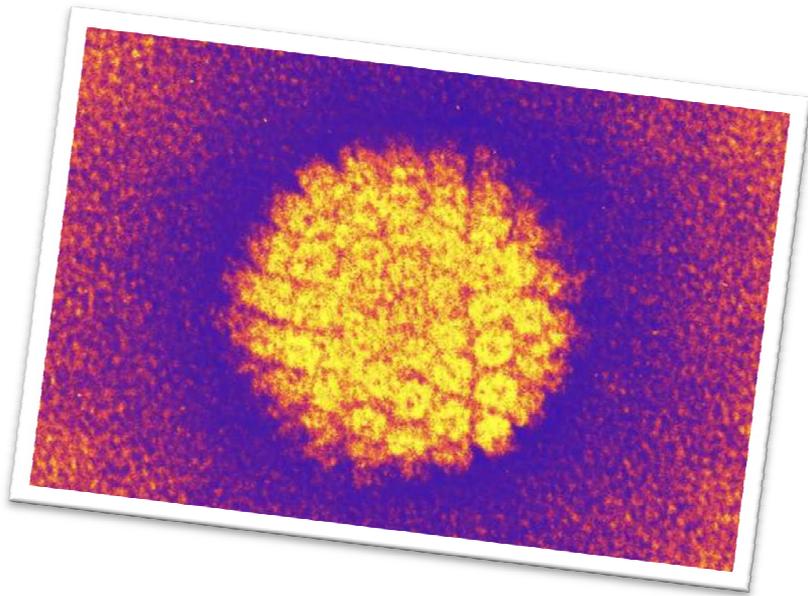


# **MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO**



---

**Patrícia Peixoto Martins**

Orientador: José Miguel Azevedo Pereira

Lisboa, 2013

## **Índice**

Resumo	3
1. Introdução	4
2. Estrutura e Replicação	6
3. Patogénese	8
4. Manifestações Clínicas	10
4.1. Cancro do colo do útero e o HPV	10
5. Diagnóstico laboratorial	13
5.1. Citologia e Histopatologia	13
5.2 Biologia Molecular	16
a. Detecção do DNA do vírus	16
b. Detecção do mRNA e de proteínas virais	19
c. Detecção de proteínas celulares	20
d. Detecção de anticorpos anti-HPV	20
6. Tratamento e Prevenção	23
6.1 Vacinação	24
7. Conclusão	26
Referências bibliográficas	27

## **Resumo**

Existem mais de 100 tipos conhecidos de vírus do papiloma humano (HPV), sendo o vírus sexualmente transmissível mais frequente. O vírus infecta as células basais do epitélio, mantendo-se no núcleo sob a forma de um epissoma de DNA de cadeia dupla. As infecções por HPV estão associadas a várias lesões malignas e benignas, incluindo verrugas genitais, neoplasias anogenitais malignas e neoplasias malignas da cavidade oral, cabeça e pescoço. Os subtipos de HPV mais frequentes estão associados aos casos de cancro do colo do útero. Em consequência, os subtipos de HPV são classificados, como de alto ou baixo risco, dependendo da incidência com que se associam a uma transformação maligna e ao desenvolvimento de lesões benignas. Actualmente, aceita-se de forma consensual que é necessário haver uma infecção por HPV para a progressão do cancro do colo do útero, todavia, ocorrências celulares adicionais, tais como o estado de integração do DNA do HPV e a carga viral, também constituem factores chave associados à progressão do cancro. Os métodos de detecção da infecção conjugam as áreas de citologia, histopatologia e biologia molecular, e desta forma, é possível o diagnóstico precoce e evitar um cancro invasivo. Como prevenção já existem as vacinas profiláticas contra o HPV.

## **1.Introdução**

Os vírus do papiloma humano (HPVs) são geneticamente diferentes, existem mais de 100 tipos que infectam diferentes locais do corpo, resultando numa variedade de manifestações da doença. A sua etiologia viral foi estabelecida em 1907 pela transmissão experimental de pessoa para pessoa por meio de inoculação de tecido retirado de uma verruga (ver figura 1). [1,2]

O vírus do Papiloma Humano (HPV) é comum na população sexualmente activa e infecta mais de 70% das mulheres em algum momento da sua vida porque está directamente ligado ao cancro do colo do útero pré-invasivo e à neoplasia invasiva. A relação entre a infecção pelo HPV e a neoplasia cervical já foi comprovada tanto com dados experimentais, como moleculares e clínicos. A maioria das infecções é transitória, muitas vezes aparecendo e desaparecendo, sem haver nenhuma anormalidade detectada na citologia.

