

# **Detecção de DNA de Papilomavírus Humano (HPV) em mulheres grávidas utilizando a urina**

SUELEN ANGELI<sup>1</sup>

TIAGO DALPIAZ<sup>2</sup>

LAURA GERBER<sup>3</sup>

REGINA BONES BARCELLOS<sup>4</sup>

MÁRCIA SUSANA NUNES SILVA<sup>5</sup>

MARIA LÚCIA ROSA ROSSETTI<sup>6</sup>

## **RESUMO**

*Este trabalho foi realizado com o objetivo de investigar a incidência de DNA de Papilomavírus Humano (HPV) em urina de gestantes atendidas no Hospital Divina Providencia, do município de Frederico Westphalen da Região do Médio Uruguai. As amostras coletadas foram encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular da ULBRA onde foram submetidas aos processos de extração de DNA e amplificação por PCR (Polimerase Chain Reaction) utilizando primers específicos do genoma viral. Os fragmentos de DNA foram visualizados em eletroforese em gel de agarose (1,5%). Das 70 gestantes que participaram do estudo, 9 apresentaram contaminação viral, sendo 12,9% da população estudada positiva para HPV.*

*Palavras-chave: Papilomavírus humano (HPV), gestantes, urina.*

---

<sup>1</sup>Acadêmico do curso de Biomedicina - Bolsista PROICT/ULBRA

<sup>2</sup>Acadêmico do curso de Biomedicina/ULBRA - Bolsista FAPERGS

<sup>3</sup>Aluno do PPG de Genética e Toxicologia Aplicada da Ulbra

<sup>4</sup>Aluno do PPG de Biologia Celular e Molecular da UFRGS

<sup>5</sup>Professora – Curso de Biomedicina/ULBRA

<sup>6</sup>Professora-Orientadora do Curso de Biomedicina e PPG de Genética e Toxicologia Aplicada /ULBRA (mrossett@terra.com.br)

## ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the incidence of human papillomavirus (HPV) in pregnant at the Hospital Divina Providencia, in Frederico Westphalen, at Middle Uruguay region. Samples of urine were collected and sent to molecular biology laboratory of Ulbra, and were submitted to DNA extraction and amplification by PCR (Polimerase Chain Reaction) using specific primers to detect the viral genome. DNA fragments were visualized in agarose gel (1.5%) after electrophoresis. From the 70 women who participate of this study, 9 of them presented the viral contamination, corresponding to 12.9% of positivity for HPV in the studied population.

**Keywords:** Human papillomavirus (HPV), pregnant, urine.

## INTRODUÇÃO

A infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) no trato genital é a doença sexualmente transmissível (DST) mais encontrada na população, representando um grave problema de saúde pública, especialmente nos países em desenvolvimento (CAMPOS et al., 2004). A presença de HPV é detectada em aproximadamente 10 a 40% da população feminina sexualmente ativa entre 15 e 49 anos de idade (TÁBORA et al., 2005). A infecção pelo HPV é considerada a causa principal dos casos de câncer cervical e de uma pequena fração dos casos de câncer vaginal, vulvar, peniano e anal (TAMIM et al., 2002).

Durante a gravidez o risco de infecção pelo HPV é mais elevado, devido a associação entre a elevação dos níveis hormonais e a imunossupressão (BANDYOPADHYAY e CHATTERJEE, 2006). A presença do vírus também pode levar a contaminação do recém nascido durante o parto, atingindo principalmente a árvore respiratória (MEDEIROS et al., 2005). Medidas preventivas poderiam ser realizadas, se o diagnóstico de infecção pelo HPV fosse co-

nhecido. Além disso, a detecção de HPV é usualmente feita em amostra cervical e a coleta desse material clínico não é recomendada para gestantes, dificultando a sua realização durante o período gestacional (COSTA et al., 2001).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de verificar a utilização de urina como amostra para o diagnóstico de HPV em mulheres grávidas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Local do estudo e população estudada

Fez parte deste estudo transversal um grupo de 70 gestantes que buscaram atendimento no Hospital Divina Providência da cidade de Frederico Westphalen da Região do Médio Alto Uruguai. Os critérios de inclusão foram gestantes internadas no hospital que, mediante consentimento informado, aceitaram participar do estudo. Foram excluídas do estudo gestantes em trabalho de parto.

