEIDA, LAURA AYRES, PRATAS FERREIRA, GUERRA RODRIGO

Serviços de Ginecologia/Obstetrícia e Dermatologia do Hospital de Santa Maria. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Lisboa.

RESUMO

O diagnóstico e tipificação do Papilomavírus Humano foi iniciado no Laboratório de Virologia do Instituto Nacional de Saúde em Novembro de 1990. Até Maio de 1991 foram estudadas 81 amostras provenientes de 70 indivíduos, 57 do sexo feminino e 13 do sexo masculino, observados na Unidade de Patologia Cervico-Vulvar da consulta de ginecologia do Hospital de Stª Maria. De entre os indivíduos do sexo feminino, 49 (86%) tinham evidência colposcópica, histológica e/ou citológica que sugeriam infecção pelo HPV. No sexo masculino, 11 indivíduos (85%) tinham manifestações clínicas e os restantes 2 (15%) correspondiam a casos em que houve contacto sexual com indivíduos infectados, embora até ao momento não se observassem lesões aparentes. A detecção do DNA foi positiva em 43 indivíduos (61%), dos quais 42 foram positivos para o HPV-6/11 (98%) e 1 para o HPV-16 (2%). Embora preliminares, estes resultados sugerem que também entre nós a infecção genital pelo Papilomavírus Humano deve ser considerada um problema de Saúde Pública no domínio das doenças sexualmente transmissíveis.

SUMMARY

Typing of human papillomavirus (HPV) in female and male anogenital samples

Diagnosis and typing of HPV was started in November 1990 at the Virology department of the National Health Institute, Lisbon. Eighty one samples from 70 patients were studied, 57 from women observed at the cervico-vulvar out patient unit of the Gynecology department of Stª Maria Hospital, Lisbon, and 13 from male contacts of some of these women. Forty nine women (86%) had colposcopic, histological or cytological evidence of HPV infection. Eleven men (85%) have clinical signs of infection and 2 (15%) had had sexual intercourse with infected partners with clinical evidence of infection. HPV DNA was detected in 43 patients (61%). Forty two were infected with HPV 6/11 (98%) and one with HPV 16 (2%). These preliminary results suggest that genital infection by HPV must also be considered a public health problem in the field of sexually transmitted diseases in Portugal.

INTRODUÇÃO

Estudos recentes, utilizando técnicas de biologia molecular tais como a hibridação do ácido deoxirribonucleico (DNA), demonstraram a existência de um grande número de tipos distintos de Papilomavírus Humano - HPV^{1,2}. Cada novo tipo de HPV isolado deve ter menos de 50% de homologia com as sequências de DNA de outros tipos de HPV já caracterizados. Estes progressos da técnica têm tornado possível demonstrar que certos tipos de HPV são isolados preferencialmente em certas localizações. Assim, verificou-se que os condilomas genito-anais estão associados predominantemente ao HPV dos tipos 6, 11, 16 e 18^{3,5}.

Nestes últimos anos, a literatura tem-nos alertado para o potencial oncogénico de determinados tipos de HPV, nomeadamente dos HPV-16, -18, -31, -33 e -35, salientando-se as relações epidemiológicas entre a transmissão sexual destes tipos de vírus e o subsequente desenvolvimento de carcinoma genital^{3,6}.

O risco de transformação maligna é maior na zona de transição (entre o exo e o endocolo). Neste local, o período de latência entre a infecção primária por HPV e a transformação maligna varia entre 5 a 15 anos. O risco noutros epitélios genito-anais, incluindo o do pénis, é muito menor e o período de latência para qualquer tumor maligno se desenvolver pode atingir os 30 a 50 anos⁷.

Para o médico que estuda e trata os doentes com condilomas, esta informação é da maior importância, pois pressupõe um tratamento e vigilância diferentes de acordo com o tipo de HPV encontrado. Este facto levou-nos a iniciar o diagnóstico e tipifi-

cação do Papilomavírus Humano no Laboratório de Virologia do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge em colaboração com a Unidade de Patologia Cervico-vulvar e a Consulta de Penisocopia do Hospital de Stª Maria.