Este vírus pode vir a ser um grave problema de saúde pública, especialmente nos países em desenvolvimento, devido ao seu envolvimento com tumores malignos, sendo o cancro do colo do útero o mais prevalente e de suma importância. Existem muitos tipos de HPV, o HPV 16 e o 18 são os mais cancerígenos (tabela 1), havendo outros também caracterizados por lesões de alto grau, frequentemente detectados no exame Papanicolau de rotina. Devido à falta de adesão das mulheres aos programas de rastreio e por possíveis resultados citológicos inconclusivos tem se verificado um aumento de casos de cancro provocado pelo HPV. A maioria das infecções regride dentro de 2 anos, no entanto, existem casos em que a infecção persiste e pode evoluir para cancro.

Os testes moleculares de detecção do ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico(RNA) ou proteínas, estão agora disponíveis comercialmente ou desenvolvidos internamente no laboratório. A detecção de DNA é hoje em dia uma ferramenta estabelecida, para diagnóstico e monitorização de doenças relacionadas com o HPV, no entanto, ainda há necessidade de um método de referência.

Recentemente, foram desenvolvidas vacinas profiláticas para HPV 6, 11, 16 e 18, tendo sido comprovada a sua segurança e eficiência, que faz com que as expectativas para a completa erradicação no futuro, destes tipos de HPV, sejam elevadas. [3, 27]

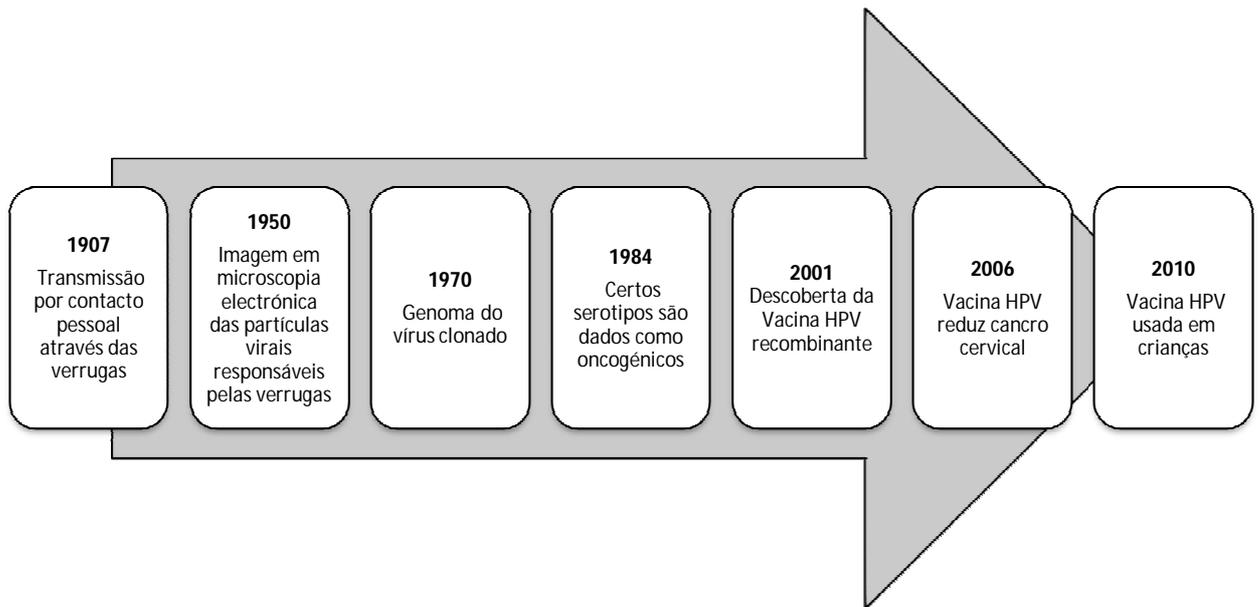


Figura 1. Principais descobertas sobre o HPV, adaptada do [9]

<b>Tabela 1. Classificação dos tipos de HPV</b> , adaptada de [3] (a negrito os mais frequentes e os mais raros entre parênteses)	
<b>Baixo risco</b>	<b>6, 11</b> , (40,42,43,44,54,61,72,81,89)
<b>Intermédio a baixo risco</b>	26, <b>53, 66,70, 73, 82, 83, 84</b>
<b>Alto a intermédio risco</b>	<b>31, 33, 35, 45, 52, 58</b> , (39,51, 56, 59, 68)
<b>Alto risco</b>	<b>16, 18</b>