## Amostras e a detecção de DNA de HPV

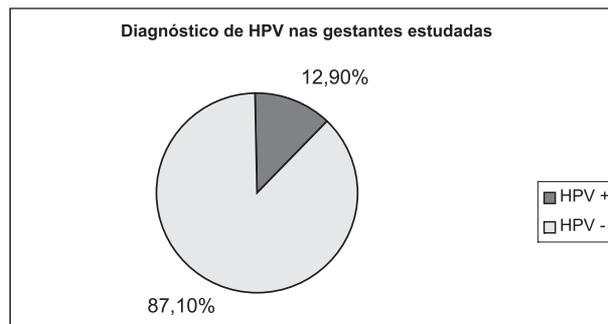
As amostras de urina coletadas foram refrigeradas e encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular da ULBRA, onde foram aliquotadas e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da preparação. Para a extração do DNA, as amostras foram centrifugadas a 5.200rpm por 5 min e tratadas com solução de lise a  $100^{\circ}\text{C}$  para romper a membrana celular. O material resultante desse processo foi centrifugado junto a uma resina de sílica. Foram feitas lavagens para a purificação da amostra. O DNA foi precipitado utilizando etanol  $70^{\circ}$  e ressuspendido em TE 1X (1 mM Tris-HCl; 1mM EDTA, pH 8,0) (adaptado de BOOM et al, 1990).

Após a extração, as amostras foram submetidas à amplificação por PCR. Os *primers* utiliza-

dos foram GP5+ (5' TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC 3') e GP6+ (5' GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C 3') (DE RODA HUSMAN et al,1995) gerando um fragmento de 150pb correspondente a parte do gene L1, que codifica a principal proteína do capsídeo viral. O produto final da PCR foi  $50\mu\text{l}$ , sendo  $10\mu\text{l}$  submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,5%) visualizado sob luz ultravioleta.

## RESULTADOS

Após o processamento das amostras e a reação de PCR, foi possível a detecção em gel de agarose de um fragmento de DNA de tamanho esperado em 9 das 70 amostras de urina de gestantes estudadas, ou seja, 12,9% das amostras foram positivas para DNA de HPV (Figura 1).



**Figura 1** – Percentual de gestantes atendidas no Hospital Divina Providência da cidade de Frederico Westphalen com diagnóstico positivo e negativo para HPV.

Uma análise do questionário aplicado foi feita para correlacionar os resultados com a idade da gestante. Foi possível observar que a maior prevalência de DNA de HPV ocorreu no intervalo entre 15 e 20 anos de idade, que corresponde ao período de início da atividade sexual.

## DISCUSSÃO

Diferentes estudos têm mostrado a alta prevalência de infecção por HPV em mulheres e em gestantes (NONNENMACHER et al, 2002; DENG et al., 2005; CARESTIATO et

al., 2006). Tendo em vista a dificuldade, as limitações e a importância da identificação da infecção pelo HPV em gestantes, o estudo da possibilidade de formas de detecção viral, bem como de alternativas de amostras clínicas são importantes e podem colaborar na diminuição dos casos de câncer cervical e na transmissão de HPV. Esse estudo mostrou a viabilidade da utilização de amostras de urina para o diagnóstico específico de HPV através da detecção de DNA. Estudos anteriores já demonstraram a possibilidade do uso de urina como material clínico para a detecção viral. Jacobson et al. (2000) relataram uma concordância entre os resultados de urina e amostras cervicais. No entanto, eles enfatizaram a necessidade de outros estudos. Porém, Howard et al. (2004) concluiu em seu estudo que o uso de urina era uma alternativa de obtenção de amostra mais fácil e menos invasiva. Até o momento, a investigação do uso de urina para detecção de HPV em grávidas não tem sido relatada. Um estudo com a urina de mulheres grávidas foi realizado para detecção de *Chlamydia trachomatis* (ROURS et al., 2005). No nosso estudo, foi possível detectar 12,9% de DNA de HPV nas urinas das gestantes analisadas e que a maior prevalência estava em mulheres de 15 a 20 anos. Murta et al. (2001) também encontraram que a prevalência maior da infecção estava em mulheres gestantes com idade superior a 20 anos.