MATERIAL E MÉTODOS

Selecionaram-se 70 doentes com condilomas vulvares, vaginais, cervicais e anais observados na Unidade de Patologia Cervico-Vulvar da consulta da Ginecologia do Hospital de Stª Maria, bem como os parceiros sexuais com lesões sugestivas de condilomas observados na consulta de penisocopia da mesma unidade.

O material biológico foi colhido por biopsia dirigida por vulvo, vagina, colpo ou penisocopia e/ou por raspado com espátula ou zaragatoa. Foram simultaneamente efectuadas biopsias para exame histológico e colheitas do endo e exocolo para exame citológico.

A detecção do DNA foi efectuada pelo método de hibridação do *Southern blot*. Resumidamente, após tratamento das amostras com SDS e proteinase K, o DNA foi extraído pelo método fenólico e ressuspenso em tampão TE (10mM Tris-HCL pH 8,0, 1mM EDTA). A concentração do DNA foi determinada por leitura ao espectrofotómetro a 260 nm (1DO=50 µg/ml). Fez-se a digestão enzimática de 10 µg de DNA genómico com endonucleases de restrição durante 3 h a 37° C. Os fragmentos de DNA foram separados por electroforese em gel de agarose e transferidos para uma membrana de nylon, segundo o método *Southern*

blot. A hibridação radioactiva com ($\alpha^{32}P$) dCTP foi realizada durante a noite a 42° C. Após lavagem a membrana foi exposta a um filme X-Omat com intensificador durante 7 dias.

Em 51 amostras foi também efectuada a reacção de amplificação enzimática do DNA (PCR) para o HPV-6 e -11 e HPV-16 e -33, a fim de comparar a sensibilidade deste recente método de diagnóstico. Neste caso, a reacção foi realizada segundo as condições enunciadas por Dallas¹⁰; preparação de uma mistura constituída por 1 μ g/ml de DNA em 35 μ l de H₂O, 65 μ l (0,5 μ g de cada *primer*, 1 mM de cada dNTP, 10% DMSO, 10 mM sulfato de amónia, 50 mM Tris pH 8,8, 10 mM MgCl₂) e 4 μ g de enzima Taq DNA polimerase; com apliceel de 35 ciclos de desnaturação, *annealing* e extensão de, respectivamente, 30 seg. a 93° C, 30 seg. a 50° C e 90 seg. a 72° C. Retirar 15 μ l da mistura da reacção e colocar num gel de 2% agarose. Nesta fase é possível identificar o tipo de HPV com base na dimensão do fragmento amplificado. Transferir o DNA para uma membrana de nylon e hibridar com uma sonda sintética marcada radioactivamente.

RESULTADOS

Foram estudadas 81 amostras provenientes de 70 indivíduos, 13 do sexo masculino e 57 do sexo feminino.

A idade dos doentes variou entre os 17 e os 55 anos, havendo um predomínio na faixa etária dos 20-30 anos.

Nas mulheres, as lesões vulvares biopsadas eram:

a) pápulas de superfície verrucosa ou papilomatosa (em crista de galo) - 6, b) manchas que coravam com ácido acético a 4% - 3 doentes, c) nódulos papilomatosos (em couve flor) - 2. As lesões do colo correspondiam a zonas acidófilas iodo negativas, apresentando-se em mosaico invertido, excepto um caso de formação exofítica. No sexo masculino, as biopsias foram efectuadas em lesões com a seguinte morfologia: a) nódulos papilomatosos - 6, b) pápulas - 3, c) manchas - 2. Dois doentes não tinham lesões aparentes.

Por análise do *Southern blot*, o DNA do Papilomavírus Humano foi detectado em 43 indivíduos (61%). De entre os indivíduos infectados, 42 foram positivos para o HPV-6/11 - 98% e 1 para o HPV-16 - 2%. Os resultados obtidos encontram-se resumidos nos Quadros 1 e 2.