A replicação do HPV é controlada pela actividade transcricional da célula hospedeira, conforme determinado pela diferenciação do epitélio da pele ou mucosa. O vírus tem acesso à camada celular basal através de rupturas na pele. As proteínas codificadas pelos genes precoces do vírus estimulam a multiplicação celular, o que facilita a replicação do genoma viral pela DNA polimerase da célula do hospedeiro, quando as células se dividem. O aumento do número de células induzido pelo vírus causa espessamento das camadas basal e espinhosa das células (verruga ou papiloma), como se pode ver na figura 4. À medida que a célula basal se diferencia, os factores nucleares específicos expressos nas diferentes camadas e tipos de pele e mucosa, promovem a transcrição de diversos genes virais. Utilizando a maturação da célula cutânea, o vírus atravessa as camadas da pele, sendo libertado com as células mortas da camada superior.[5,12]

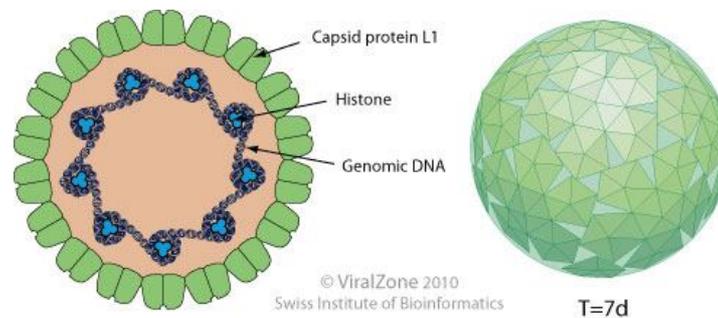


Figura 3. Estrutura do viriã *Papillomaviridae* adaptado de [12]

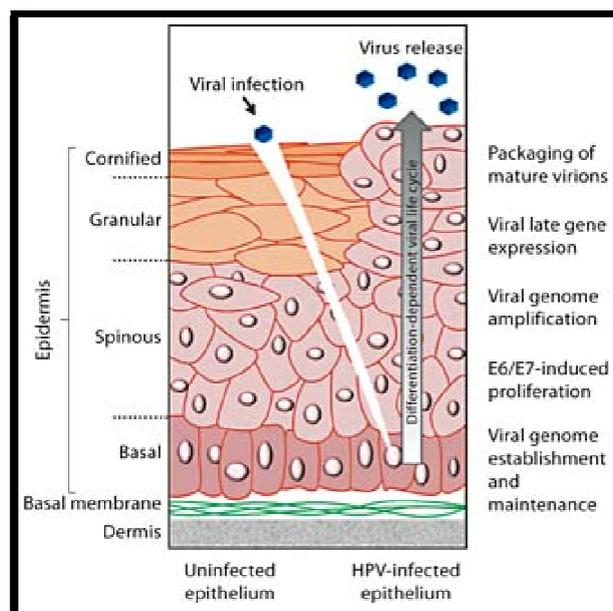


Figura 4. Infecção epitelial característica do HPV, adaptado de [38]

### **3.Patogénese**

O vírus é transmitido por contacto directo, através de pequenas rupturas na pele ou mucosa, por via sexual ou durante o parto. Tem como alvo o epitélio escamoso da pele (verrugas) e das mucosas (papilomas genitais, orais e conjuntivais), e induz a proliferação epitelial. Os tipos de HPV são muito específicos nos tecidos, causando diferentes formas patológicas, como podemos ver na tabela 2. A verruga desenvolve-se como resultado do estímulo viral ao crescimento celular e espessamento das camadas basal e espinhosa, bem como da camada granulosa. Normalmente são necessários 3 a 4 meses para que a verruga se desenvolva. [1,5,13]

A infecção viral permanece localizada e em geral regride espontaneamente, possivelmente como resultado da resposta imune, podendo vir a recorrer. A imunidade inata e celular, são importantes para o controlo e a resolução de infecções por HPV, mesmo sabendo que este vírus pode suprimir ou evitar as respostas imunes. As respostas inflamatórias activam respostas citolíticas protectoras e promovem a resolução das verrugas. Nos casos de imunodepressão, nomeadamente os doentes com Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA), apresentam recorrências e infecções mais agressivas e com uma menor probabilidade de regressão espontânea. [30]

