

VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) DE ALTO E BAIXO RISCO ONCOLÓGICO POR NESTED MULTIPLEX PCR, EM AMOSTRAS DA CÉRVICE UTERINA DE PACIENTES COM DIAGNÓSTICO CITOLÓGICO DE CÉLULAS GLANDULARES ATÍPICAS

Letícia Paiva Reberte (IC) e Eder de Carvalho Pincinato (Orientador)

Apoio: PIBIC CNPq

RESUMO

A descoberta de que a infecção persistente pelo papilomavirus humano (HPV) é um fator necessário para o desenvolvimento do câncer do colo do útero, levou a procura de novas estratégias para o rastreamento do câncer cervical uterino baseadas na detecção do DNA do HPV. As técnicas de biologia molecular são utilizadas como estratégia de rastreamento de câncer de cérvix uterina, tendo como vantagem maior reprodutibilidade e possibilidade de automação laboratorial, porém, há ainda necessidade de validação e comprovação diagnóstica destes métodos, o que justifica o desenvolvimento deste trabalho, que teve por objetivo validar a detecção e genotipagem do HPV em amostras citológicas de raspado endocervical, além de avaliar a frequência e os subtipos de vírus presentes nas amostras. Para atingir estes objetivos, foi realizado um *Nested* Multiplex PCR em amostras endocervicais de 32 pacientes atendidas em um Hospital Universitário da Cidade de São Paulo, com suspeita de AGC e/ou lesões malignas ao diagnóstico convencional. Após análise dos resultados, verificou-se que o método molecular utilizado foi satisfatório para detecção do HPV em uma amostra sabidamente positiva. Todas as 32 amostras analisadas tiveram amplificação do gene controle positivo beta-globina e não foi identificada a presença de HPV em nenhuma amostra analisada. Conclui-se que o método molecular utilizado foi eficiente na detecção do HPV, porém, devido ao pequeno número de amostras incluídas, estudos maiores devem ser conduzidos para verificar a frequência e subtipos de HPV em amostras de endocérvix em mulheres com diagnóstico citológico de AGC e/ou lesões indicativas de malignidade.

Palavras-chave: HPV, câncer cervical, Nested Multiplex PCR

ABSTRACT

The discovery that persistent human papillomavirus (HPV) infection is a necessary factor in the development of cervical cancer has led to the search for new strategies for the screening of cervical cancer based on the detection of HPV DNA. Molecular biology tests have numerous advantages compared with conventional cytology, with greater sensitivity and reproducibility for detecting cervical cancer and the possibility of laboratorial automation, however, there is still a need for validation and diagnostic confirmation of these methods, which justifies the development of this work, aimed to validate the detection and genotyping of HPV in cytological samples of endocervical scraping, and to evaluating the frequency and subtypes of viruses present in the samples. To achieve these goals, a Nested Multiplex PCR was performed on endocervical samples from 32 patients seen at a University Hospital in the City of São Paulo, with suspected AGC and / or malignant lesions at conventional diagnosis. The results show that the molecular method used was satisfactory for detecting HPV in a known positive sample. All 32 samples analyzed had amplification of the beta-globin positive control gene and the presence of HPV was not identified in any sample analyzed. We concluded that the molecular method used was efficient in detecting HPV, however, due to the small number of samples included, larger studies should be conducted to verify the frequency and subtypes of HPV in endocervical samples in women with cytological diagnosis of AGC and / or lesions indicative of malignancy.

Keywords: HPV, cervical cancer, Nested Multiplex PCR

1. INTRODUÇÃO

O HPV, vírus de DNA, é o único vírus reconhecido que pode resultar câncer em humanos. O câncer do colo uterino resulta da progressão de lesões precursoras denominadas “neoplasias intraepiteliais cervicais”, decorrentes da transformação do epitélio cervical pelo vírus infectante (BOSCH et al., 2002). As neoplasias intraepiteliais cervicais são lesões proliferativas com maturação anormal e atípicas de graus variáveis substituindo parte ou toda a espessura do epitélio escamoso cervical. O diagnóstico e o tratamento dessas lesões são de grande importância, pelo fato de estarem intimamente relacionadas à gênese do câncer do colo uterino (AIDÉ et al., 2009).

Nos últimos anos tem-se constatado uma grande relação do câncer de colo uterino e o HPV. O HPV nada mais é do que um vírus do DNA humano, que cada vez mais, têm infligido tumores à população, com incidência maior de mulheres. Assim, entre os anos 70 e 80 surgiram as primeiras evidências dessa associação e, no final dos anos 90, descrevia-se a presença viral em aproximadamente 100% dos casos de câncer cervical.