QUADRO 1 - Detecção do DNA do Papilomavírus Humano em 70 indivíduos estudados

Sexo	N° Casos	Negativo	Tipo de HPV	
			6/11	16
Feminino	57	23	33	1
Masculino	13	4	9	0
Total	70	27	42	1

QUADRO 2 - Comparação do diagnóstico colposcópico, citológico, histológico e virológico em 57 indivíduos do sexo feminino.

	Colposcopia (n=57)		Citologia (n=3)		Histologia (n=9)		
	+vo	-vo	+vo	-vo	+vo	-vo	
	+vo	33	1	3	0	8	0
DNA							
	-vo	12	11	0	0	1	0

+vo: positivo; -vo: negativo.

No caso do diagnóstico colposcópico, houve concordância dos resultados em 44/57 mulheres (77%). A correlação entre a detecção do ácido nucléico e a observação citológica e histológica foi de, respectivamente, 100% e 89%. Foi observado 1 caso com histologia positiva e detecção do DNA negativa (11%). Por outro lado, embora com resultado histológico negativo, foi detectado 1 caso de infecção lactente (2%).

O PCR realizado em 51 amostras permitiu a identificação de 27 positivos para o HPV-6/11 (53%), dos quais 6 (12%) foram negativos por análise do *Southern blot* (positividade de 55%). Não foi detectado nenhum caso de infecção pelos vírus HPV-16 e HPV-33 (*Fig. 1*). Todos os casos negativos, testados em simultâneo pelas duas técnicas, tiveram resultados concordantes (Quadro 3).

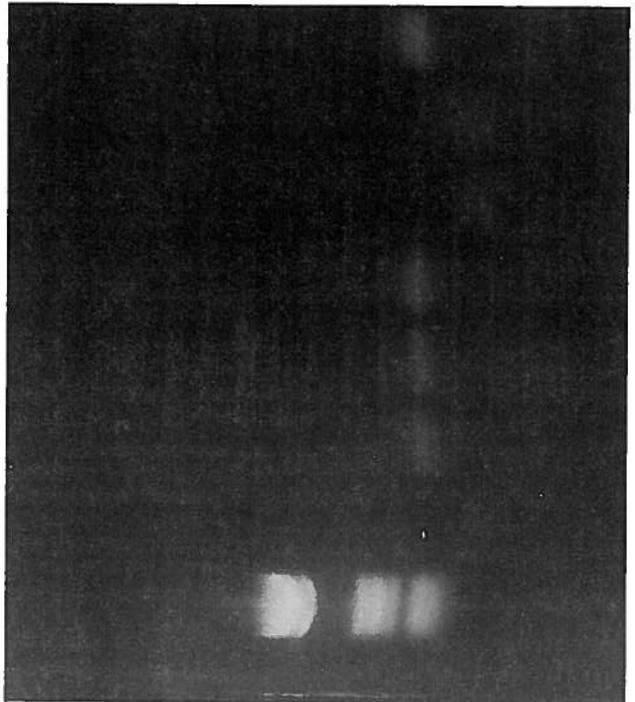


Fig.1 - PCR para o HPV-6 e -11 utilizando os *primers* do grupo A (HPV 6/11). Os fragmentos de 120 pb, resultantes da reacção de amplificação do DNA, podem ser observados após electroforese em gel de agarose 1%. Os *primers* são visíveis abaixo da banda de 100 pb. Linha 1, padrão de migração pBR322DNA/EaeIII (fragmentos de 587, 540, 504, 458, 434, 267, 234, 213, 192, 124, 123, 104 pares de bases); linha 2, controlo negativo; linha 3, controlo positivo (1 μ g de DNA de HPV-6); linha 4, 5 e 8, amostras positivas para o HPV-6/11 por *Southern blot*; linha 6, amostra positiva para o HPV-16; linha 7, amostra negativa por *Southern blot*. As amostras 4, 5 e 8 são positivas (banda de 120 pb assinalada pelo *).