O DNA viral é encontrado em tumores benignos e malignos, especialmente papilomas de mucosas, bem como em todo o espectro clínico das lesões precursoras de cancro do colo do útero invasivo. O HPV-16 e o HPV-18, causam papilomas e displasia cervical. A quebra do genoma circular nos genes E1 ou E2 para promover a integração, frequentemente faz com que esses genes sejam inactivados, desta forma impedindo a replicação viral sem impedir a expressão de outros genes do HPV, inclusive os genes E6 e E7. As proteínas E6 e E7 do HPV-16 e HPV-18 foram identificados como oncogenes porque ligam e inactivam as proteínas supressoras de multiplicação celular, p53 e p105, produto do gene da retinoblastoma. A E6 liga-se à proteína p53 e marca-a para a degradação, já a E7 liga-se e inactiva a retinoblastoma (Rb). Sem este controlo sobre a multiplicação celular, a célula torna-se mais susceptível a mutações, alterações cromossómicas ou acção de cofactores, podendo conduzir ao cancro. [1,5,13]

A interacção entre E6 e E7 com as proteínas celulares e com as mudanças da metilação do DNA causam alterações nas principais vias celulares, na adesão celular, na resposta imunitária, na apoptose e no controlo do ciclo celular.

Uma infecção persistente com um ou mais tipos de alto risco conduz ao longo do tempo ao desenvolvimento e progressão de uma CIN (neoplasia cervical intrauterina). O desenvolvimento de CIN I não é necessariamente um precursor cancerígeno, e pode mesmo ser visto em infecções causadas por tipos de baixo risco. Mesmo lesões CIN II podem regredir naturalmente. Uma grande fracção de mulheres infectadas, por tipos de HPV de alto risco, sem alterações citológicas, irá desenvolver CIN II ou CIN III em 4 anos. Enquanto mulheres negativas para tipos de alto risco mas com alterações citológicas é improvável que venham a ter CIN II/ III durante um período de 2 anos, e as alterações podem regredir. [23]

<b>Tabela 2. Associações Clínicas do HPV adaptada de [1,9]</b>		
<b>Tipo de Lesão</b>	<b>Local</b>	<b>Tipo de HPV</b>
<b>Lesões predominantemente benignas</b>		
Verrugas comuns	Pele, vários locais	2, 4
Verrugas plantares e palmares	Mãos e pés	1, 2, 4
BerrugaButcher`s	Mãos	7
Verrugas planas	Pele, vários locais	3
Verrugas genitais (condiloma acuminata)	Colo do útero, vários locais	6, 11
Papiloma de laringe juvenil	Laringe	6, 11
<b>Lesões malignas e potencialmente malignas</b>		
Verrugas planas	Pele	<b>10</b>
Bowenoidpapulosis	Vulva, pénis	<b>16</b>
pré-malignas e malignas intraepiteliais	Colo do útero, pénis	Muitos tipos, incluindo 6, 11, <b>16, 18, 31, 36-45, 51-56</b>
<b>Neoplasia</b>		
Carcinoma	Colo do útero, pénis	<b>16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82</b>
Papiloma/Carcinoma	Laringe	<b>16</b>
Epidermodisplasiaverruciforme	Pele, vários locais	Muitos tipos, incluindo <b>5, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 17, 19-29</b>

(Tipos de HPV particularmente susceptíveis de se tornarem malignos estão a negrito)

#### **4. Manifestações Clínicas**

O HPV está associado a uma variedade de manifestações cutâneas, incluindo verrugas comuns, palmares, plantares, planas, anogenitais e epidermodisplasia verruciforme. Manifestações da mucosa incluem verrugas orais e condiloma, hiperplasia epitelial focal, papilomas nasais, da conjuntiva e da laringe e lesões cervicais.

As verrugas são proliferações benignas e autolimitadas da pele que regredem com o tempo. A maioria das pessoas, são infectadas pelos tipos mais comuns, o HPV-1 e o HPV-4, que geralmente estão presentes nas mãos e pés. Estas infecções ocorrem na infância e adolescência e o período de incubação pode durar 3 a 4 meses. Os papilomas orais são tumores epiteliais benignos, podem ocorrer em qualquer faixa etária, sendo únicos e que raramente recorrem após a excisão cirúrgica. Os papilomas laríngeos estão associados ao HPV-6 e ao HPV-11, sendo que, no caso das crianças pode ser fatal se obstruir as vias aéreas. No caso das verrugas anogenitais, estas ocorrem quase exclusivamente no epitélio escamoso e estão associadas também ao HPV-6 e ao HPV-11, sendo que em indivíduos saudáveis não se tornam malignas.