No Brasil, o controle de câncer do colo do útero constitui uma das prioridades da agenda de saúde do país e integra o Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT). O Ministério da Saúde, por meio da publicação "Diretrizes para o Rastreamento do Câncer do Colo do Útero 2016", recomenda o exame citopatológico em mulheres assintomáticas com idade entre 25 e 64 anos, a cada três anos, após dois exames anuais consecutivos normais. Em caso de resultado de lesão de baixo grau, a indicação é de repetição do exame em seis meses. Desde 2014, está disponível, na rede pública, a vacina tetravalente contra os subtipos 6, 11, 16 e 18 do HPV para meninas de 9 a 13 anos; e, a partir de 2017, também para meninos de 11 a 13 anos. Apesar da sua importância epidemiológica, o câncer do colo uterino possui alto potencial de cura quando diagnosticado em estágios iniciais (INCA, 2018).

Atualmente, o foco de pesquisas sobre o assunto está em ações preventivas, que são orientadas a evitar o surgimento de doenças, reduzindo sua incidência e prevalência nas populações. Por este motivo, o desenvolvimento de metodologias eficientes de rastreamento e diagnóstico são de grande importância para a prevenção e redução da infecção pelo HPV, bem como do câncer cervical. As principais pesquisas formam direcionadas a fim de desenvolver um método de triagem, no qual seria feita a análise da sequência de DNA do paciente, para validar um diagnóstico com rapidez e eficácia.

Com o emprego de técnicas de biologia molecular tornou-se possível identificar, com maior sensibilidade, a presença do DNA do HPV antes mesmo do aparecimento de lesões ou sintomas, tornando possível o diagnóstico precoce. (DO CARMO; FIORINI, 2007).

Existem mais de 120 genótipos diferentes de HPV, agrupados em categorias de baixo e de alto risco, dependendo do quadro clínico e muitas vezes alguns destes podem levar ao desenvolvimento de câncer. Particularmente os genótipos 16, 18 e 30 de HPV, classificados como grupo de alto risco, correspondem a cerca de 90% dos casos de câncer do colo do útero (BURGER et al, 2011; POLJAK AND KOCJAN, 2010).

1.1. Problema de pesquisa

O câncer ainda é uma das doenças que mais causam temor na sociedade. Em 2008, 7,3 milhões de mortes ocorreram no mundo devido aos tumores malignos, representando 13% de todas as mortes ocorridas naquele ano. Os principais tipos de câncer que levaram a morte foram: pulmão (1,37 milhões), estômago (736 mil), fígado (695 mil), colo retal (608 mil), mama (458 mil) e o cervical (275 mil). Para o ano de 2030, estima-se que ocorrerão 13,1 milhões de óbitos (WHO, 2015).

Para o Brasil, estimam-se 16.370 casos novos de câncer do colo do útero para cada ano do biênio 2018-2019, com um risco estimado de 15,43 casos a cada 100 mil mulheres, ocupando a terceira posição. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer do colo do útero é o primeiro mais incidente na Região Norte (25,62/100 mil). Nas Regiões Nordeste (20,47/100 mil) e Centro-Oeste (18,32/100 mil), ocupa a segunda posição mais frequente; enquanto, nas Regiões Sul (14,07/100 mil) e Sudeste (9,97/100 mil), ocupa a quarta posição (INCA; 2018).

Há uma associação entre o câncer cervical e HPV, que foi comprovada sem qualquer dúvida tanto biológica como epidemiologicamente (MUNOZ et al., 2006), mostrando que o HPV sozinho é responsável por aproximadamente 5% de todos os cânceres induzidos por vírus (MOLIJN et al., 2005).

Em estudos de prevalência dos tipos de HPV distribuídos pelo mundo, o HPV 16 foi o mais frequente (50%), o HPV 18 esteve em segundo lugar (13,7%), seguido do tipo 45 (8,4%) e do tipo 31 (5,3%), e os demais tipos foram encontrados em 0,1% a 2,8%. Os estudos epidemiológicos têm demonstrado que, apesar da alta prevalência da infecção pelo HPV em mulheres sexualmente ativas, somente uma pequena fração delas, infectadas pelos tipos oncogênicos, irá progredir para lesões intraepiteliais escamosas de alto grau e câncer cervical. Esses estudos revelam, também, que determinados cofatores parecem agir em conjunto com o HPV, exercendo papel fundamental na transição da infecção viral para as neoplasias do colo uterino (AIDÉ et al., 2009).

1.2. Justificativa

O HPV é um vírus de DNA, capaz de gerar câncer em humanos. Este estudo avaliou como identificar o HPV em amostras da cérvix uterina, que poderão levar o paciente ao diagnóstico mais efetivo deste tipo de neoplasia.

Com passar dos anos, houve um grande índice aprimoramento de técnicas de genotipagem e detecção de males da sociedade causados por mutações da genética humana. Paralelamente, um dos maiores problemas de saúde da sociedade contemporânea são as neoplasias, que são multiplicações anormais e desordenadas de células benignas ou malignas. O número de casos destas vêm aumentando exponencialmente nas últimas décadas.