QUADRO 3 - Comparação das técnicas de *Southern blot* e PCR em 51 amostras

	PCR	
	Positivo	Negativo
Positivo	21	0
<i>Southern blot</i>		
Negativo	6	24
Total	27	24

A análise do Quadro 4 permite-nos constatar que existe uma correlação entre o tipo de HPV detectado e o tipo de lesão diagnosticada. Foram estudados 4 indivíduos que tiveram contacto sexual com indivíduos infectados com o vírus, embora até ao momento não se observassem lesões clínicas. Destes, 2 casos eram positivos para o HPV-6/11.

QUADRO 4 – Comparação entre o diagnóstico clínico e a detecção do DNA viral em 70 indivíduos

	Nº casos	Negativo	Tipo de HPV	
			6/11	16
Condiloma	66	25	40	1
Sem lesão/parceiro sexual HPV +vo	4	2	2	0
Total	70	27	27	1

+vo: positivo.

DISCUSSÃO

Atendendo à associação existente entre o Papilomavírus Humano e o cancro cervical, o diagnóstico virológico adquire uma importância particular na selecção do tratamento e *follow-up* dos indivíduos que apresentam este tipo de lesões.

Em relação aos métodos de diagnóstico dos HPV, sabe-se que o isolamento *in vitro* não é viável e que a detecção das partículas virais e das proteínas da capsíde, por microscopia electrónica ou imunocitoquímica só é possível em lesões activas benignas. Raramente se consegue fazer a sua detecção nas lesões invasivas ou mesmo pré-malignas⁸. As técnicas de hibridação do ácido nucleico são, portanto, as únicas que permitem a identificação dos diferentes tipos de HPV, em tecidos frescos, fixados ou incluídos em parafina. Embora considerada como a técnica de eleição, a hibridação do *Southern blot* é dispendiosa, morosa e algo complicada na execução, não sendo a sua utilização aconselhada para rastreios em larga escala. Por outro lado, os métodos citológicos e histológicos falham muitas vezes por serem pouco específicos, sendo em alguns casos a taxa de falsos positivos estimada em cerca de 30%⁹. No nosso trabalho houve uma concordância de 100% entre os resultados citológicos e a detecção do ácido nucleico mas, em relação ao estudo histológico foram encontradas diferenças em 6% dos casos. Em 50% dos indivíduos sem lesões clínicas foi detectada a presença do HPV 6/11.

Uma boa alternativa para o diagnóstico e tipificação dos HPV parece ser a nova técnica do PCR (Polymerase Chain Reaction), conforme tem sido referido por vários trabalhos¹⁰. Com o PCR, o comprimento específico dos produtos resultantes da amplificação pode ser visualizado num gel de agarose, não sendo necessário recorrer à hibridação radioactiva. Além disso, os casos de duplas infecções, por vezes difíceis de definir por *Southern blot*, são facilmente detectados por PCR. O único contra-reside no facto de ao existir integração do DNA este não ser detectado, uma vez que a integração provoca normalmente deleções no genoma viral^{11,12}. Isto pode ser importante pois a integração parece estar relacionada com a evolução das lesões pré-malignas do colo^{13,14}. Daí a necessidade de se utilizarem *primers* que amplifiquem sequências localizadas fora destas zonas de integração. No presente caso, optou-se por fazer a pesquisa simultânea do HPV-6 e -11 e do HPV-16 e -33, pois além da grande homologia existente entre estes subtipos de vírus, eles encontram-se associados ao mesmo tipo de lesões. No nosso caso, a presença do

DNA viral foi detectada em 53% dos casos estudados por PCR, enquanto que por análise do *Southern blot* foi de 41%.

Os tipos de Papilomavírus Humano que mais frequentemente infectam a região genital são os HPV-6, -11, -16 e -18. Podem-se considerar de fraco poder oncogénico os HPV-6 e -11, frequentemente associados a lesões de baixo grau de malignidade, e de alto poder os HPV-16 e -18, detectados normalmente em lesões pré-malignas do colo. As neoplasias do pénis associadas ao HPV são raras^{15,16}. Dados epidemiológicos recentes referem que o DNA dos HPV de alto risco pode ser encontrado em mais de 80% das neoplasias cervicais intraepiteliais (CIN). No nosso estudo, o DNA dos HPV foi detectado em 79% dos condilomas diagnosticados clinicamente, sendo a percentagem de, respectivamente, 98% e 2% para o HPV-6/11 e HPV-16. Por outro lado, foram detectadas infecções sub-clínicas em 50% dos indivíduos que não apresentavam qualquer tipo de sintomatologia, embora referissem contactos sexuais com parceiros com condilomas acuminados.