A infecção pelo HPV no tracto genital é considerada uma doença sexualmente transmissível, com uma infecção geralmente assintomática, que se resolve espontaneamente ou aumenta gradualmente, sendo detectada pelas verrugas características. As verrugas genitais podem ser de forma plana, elevada ou em forma de couve-flor e de coloração castanha, que podem surgir semanas ou meses após o contacto sexual com uma pessoa infectada. As alterações citológicas, que indicam uma infecção pelo HPV, são as células coilocitóticas detectadas num esfregaço cervical com coloração de Papanicolau. Os tipos de HPV associados a infecções genitais são os HPV-16, HPV-18, HPV-31 e o HPV-45 que causam neoplasia cervical intra-epitelial e cancro, como se pode observar na tabela 2. [5,6,7]

##### **4.1 Cancro do colo do útero e o HPV**

Estima-se que os vírus contribuem para 20% de todos os cancros humanos, mas, em cada caso, a infecção é apenas um dos factores que contribui para o desenvolvimento da doença. Como resultado, estes vírus causam cancro em apenas uma pequena percentagem das pessoas que são infectadas. Um estudo sobre os vírus que podem

causar cancro em pessoas ou em animais de laboratório revelou muito sobre os processos que estão na base da formação de todos os tipos de cancro. [8]

Existem muitas famílias de vírus de DNA que provocam um processo de oncogénese. O HPV faz parte dos vírus oncogénicos de pequenas dimensões como são também os Adenovírus e os Poliomavírus. São exemplos de vírus de DNA de grandes dimensões possíveis causadores de processo oncogénico, os vírus do Herpes (HHV-8 e EBV) e o Poxvírus.

Sabemos que um cancro resulta da proliferação anormal de células. Normalmente, as células crescem e dividem-se para formar novas células. No seu ciclo de vida, as células envelhecem, morrem e são substituídas por novas células. Algumas vezes, este processo ordeiro e controlado corre mal, formando-se células novas, sem que o organismo necessite e, ao mesmo tempo, as células velhas não morrem. Este conjunto de células extra forma um tumor. Esta excessiva proliferação pode acontecer devido à acção das oncoproteínas virais que bloqueiam factores celulares, incluindo as proteínas supressoras tumorais, que actuam como “travões” sobre o ciclo celular. Duas das mais importantes proteínas supressoras são a proteína Rb e a p53.[30]

O cancro do colo do útero foi reconhecido como uma doença sexualmente transmissível. É a segunda doença maligna mais comum nas mulheres em todo o mundo com 0,5 milhões de novos casos diagnosticados todos os anos. Cerca de 80% dos casos ocorre nos países em desenvolvimento. Embora cerca de 40 tipos de HPV possam ser encontrados no tracto genital, apenas um subconjunto é encontrado no cancro do colo do útero. Os serotipos de alto risco são oHPV-16, 18, 31 e 45, que representam 80% dos casos positivos de cancro. E o tipo 16 é o que tem maior incidência (tabela 2). Deve-se enfatizar que o HPV é o vírus sexualmente transmitido mais comum, com prevalência em mulheres mais velhas. [9]

Os factores de risco que em simultâneo aumentam as probabilidades de desenvolver este cancro, são:

- ◆ Presença do DNA do HPV
- ◆ Não realizar o exame citológico com regularidade
- ◆ Sistema imunitário deprimido
- ◆ Idade

- ◆ História sexual
- ◆ Tabagismo
- ◆ Toma de pílula anticoncepcional durante longos períodos de tempo
- ◆ Ter muitos filhos [11]

De facto, considerando dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais, sabemos que o cancro do colo do útero não acontece sem que haja uma presença constante do HPV no doente, sendo que esta associação é mais forte do que a relação entre o tabagismo e o cancro dos pulmões. Contudo na presença de uma infecção pelo vírus, o desenvolvimento de um cancro não é certo (figura 5). Só numa pequena percentagem as infecções progridem para lesões de alto grau (HSIL) e cancro, esta progressão depende da persistência da infecção, da carga viral e da integração do DNA do HPV de alto risco no genoma do hospedeiro. [23,27]

As taxas de mortalidade são significativamente mais baixas que as taxas de incidência de cancro. Em Portugal, estima-se que 22 a 29% das mulheres entre os 18 e os 29 anos possam estar infectadas por um ou mais tipos de HPV. E estima-se que existam 752 novos casos de cancro provocado pelo HPV em Portugal, tendo em conta dados fornecidos pelo ECCA (European Cervical Cancer Association) e pelo IPO de Lisboa. [23, 32, 33]