Por estes motivos, pesquisadores do mundo investigam se há uma relação genética envolvida, e se há como facilitar o diagnóstico de tumores de forma mais efetiva, com a intenção de implementar biomarcadores genéticos que possam ser incorporados em uma rotina de diagnóstico laboratorial.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

A infecção pelo Papiloma Vírus Humano (HPV) é uma das doenças sexualmente transmissíveis (DST) mais frequentes no mundo. Estima-se que entre 75 a 80% da população será acometida por pelo menos um dos tipos do HPV ao longo da vida. Mais de 630 milhões de homens e mulheres (1:10 pessoas) estão infectados. Para o Brasil, estima-se que haja 9 a 10 milhões de infectados por esse vírus e que, a cada ano, 700 mil novos casos ocorram (ABREU; 2018).

De acordo com a Agência Internacional de Investigação do Câncer (IARC), mais de 250.000 mulheres morreram de câncer de colo do útero em todo o mundo, apenas no ano de 2012, tornando-se a quarta maior causa de mortes por câncer em mulheres (BRAY et al, 2013;). De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), na América Latina são registrados 72 mil novos casos da doença e, destes, 33 mil mulheres morrem a cada ano. No Brasil, estimam-se 20 mil casos novos de câncer de colo de útero ao ano (CASTRO e FILHO, 2006).

O câncer cérvico-uterino se sobressai como a segunda neoplasia mais frequente entre a população feminina e o segundo tumor que mais atinge e mata as mulheres no Brasil, perdendo apenas para o câncer de mama e sendo responsável por um grande número de óbitos em mulheres jovens. Esta neoplasia apresenta uma média de 500 mil casos novos por ano no mundo, levando ao óbito, aproximadamente, 230 mil mulheres (INCA; 2009).

O teste de Papanicolau (colpocitologia oncológica pelo método de Papanicolau) efetivamente reduziu a mortalidade pelo câncer do colo do útero. Tanto a incidência quanto a mortalidade tiveram drástico decréscimo em vários grupos populacionais após a entrada de bons programas de rastreamento utilizando o método (LAARA, et al., 1987). Redução na incidência do câncer do colo e mortalidade foram proporcionais a intensidade do rastreamento (JOHANNESSON et al., 1978).

Existem alguns fatores envolvidos no risco de infecção: comportamento sexual de risco, início precoce da vida sexual, número de parceiros sexuais, higiene genital inadequada, alterações da imunidade celular, ausência da circuncisão masculina, tabagismo e presença de outras DSTs. Em decorrência da veiculação de informações acerca da incidência de DST, vem ocorrendo um aumento do uso de preservativos entre jovens em geral (ABREU; 2018).

Apesar do sucesso na prevenção do câncer cervico-uterino, a citologia oncológica apresenta limitações como os resultados falso negativos. Má qualidade das amostras e erros de interpretação das lâminas são alguns dos principais responsáveis pelas limitações na sensibilidade da citologia. Cerca de 30% das biópsias com neoplasia intraepitelial grau II e III são negativas nos esfregaços citológicos. Um estudo do Reino Unido detectou que 40% dos cânceres de colo invasivo ocorreram em mulheres que apresentavam citologias recentes com resultados negativos e com rastreamento aparentemente adequado (RAMA et al., 2008).

Admitia-se, que ao se utilizar um teste biomolecular para a detecção do DNA viral, poderíamos identificar mais mulheres com risco para o desenvolvimento da neoplasia e, com isto, diminuir a mortalidade pela doença, que, especialmente no nosso meio, é um grave problema de saúde pública, visto que é um dos mais importantes tumores da genitália feminina e a maior parte dos casos que procuram os serviços públicos são diagnosticados em estádios avançados (NICOLAU; 2003).

O teste cervicocolpocitológico convencional é muito trabalhoso, tem baixa sensibilidade e baixa reprodutibilidade (30% de todos os cânceres cervicais resultam de sensibilidade abaixo da média) (SAWAYA e WASHINGTON, 1999). É mais subjetivo e requer rígido controle e programa de manutenção de qualidade para manter bom desempenho clínico, que compreende desde coleta correta pelo profissional, fixação adequada do material, transporte adequado e coloração e leitura da lâmina por citotécnicos e profissionais bem treinados (CHAN, et al., 2012). Ou seja, situações que podem se submeter a diversos erros, comprometendo o resultado dos exames, dificultando bastante o diagnóstico e retardando o tratamento.

Com o intuito de diminuir estes problemas acima referidos, novos métodos de diagnóstico vêm sendo desenvolvidos, sendo eles, na grande maioria, baseados na detecção molecular do HPV.