A percentagem de HPV em amostras de mulheres com citologias positivas (coilocitos) varia entre 17 e 80%^{6,17,18}. Curiosamente, a ocorrência de infecções pelo HPV nestes casos é inferior ao que seria de esperar, especialmente se tivermos em linha de conta que o HPV é um dos principais factores na patogénese da neoplasia cervical intraepitelial. As explicações encontradas são várias. Segundo De Villiers¹⁸, a baixa prevalência do HPV nestas lesões surge, provavelmente, em consequência do HPV ser um factor activo na iniciação desta doença mas não no seu desenvolvimento futuro, revelando-se inclusivé uma perda do DNA viral durante esta progressão maligna. A baixa prevalência do HPV nas lesões pré-malignas pode igualmente ser o reflexo de uma fraca sensibilidade dos métodos de detecção utilizados.

Em cada ano, cerca de 460.000 mulheres desenvolvem cancros cervicais. Devido à ausência de programas eficazes de detecção precoce, este ainda continua a ser o tipo de cancro mais importante nos países em vias de desenvolvimento. Mundialmente, o cancro cervical é o segundo mais frequente entre as mulheres e o quinto na escala geral¹⁹.

Contudo, o potencial oncogénico de alguns HPV ainda não está suficientemente esclarecido. Isto não quer dizer que a infecção causada por este vírus ubíquos seja por si suficiente para induzir o aparecimento de tumores malignos. Provavelmente, outros factores de risco, que provoquem alterações adicionais ao nível dos genes celulares ou de algumas hormonas, são necessários para promover o crescimento de clones de células malignas.

Nas últimas décadas, as técnicas recombinantes do DNA fizeram aumentar grandemente o conhecimento sobre os HPV, mas o mesmo não se verificou ao nível da resposta do hospedeiro à infecção viral. Grande parte dos conhecimentos imunológicos baseiam-se em estudos realizados com Papilomavírus animais e na observação de indivíduos com HPV.

Devido ao seu potencial oncogénico e na falta de uma vacina e tratamento eficazes, a prevenção da infecção genital pelo Papilomavírus Humano, assenta, entre outros princípios fundamentais, na vigilância epidemiológica.

O desenvolvimento de uma vacina e o diagnóstico precoce da infecção são duas áreas importantes na luta contra o cancro cervical. Para estabelecer o verdadeiro papel do HPV no processo de transformação e do efeito dos co-factores envolvidos na carcinogénese, é importante fazer um *follow-up* dos indivíduos infectados ou com citologias anormais.

Para um melhor conhecimento da prevalência da infecção genital pelo HPV, será necessário desenvolver uma metodologia adequada e um diagnóstico eficaz da infecção e, simultaneamente, elaborar projectos de estudo com objectivos concretos e definidos.

Embora preliminares, os resultados agora obtidos dão desde já a ideia de que também entre nós a infecção genital pelo Papilomavírus Humano é um problema de Saúde Pública no domínio das doenças sexualmente transmissíveis. Contudo, para se obter

uma ideia mais precisa sobre a prevalência desta infecção em Portugal, estão a ser analisados outros aspectos, como sejam: (a) a associação com outras infecções genitais, (b) a eficácia do tratamento relativamente à recorrência das lesões, (c) o estado do DNA presente nas amostras, (d) a evolução clínica dos indivíduos infectados, (e) a importância destes indivíduos como potenciais veículos de transmissão, (f) a prevalência da infecção em determinados grupos com comportamento de risco e (g) a actuação de certos co-factores no processo de transformação maligna das lesões.