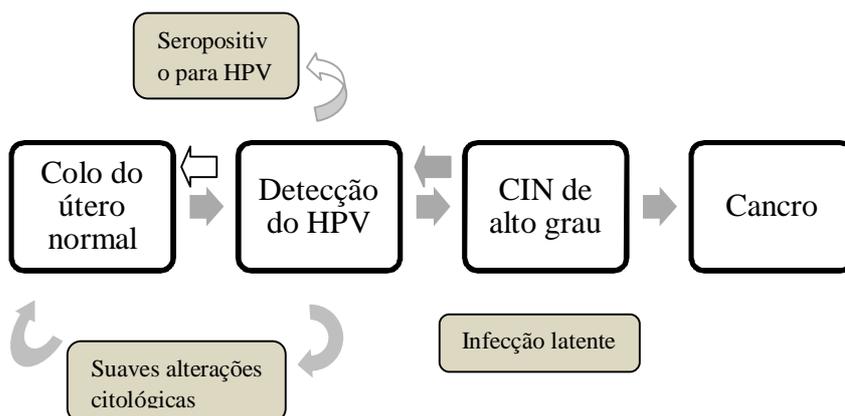


Figura 5. História natural do HPV adaptado de [35]

## 5. Diagnóstico Laboratorial

Uma vez que o ciclo de replicação do HPV só pode ser realizado em células epiteliais diferenciadas, o isolamento do vírus a partir de amostras clínicas é difícil. Como o HPV não pode ser cultivado, todos os ensaios de HPV actualmente em uso baseiam-se na detecção de DNA viral.

Depois de detectado o vírus, é importante proceder à genotipagem do HPV, de modo a prever a gravidade da infecção e assim ter uma melhor avaliação do estado do doente, principalmente nos casos de infecção persistente e para prevenção de doentes já imunizados com uma das vacinas. Como já foi referido existem mais de 100 genótipos diferentes deste vírus mas só um subconjunto destes genótipos são de alto risco.

### 5.1. Citologia e Histopatologia

É fundamental tanto para diagnóstico como para a investigação, o estudo morfológico das doenças através da citologia e histologia.

A principal manifestação do HPV, uma verruga, pode ser confirmada pela observação microscópica, com base na sua aparência histológica característica, que consiste em hiperplasia de células espinhosas e uma produção excessiva de queratina (figura 6). Através do exame, chamado Papanicolau, pode-se identificar a presença das verrugas ou de áreas irregulares no colo do útero e levar ao diagnóstico do HPV, pela presença de células epiteliais escamosas coilocitóticas (citoplasma com vacúolos, figura 8), que são arredondadas e apresentam-se agrupadas. Com uma colposcopia é possível a visualização mais detalhada de lesões, também muito utilizada para o diagnóstico. Através da citologia são possíveis diagnósticos de neoplasias malignas e das suas lesões precursoras assim como a detecção de agentes infecciosos (por exemplo o HSV-1 e 2). [3,5]

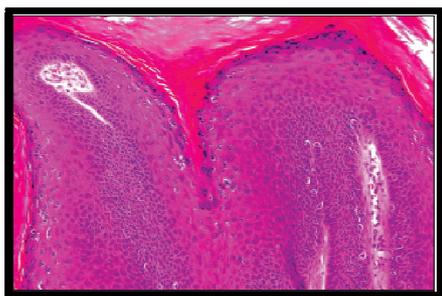


Figura 6. Verruga comum, adaptada de [6]

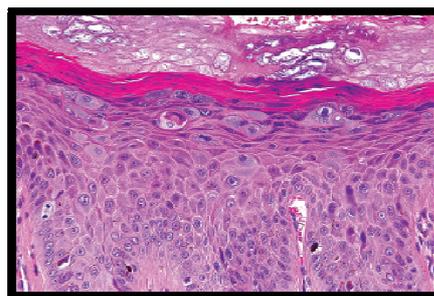


Figura 7. Epidermodisplasiaverruciforme, adaptada de [6]

A neoplasia intra-epitelial cervical (CIN), também conhecida como a displasia cervical e neoplasia cervical intersticial, é a transformação potencialmente pré-maligna e de crescimento anormal (displasia) de células escamosas na superfície do colo do útero. A maioria dos casos de CIN permanece estável, ou são eliminados pelo sistema imunológico do hospedeiro, sem intervenção. No entanto, uma pequena percentagem de casos evolui para cancro do colo uterino, carcinoma de células do colo do útero geralmente espinocelular, se não tratada. A principal causa de CIN é uma infecção crónica do colo do útero com o HPV. A primeira alteração microscópica correspondente a CIN é a displasia do revestimento epitelial ou superfície do colo do útero, que é indetectável pela mulher. Alterações celulares associadas à infecção pelo HPV, como coilocitos, também são vulgarmente observadas.