O PCR se destaca como um destes métodos moleculares de extrema importância para a detecção do vírus. Do inglês “Polymerase Chain Reaction”, o PCR foi desenvolvido no final da década de 80 por Kary Mullis, que recebeu o Prêmio Nobel em 1994 (NOVAIS e PIRES-ALVES, 2004). É um processo térmico cíclico que inclui três etapas: desnaturação, onde a dupla fita de DNA é separada em fitas simples; anelamento, onde os iniciadores anelam especificamente com as suas sequências complementares de DNA alvo fita simples, e finalmente, a extensão do iniciador, onde um DNA polimerase termoestável gera fitas “filhas” de DNA que atravessam a região entre dois iniciadores. A partir de então, as duplas fitas recém-geradas servem como modelos para um ciclo de PCR subsequente (CASTRO e FILHO, 2006). A concentração final do DNA molde na solução é muito maior (da ordem de 235) do que a inicial, possibilitando a sua identificação (VIEIRA, 2011).

Durante a última década, os avanços na tecnologia de PCR e outras técnicas de amplificação do DNA converteram estas técnicas nos procedimentos principais dos diagnósticos moleculares. Tais técnicas são conceitualmente simples, altamente específicas, e sensíveis.

3. METODOLOGIA

3.1. Aspectos Éticos

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Presbiteriana Mackenzie (MACKENZIE) e aprovado sob o código CAAE: 54996216.9.0000.0084.

3.2. Desenho do Estudo

Trata-se de um estudo prospectivo, transversal, observacional de amostragem não probabilística do tipo consecutiva.

Critérios de inclusão

Foram adotados como critérios de inclusão do estudo:

- Mulheres, de qualquer idade, provenientes do sistema único de saúde (SUS) de abrangência da região convênio Butantã, com resultado colpocitológico com alteração sugestiva de AGC/AGC-favorecendo neoplasia, encaminhadas para o ambulatório de Colposcopia e PTGI do Hospital Universitário da USP.

- Mulheres, de qualquer idade, provenientes da comunidade USP ou dependentes de funcionários da USP, com resultado colposcópico com alteração sugestiva de AGC/AGC-favorecendo neoplasia, encaminhadas para o ambulatório de Colposcopia e PTGI do Hospital Universitário da USP.

As mulheres da nossa casuística, encaminhadas para o ambulatório de PTGI do HU, com indicação de colposcopia, foram informadas do protocolo de pesquisa e, concordando em participar, preencheram consentimento informado.

Em seguida ao exame ginecológico especular, foi realizada a coleta de material endocervical uterino, por parte da equipe médica, para pesquisa de presença e subtipo de HPV.

3.3. Extração de DNA

A extração do DNA do material coletado foi realizada utilizando-se o kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega), seguindo-se as informações indicadas pelo fabricante. As amostras de DNA obtidas foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,7% para quantificação utilizando marcadores de concentração (λ DNA, Invitrogen), além de serem quantificados por fluorimetria, utilizando-se o equipamento Quantus-Fluorometer (Promega) e também por espectrofotometria, utilizando-se o equipamento Nanodrop 2000c (Thermo Scientific).

3.4. Identificação do HPV por PCR

As reações de *Nested* Multiplex PCR foram realizadas com uma primeira fase de amplificação por PCR, utilizando-se os primers da região consenso E6/E7 do HPV, Gp-E6-3F, Gp-E7-5B e Gp-E7-6B (SOTLAR et al., 2004).

Para amplificação do DNA dos genótipos específicos do HPV, foram utilizados os primers tipo-específicos, descritos na Tabela 1.

Tabela 1: *Primers* utilizados para detecção e classificação do HPV em amostras de DNA.

| Primers | Sequência (5'-3') | Amplificação (bp) |
|---|--------------------------------|--------------------------|
| <u>Iniciadores consensos E6/E7</u> | | |
| GP-E6-3F | GGG W GK KAC TGA AAT CGG T | 607 |
| GP-E6-5B | CTG AGC TGT CAR NTA ATT GCT CA | |
| GP-E6-6B | TCC TCT GAG TYG YCT AAT TGC TC | |
| <u>Iniciadores específicos</u> | | |
| 6.1 | TAG TGG GCC TAT GGC TCG TC | 280 |
| 6.2 | TCC ATT AGC CTC CAC GGG TG | |
| 11.1 | GGA ATA CAT GCG CCA TGT GG | 360 |
| 11.2 | CGA GCA GCA GTC CGT CCT CG | |
| 16.L1-1 | TGC TAG TGC TTA TGC AGC AA | 152 |
| 16.L1-2 | ATT TAC TGC AAC ATT GGT AC | |
| 16.E6/7-1 | TTG CTT TTC GGG ATT TAT GC | 390 |
| 16.E6/7-2 | AGA TCA GTT GTC TCT GGT TGCA | |
| 18.1 | AAG GAT GCT GCA CCG GCT GA | 216 |
| 18.2 | CAC GCA CAC GCT TGG CAG GT | |
| 31.1 | ATG GTG ATG TCA ACA ACA CC | 514 |
| 31.2 | GTA GTT GCA GGA CAA CTG AC | |
| 33.1 | ATG ATA GAT GAT GTA ACG CC | 455 |
| 33.2 | GCA CAC TCC ATG CGT ATC AG | |

FONTE: SHIKOVA et al, 2009.