BIBLIOGRAFIA

1. MONSONEGRO, J.: Méthodes de détection. In: MONSONEGRO, J.; ed. *Dysplasias du col uterin et papillomavirus humaines*. Paris: Maloine, 1988; 36-38.
2. SCHNEIDER, A.; SCHLUNNCK, G.: Detection and typing of genital papillomavirus: Nucleic acid hybridization and type-specific antigen. In: GROSS, G.; JABLONSKA, H.; PFISTER, H.; STEGNER, H.E.; eds. *Genital papillomavirus infection*. Heidelberg: Springer-Verlag, 1990; 69-74.
3. CHUANG, T.; MADISON, M. P. H.: Condylomata acuminata (genital warts). An epidemiologic view. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1987; 16: 376-384.
4. GISSMANN, L.; BOSHART, M.; DURST, M.; et al: Presence of human papillomavirus in genital tumors. *J. Invest. Dermatol.* 1984; 83 (suppl.): 26-28.
5. Von KROGH, G.; SYRJANEN, S. M.; SYRJANNE, K. J.: Advantage of human papillomavirus typing in the clinical evaluation of genito anal warts. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1988; 495-503.
6. HENDERSON, B. R.; THOMPSON, C. H.; ROSE, B. R.; et al: Detection of specific types of human papillomavirus in cervical scrapes, anal scrapes and anogenital biopsies by DNA hybridization. *J. Med. Virol.* 1987; 21: 381-393.
7. SOUTHERN, E. M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 1975; 98: 503.
8. SCHNEIDER, A.: Methods of identification of human papillomavirus. In: SYRJANEN, K.; GISSMANN, L.; KOSS, L. G.; eds. *Papillomavirus and human disease*. Berlin: Spring-Verlag, 1988; 19-38.
9. MELCHERS, W. J. G.; HERBINK, P.; W. G. V.; et al: Prevalence of genital HPV infectious in a regularly screened population in the Netherlands in relation to cervical cytology. *J. Med. Virol.* 1988; 25: 11-16.
10. DALLAS, P.; FLANAGAN, J.; NIGHTINGALE, B.; MORRIS, B.: Polymerase chain reaction for fast, nonradioactive detection of high- and low-risk papillomavirus types in routine cervical specimens and in biopsies. *J. Med. Virol.* 1989; 27: 105-111.
11. MATSUKURA, T.; KANDA, T.; FURUNO, A.; et al: Cloning of monomeric human papillomavirus type 16 DNA integrated within cell DNA from a cervical carcinoma. *J. Virol.* 1986; 58: 979-982.
12. SCHWARTZ, E.; FRESSE, U. K.; GISSMANN, L.; et al: Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 1985; 314: 111-114.
13. DURST, M.; KLEINHEINZ, A.; HOTZ, M.; GISSMANN, L.: The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumors. *J. Gen. Virol.* 1985; 66: 1515-1522.
14. GISSMANN, L.; SCHNEIDER, A.: The role of human papillomavirus in genital cancer. In: De Palo, G.; Rike, F.; zur HAUSEN, H.; eds. *Herpes and Papillomavirus*. Serzona Symposia Publications. Vol 31. New York: Raven Press, 1986; 15-25.
15. DURST, M.; GISSMANN, L.; KIENBERG, H.; zur HAUSEN, H.: A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1983; 80: 3812-3816.
16. GISSMANN, L.; WOLNIK, L.; IKENBERG, H.; et al: Human papillomavirus type 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papilloma and in some cervical cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1983; 80: 560-564.
17. CAMPION, M. J.; CUZICK, J.; McCANCE, D. J.; SINGER, A.: Progressive potential of mild cervical atypia: prospective cytological, colposcopic and virologic study. *Lancet* 1986; i: 237-240.
18. De VILLIERS, E. M.; SCHNEIDER, A.; MIKLAW, H.; et al: Human papillomavirus infection in women with and without abnormal cervical cytology. *Lancet* 1987; i: 703-706.
19. WATERHOUSE, J.; MUIR, C.; CORREA, P.; POWELL, J.: Cancer in five continents. *Int. Ag. Res. Cancer* 1982; Vol 4.