Além disso, os testes moleculares como a captura híbrida e o PCR têm mostrado que são estratégias importantes para o diagnóstico (CARESTIATO et al., 2006; PAYAN et al., 2007). Neste trabalho, os resultados obtidos confirmam a possibilidade de utilizar o PCR para detectar especificamente o DNA de HPV.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Diretoria de Pesquisa da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da ULBRA, pela oportunidade de divulgação desse estudo que é parte de um dos projetos realizados no Laboratório de Biologia Molecular da mesma Universidade.

## REFERÊNCIAS

BANDYOPADHYAY, S.; CHATTERJEE, R. HPV viral load determination during pregnancy as a possible cervical cancer risk. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v.25, n.1, p.29-38, mar. 2006.

BOOM, R. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, n.3, p.495-503, mar. 1990.

CAMPOS, S.F. et al. Papiloma vírus humano. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 36, n.3, p. 137-142, 2004.

CARESTIATO, F.N. et al. Prevalence of human papillomavirus infection in the genital tract determined by hybrid capture assay. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.10, n.5, p.331-336, oct. 2006.

COSTA, M.S.H. et al. **Rotinas em obstetria**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2001.

DE RODA HUSMAN, A.M. et al. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. **Journal of General**

**Virology**, v.76, part 4, p.1057-1062, apr. 1995.

DENG, D. et al. Asymptomatic genital infection of human papillomavirus in pregnant women and the vertical transmission route. **Journal of Huazhong University of Science and Technology - Medical Science**, v.25, n.3, p.343-345, 2005.

HOWARD, M. et al. Optimal cutoff of the hybrid capture II human papillomavirus test for self-collected vaginal, vulvar, and urine specimens in a colposcopy referral population. **Journal of Lower Genital Tract Disease**, v.8, n.1, p.33-37, jan. 2004.

JACOBSON, D.L. et al. Concordance of human papillomavirus in the cervix and urine among inner city adolescents. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v.19, n.8, p.722-728, aug. 2000.

MEDEIROS, L.R. et al. Vertical transmission of the human papillomavirus: a systematic quantitative review. **Cadernos de Saúde Pública**, v.21, n.4, p.1006-1015, jul./ago. 2005.

MURTA, E.F.C. et al. Human papillomavirus infection in pregnancy: relationship with cytological findings. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.23, n.6, p.377-381, 2001.

NONNENMACHER, B. et al. Genital human papillomavirus infection identification by molecular biology among asymptomatic women. **Revista de Saúde Pública**, v.36, n.1, p.95-100, fev. 2002.

PAYAN, C. et al. Human papillomavirus quantification in urine and cervical samples by using the Mx4000 and LightCycler general real-time PCR systems. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.3, p.897-901, mar. 2007.

ROURS, G.I. et al. Use of pooled urine samples and automated DNA isolation to achieve improved sensitivity and cost-effectiveness of large-scale testing for *Chlamydia trachomatis* in pregnant women. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.9, p.4684-4690, sept. 2005.

TÁBORA, N. et al. *Chlamydia trachomatis* and genital human papillomavirus infections in female university students in Honduras. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.73, n.1, p.50, july 2005.

TAMIM, H. et al. Cervicovaginal coinfections with human papillomavirus and *Chlamydia trachomatis*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v.43, n.4, p.277-281, aug. 2002.