Para a detecção dos tipos específicos de HPV, os primers foram divididos em dois grupos:

Grupo 1: contendo os primers: HPV 6, 11 e 33

Grupo 2: contendo os primers HPV 16E, 16L, 18 e 31.

Os PCRs de ambos os grupos foram realizados com um volume final de 50 µL, contendo:

- 25 µL do Mix de reação (GoTaq® Hot Start Colorless Master Mix – Promega);
- 1 µL de cada primer (10 pmol);
- 2 µL do produto de amplificação E6/E7;
- Água ultrapura esterilizada para completar o volume final de 50 µL.

As condições do PCR para amplificação E6/E7 foram: 94°C por 1 minuto, 40°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, por um total de 40 ciclos. O último ciclo é seguido de um período de alongação a 72°C por 10 minutos (SOTLAR et al., 2004).

As condições do PCR para os grupos 1 e 2 foram: 94°C por 1 minuto, 65°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, por um total de 40 ciclos. O último ciclo é seguido de um período de alongação a 72°C por 10 minutos.

Após amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2,0%, adicionada de Syber Safe (Invitrogen) para identificação dos fragmentos amplificados. Foi utilizado um marcador de peso molecular de 50 pares de base (pb) (λ DNA, Invitrogen®) para cada gel e a corrida eletroforética foi realizada com voltagem de 100 v por 120 minutos. O gel foi revelado por exposição à lâmpada ultravioleta após corrida eletroforética.

4. RESULTADO E DISCUSSÃO

Não foi possível obter os dados demográficos mais detalhados das mulheres participantes deste estudo por restrições de acesso ao prontuário original, impostas pelo hospital universitário, mas as idades e a quantidade de DNA extraído das amostras biológicas estão indicadas na tabela 2.

Tabela 02: Quantificação do DNA de amostras obtidas em raspado endocervical de mulheres com diagnóstico de atípica glandular.

| nº amostra | Idade | Quantificação DNA |
|------------|---------|-------------------|
| 1 | 59 anos | 8,4 |
| 2 | 50 anos | 0,11 |
| 3 | 32 anos | 1,82 |
| 5 | 30 anos | 8,8 |
| 6 | 51 anos | 3,03 |
| 7 | 56 anos | 3,69 |
| 8 | 53 anos | 1,24 |
| 9 | 50 anos | 4,09 |
| 10 | 49 anos | 11 |
| 11 | 45 anos | 0,089 |
| 12 | 21 anos | 52 |
| 13 | 32 anos | 4,82 |
| 14 | 28 anos | 0,887 |
| 15 | 48 anos | 3,94 |
| 16 | 40 anos | 0,507 |
| 17 | 52 anos | 1,24 |
| 18 | 47 anos | 5,2 |
| 19 | 30 anos | 2,95 |
| 20 | 54 anos | 0,256 |
| 21 | 53 anos | 5,1 |
| 22 | 50 anos | 2,49 |

| | | |
|-----------|---------|------|
| 23 | 53 anos | 8 |
| 24 | 59 anos | 3,21 |
| 25 | 48 anos | 3,61 |
| 26 | 61 anos | 0,53 |
| 27 | 36 anos | 15 |
| 28 | 44 anos | 4,84 |
| 29 | 38 anos | 7,5 |
| 30 | 29 anos | 7,9 |
| 31 | 47 anos | 5,2 |
| 32 | 30 anos | 10 |

Para a validação da metodologia proposta, foram realizadas ampliações de um material sabidamente contaminado por HPV do tipo 18 e confirmado por hibridização *in situ*, doado pelo Laboratório de Patologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) (Figura 1).

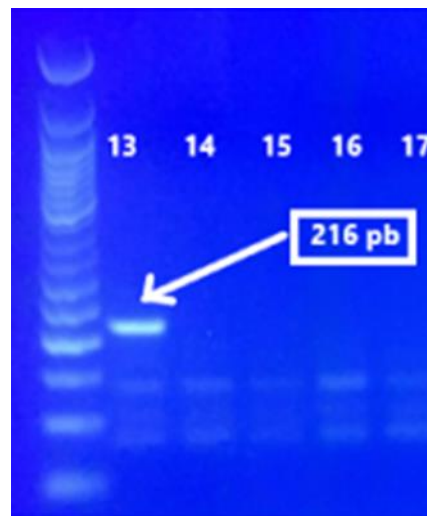


Figura 1. Gel de eletroforese apresentando fragmento de 216 pb na linha 13, utilizando-se como referência o marcador de peso molecular de 50 pb (primeira coluna à esquerda). As linhas 14, 15 e 16 correspondem à amostras desconhecidas e a linha 17 corresponde ao branco da reação.