Actualmente os resultados de citologia são qualificados segundo a classificação de Bethesda e os histológicos pelo sistema CIN(ver tabela 4).O sistema de Bethesda, usado desde 1988 e actualizado desde 1999, foi desenvolvido para uniformizar as descrições citológicas dos esfregaços de Papanicolau e assim melhorar a comunicação entre os clínicos. O sistema CIN é baseado na arquitectura dos tecidos e foi introduzido em 1973 para promover o conceito de evolução da doença a partir de lesões precursoras de cancro. A CIN geralmente é detectada por um teste de triagem, o esfregaço Papanicolau, com o objectivo de detectar alterações potencialmente pré-cancerosas. Os resultados do exame de Papanicolau são reportados utilizando o Sistema de Bethesda (ver tabela 5).

Um resultado anormal pode levar a uma recomendação para a colposcopia do colo do útero, durante o qual o colo do útero é examinado sob ampliação. É feita uma biópsia de todas as áreas suspeitas, para confirmar diagnósticos com a observação de características patológicas da infecção pelo HPV, tal como a hiperplasia e coilocitose em queratinócitos com núcleos atípicos, e assim diagnosticar possíveis displasias do colo do útero (ver tabela 6).Mulheres seropositivas para o HIV (vírus da imunodeficiência humana) têm maior risco de ter uma

CIN.[7,33]

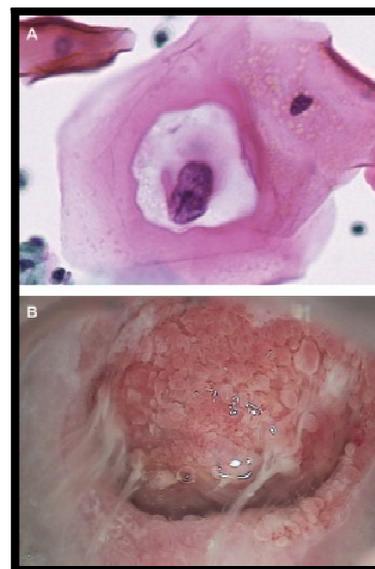


Figura 8. (A) preparação de citologia fina com coilocito típico com discariose, halo perinuclear e citoplasma denso e (B) a imagem de uma colposcopia da zona de transformação cervical indicativo de LGSIL numa infecção pelo HPV, adaptada de [3]

Tabela 4. Adaptada de [7]

Classificação Bethesda		Sistema CIN
1991	1999	Histologia
<b>Citologia</b>		
Negativo para lesões intraepiteliais ou malignas	Dentro dos limites normais	Normal
ASCUS	ASC-US	
	ASC-H	
AGUS		
L-SIL	L-SIL	CIN I (neoplasia cervical intraepitelial)
H-SIL	H-SIL	CIN II/III
Carcinoma	Carcinoma	Carcinoma Invasivo de células epiteliais Adenocarcinoma

Tabela 5. Possíveis resultados de um exame Papanicolau, adaptada de [33]

Resultado	Significado	O que acontece a seguir?
ASC-US	Células escamosas atípicas de significado indeterminado	-Novo exame passados 6 meses ou -Teste do HPV (biologia molecular) ou -Colposcopia
ASC-H	Células escamosas atípicas - não se pode excluir HSIL	Colposcopia
LSIL	Lesão escamosa intra-epitelial de baixo grau	Colposcopia
HSIL	Lesão escamosa intra-epitelial de alto grau	Colposcopia

Tabela 6. Possíveis resultados de uma biópsia, adaptada de [33]

Resultado	Significado	O que acontece a seguir?
Normal	Não foi detectada qualquer anomalia	Realizar novo exame daí a um ano
CIN 1	Anomalia ligeira	A maioria destas lesões desaparece espontaneamente, exigindo apenas vigilância. Em algumas situações de risco pode se optar por tratamento.
CIN 2 ou 3	Anomalia moderada ou grave	Tratamento

## 5.2. Biologia Molecular

### a) Detecção do DNA do HPV

O principal valor da detecção do DNA do HPV é identificar um cancro invasivo numa mulher em que as lesões não tenham sido detectadas na citologia. O uso da biologia molecular em conjunto com o Papanicolau reduz substancialmente o número de casos de cancro e minimiza o número de mulheres com cancro indetectado no despiste citológico. Em comparação com as alterações citológicas e histológicas que acompanham a infecção pelo HPV, o DNA do HPV é detectado mais cedo e é detectável por um longo período de tempo. A detecção do DNA do vírus serve também como método de monitorização de uma possível recorrência e para comprovar a total erradicação do vírus após o tratamento. [3,10,15]