Após amplificação por Nested Multiplex PCR, observa-se a presença de uma banda na região de 216 pb, que corresponde ao fragmento resultante da amplificação do HPV do tipo 18 na amostra analisada e, por consequência, valida a metodologia empregada.

Não foi possível utilizar padrões positivos para os outros tipos de HPV devido ao alto custo dos mesmos, sendo que não tínhamos apoio financeiro suficiente para este fim. Porém, o padrão positivo descrito acima já é o suficiente para validar a metodologia empregada.

A fim de avaliar a qualidade do material biológico utilizado, foram realizados PCRs utilizando-se primers do gene da beta-globina, como controle positivo da reação, uma vez que todas as células nucleadas do organismo humano apresentam este gene em seu DNA e portanto, devem apresentar os fragmentos específicos após amplificação (Figura 2).



Figura 2. Gel de agarose contendo duas amostras positivas para o gene da Beta-Globina (linhas 22 e 23), em comparação com o branco da reação (linha 24), utilizando-se o marcador de peso molecular de 50 pb (primeira linha da esquerda).

As 32 amostras biológicas apresentaram o fragmento referente ao gene da Beta-globina, indicando que o material biológico utilizado estava adequado para as análises posteriores para detecção e tipagem do HPV.

Após validação da metodologia empregada e da qualidade do material biológico, analisamos a presença dos HPVs de subtipos 6, 11 e 33 (grupo 1), representados na figura 3.

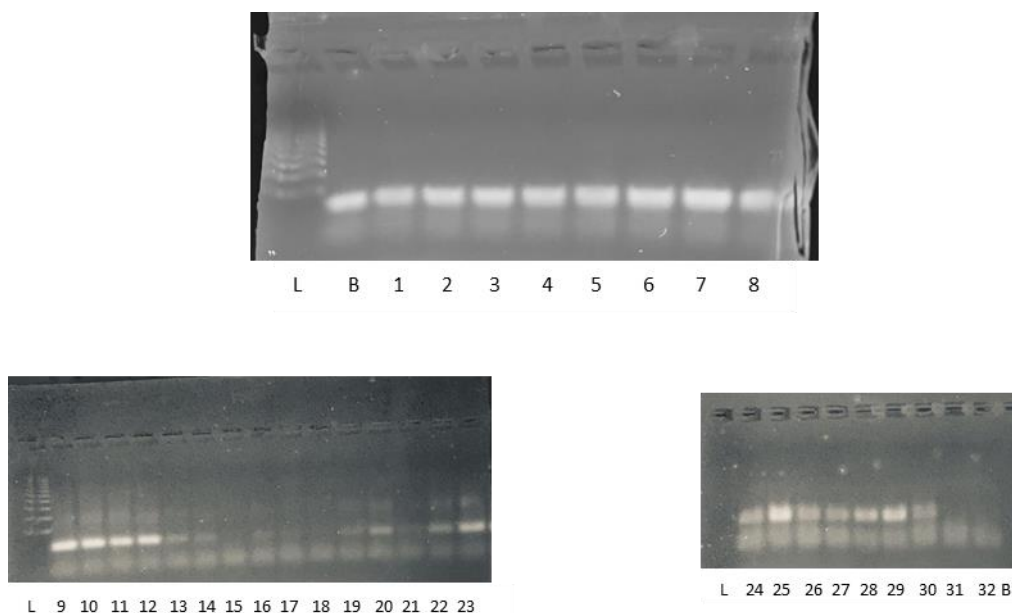


Figura 3. Gel de agarose das amostras 1 a 32 após amplificação por *Nested Multiplex PCR*, utilizando-se primers para identificação dos subtipos 6, 11 e 33 do HPV. Onde L=marcador de peso molecular de 50 pb e B=branco da reação.

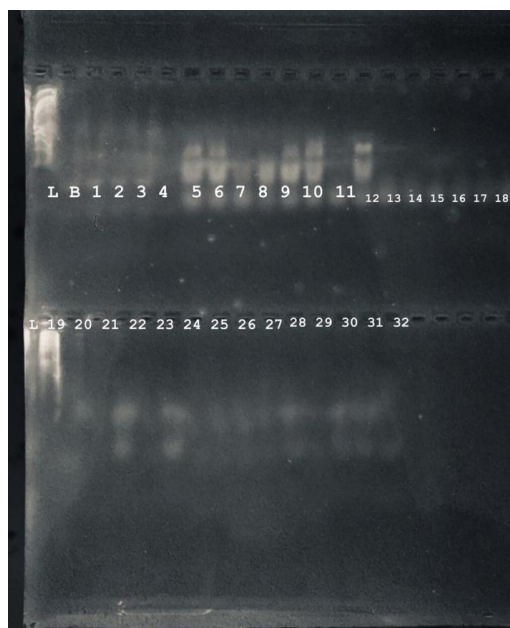
Os fragmentos esperados para os tipos de HPV 6, 11 e 33 são, respectivamente, de 280 pb, 360 pb e 455 pb.

De acordo com o resultado apresentado, pode-se concluir que não foi identificada a presença de HPV dos subtipos 6, 11 e 33 nas amostras analisadas.

As bandas que aparecem no gel referem-se ao reagente utilizado (primers, nucleotídeos, entre outros) e à possível hibridização inespecífica dos primers.

Para evitar o surgimento destas bandas inespecíficas, poderíamos diminuir a quantidade de primers para o HPV, porém, com menor quantidade, poderíamos diminuir a sensibilidade do método, com risco de gerar resultados falso negativos.

Também foram investigados os subtipos 16, 18 e 31 (grupo 2) de HPV nas 32 amostras biológicas e os resultados estão apresentados na figura 4.



FONTE: autoria própria

Figura 4. Gel de agarose das amostras 1 a 32 após amplificação por *Nested Multiplex PCR*, utilizando-se primers para identificação dos subtipos 16, 18 e 31 do HPV. Onde L=marcador de peso molecular de 50 pb e B=branco da reação.

Apesar de apresentar bandas inespecíficas, não foram identificados os fragmentos referentes aos subtipos de HPV avaliados em nenhuma das amostras estudadas, uma vez que deveriam apresentar fragmentos de 152 pb, 390 pb e 216 pb, referentes aos subtipos de HPV 16L, 16E, 18 e 31, respectivamente.

Um estudo populacional, realizado por Teixeira et al (2016), avaliou a prevalência e os genótipos do HPV em 200 mulheres atendidas em um Hospital Universitário no sul do país. Do total, 55 (27,5%) mulheres foram detectadas com HPV e dessas, mais de 90% eram de alto risco oncogênico, com predominância do tipo viral 18.

Meshner et al. (2015) encontrou 95,8% de positividade para pelo menos um tipo de HPV de alto risco em mulheres com câncer cervical invasivo.

Ainda avaliando-se a literatura científica, aproximadamente 72,7% de universitárias do norte do Brasil apresentaram múltiplas infecções (VIEIRA, et al., 2011). Já Balanda et al. (2016), encontrou que apenas 34,7% das mulheres estudadas apresentavam múltiplas infecções e um número ainda menor (7,15%) foi observado por Anderson et al. (2016) e apenas 26% de mulheres moradoras dos Países Baixos apresentaram múltipla infecção por HPV (MOLLERS, et al., 2014).

Estes estudos foram avaliados em populações com diagnósticos diversificados de lesão cervical, o que dificulta a comparação com nossos resultados, uma vez que analisamos material derivado de coleta da região glandular (endocervical).

Verdoodt et al. (2016), observou, em um estudo de meta análise, que aproximadamente 40% de amostras glandulares foram positivas para HPV de alto risco, o que difere dos nossos resultados. O baixo número de amostras avaliadas neste estudo pode explicar esta diferença e novas amostras devem ser analisadas posteriormente para confirmar ou refutar os dados aqui obtidos.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O teste molecular proposto foi validado com uma amostra sabidamente contaminada com HPV de subtipo 18 e confirmada com teste de hibridização *in situ*. Desta forma, o teste apresentado neste trabalho pode ser utilizado para identificação e genotipagem do HPV, com a vantagem de ser um teste de execução simples e de baixo custo.

Foi possível amplificar o gene da beta-globina nas 32 amostras glandulares avaliadas, concluindo-se assim que o material continha DNA íntegro e em quantidade suficiente para análise. Este parâmetro permite concluir que a ausência de HPV nestas amostras não está relacionada com deficiência da técnica e/ou do material biológico analisado.

As amostras glandulares avaliadas não apresentaram HPV, porém, há necessidade de incluir um número maior de pacientes para confirmação destes resultados.

6. REFERÊNCIAS

- ABREU, Mery Natali Silva et al. Conhecimento e percepção sobre o HPV na população com mais de 18 anos da cidade de Ipatinga, MG, Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 23, p. 849-860, 2018.
- AIDÉ, S., et al., Neoplasia Intraepitelial Cervical. **DST - J bras Doenças Sex Transm**, 21(4): 167-170, 2009.
- ANDERSON, L.A., O'RORKE, M.A., WILSON, R., et al. HPV prevalence and type-distribution in cervical cancer and premalignant lesions of the cervix: A population-based study from Northern Ireland. **J Med Virol.**;88(7):1262-70, 2016.
- BALANDA, M., QUIERO, A., VERGARA, N., et al. Prevalence of human papillomavirus infection among women presenting for cervical cancer screening in Chile, 2014-2015. **Med Microbiol Immunol.**;205(6):585-594, 2016.
- BOSCH, F.X., et al., The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. **J Clin Pathol**, 55(4): 244-65, 2002.
- BURGER, E., Kornør, H., Klemp, M., Lauvrak, V., Kristiansen, I., 2011. HPV mRNA tests for the detection of cervical intraepithelial neoplasia: a systematic review. **Gynecologic oncology**, v. 120, n. 3, p. 430-438, 2011.
- CASTRO, Therezita Peixoto Patury Galvão; BUSSOLOTI FILHO, Ivo. Prevalence of human papillomavirus (HPV) in oral cavity and oropharynx. **Rev Bras Otorrinolaringol**, v. 72, n. 2, p. 272-282, 2006.
- CHAN, P.K., et al., Laboratory and clinical aspects of human papillomavirus testing. **Crit Rev Clin Lab Sci**, 49(4): 117-36, 2012.
- DO CARMO, Emily Francini Silva; FIORINI, Adriana. Principais técnicas moleculares para detecção do papilomavírus humano. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 2, n. 1, 2007.
- ELNIFRO, Elfath M. et al. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. **Clinical microbiology reviews**, v. 13, n. 4, p. 559-570, 2000.
- HENEGARIU, O. et al. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. **Biotechniques**, v. 23, n. 3, p. 504-511, 1997.
- INCA (Instituto Nacional do Câncer). **Incidência de Câncer no Brasil**. 2018. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/sintese-de-resultados-comentarios.asp>. Acesso em: 20/10/2019.
- JOHANNESSON, G.; G. GEIRSSON; DAY, N. The effect of mass screening in Iceland, 1965-74, on the incidence and mortality of cervical carcinoma. **Int J Cancer**, 21(4): 418-25, 1978.
- LAARA, E.; DAY, N.E.; HAKAMA, M. Trends in mortality from cervical cancer in the Nordic countries: association with organised screening programmes. **Lancet**, 1(8544): 1247-9, 1987.
- MESHER, D., CUSCHIERI, K., HIBBITTS, S., et al. Type-specific HPV prevalence in invasive cervical cancer in the UK prior to national HPV immunisation programme: baseline for monitoring the effects of immunisation. **J Clin Pathol.**;68(2):135-40, 2015.
- MOLIJN, Anco et al. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. **Journal of Clinical Virology**, v. 32, p. 43-51, 2005.
- MOLLERS, M., VRIEND, H.J., VAN DER SANDE M.A., et al. Population- and type-specific clustering of multiple HPV types across diverse risk populations in the Netherlands. **Am J Epidemiol**. 15;179(10):1236-46, 2014.
- MUNOZ, Nubia et al. HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, v. 24, p. S1-S10, 2006.
- NICOLAU, S.M. **Rev. Assoc. Med. Bras**, v.49, n.3, 2003.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M.; SILVA, F. F. PCR em tempo real. **Rev. Biotecnol. Cienc. Des**, v. 33, 2004.

RAMA C, et al., Rastreamento Anterior para câncer de colo uterino em mulheres com alterações citológicas ou histológicas. **Rev Saúde Pública**, 42(3): 411-9, 2008.

SAWAYA, G.F.; WASHINGTON, A.E. Cervical cancer screening: which techniques should be used and why? **Clin Obstet Gynecol**, 42(4): 922-38, 1999.

SHIKOVA, E., Todorova, I., Ganchev, G., & Kouseva-Dragneva, V. Detection and typing of human papillomaviruses by PCR. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 23, n. sup1, p. 877-880, 2009.

SOTLAR, K., DIEMER, D., DETHLEFFS, A., et al. Detection and typing of human papillomavirus by e6 nested multiplex PCR. **J Clin Microbiol.**;42(7):3176-84, 2004.

TEIXEIRA, Lisiane O., et al. Prevalence of Human Papillomavirus types in women attending at University hospital in southern Brazil. **Medicina (ribeirao Preto. Online)**, [s.l.], v. 49, n. 2, p.116-123, 2 abr. 2016.

VERDOODT, F., JIANG, X., WILLIAMS, M., SCHNATZ, P.F., ARBYN, M. High-risk HPV testing in the management of atypical glandular cells: A systematic review and meta-analysis. **Int J Cancer**. 15;138(2):303-10, 2016.

VIEIRA, BSc Daniel Perez. **Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reações**. On line, disponível em URL: <http://www.imtsp.fm.usp.br/Protocolo/aula1.pdf>, v. 30, 2011.

WHO. **Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer**. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/>, 2015.

7. CONTATOS

Letícia Reberte: lep.reberte@gmail.com

Éder Pincinato: eder.pincinato@mackenzie.br