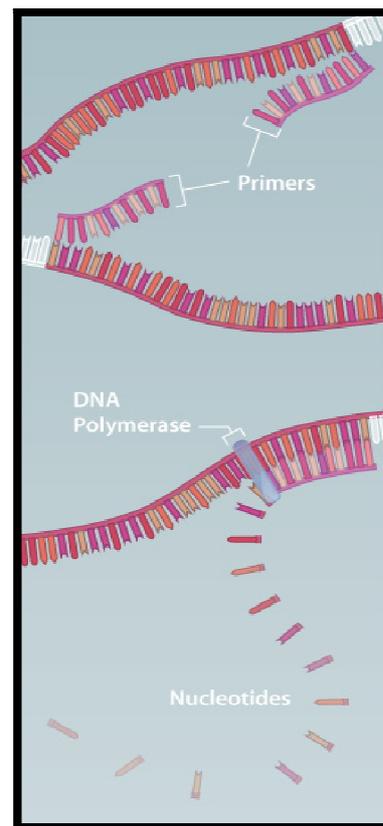


Figura 9. Reacção Polimerase em cadeia adaptada de [18]

A Reacção Polimerase em cadeia (PCR) é um método de síntese de ácidos nucleicos *in vitro* através do qual um determinado fragmento de DNA pode ser especificamente replicado. Requer a presença de dois oligonucleótidos (*primers*) que cercam o fragmento de DNA a amplificar, e que são usados como iniciadores de uma série de reacções sintéticas cíclicas catalisadas por uma DNA polimerase. Este processo de amplificação enzimática de DNA, imitando em parte o processo de replicação que ocorre *in vivo*, permite teoricamente, existindo condições de reacção óptimas, duplicar em cada ciclo a quantidade de fragmento de DNA, do qual resulta um aumento exponencial de produto. [26]

A PCR em tempo real consiste em monitorizar o processo de amplificação do DNA à medida que este ocorre. Tanto o processo enzimático de PCR como a detecção do produto de PCR ocorrem no mesmo capilar de reacção. Os instrumentos medem o produto de PCR formado, através de

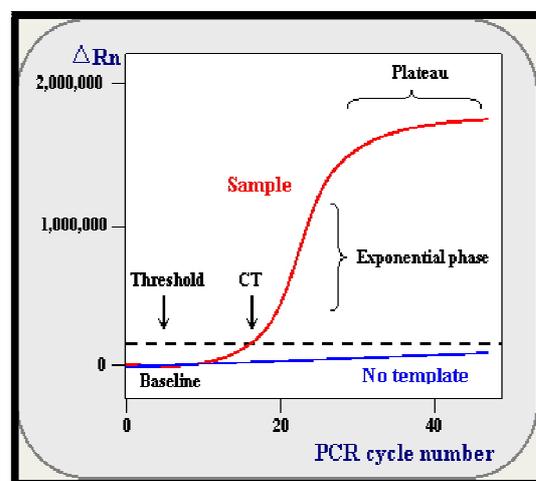


Figura 10 "Real Time quantitative Reverse Transcription PCR" adaptada de [19]

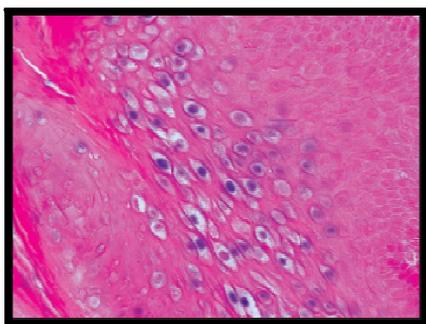
marcadores fluorescentes directamente com marcadores que se ligam à dupla cadeia de DNA (ex. SYBR Green I), ou indirectamente com oligonucleótidos marcados com fluorescência (sondas fluorescentes), que reconhecem e se ligam por emparelhamento de bases a uma região específica da cadeia de DNA. A quantidade de fluorescência é proporcional à quantidade de produto no capilar de reacção. O número de ciclos necessário para gerar um sinal detectável depende da concentração inicial de DNA na amostra. Deste processo resulta uma curva com perfil sigmoidal, como é visível na figura 10, na qual o período de máxima actividade enzimática (fase de crescimento exponencial ou fase *log linear*) é seguido de um período de baixa actividade (a fase de *plateau*), em que há uma reduzida concentração de substractos (dNTPs). O parâmetro  $C_p$  (*crossing-point*) refere-se ao ciclo, ou tempo, no qual o alvo a amplificar é detectado pela primeira vez, e representa o início da fase exponencial. Há uma correlação entre o  $C_p$  e a concentração.

A PCR tradicional é analisada na fase de *plateau* enquanto na PCR em tempo real os dados são recolhidos na fase exponencial da reacção. A PCR em tempo real tem como vantagens um limite de detecção superior e ausência de manipulação pós-PCR, minimizando a hipótese de contaminação. A PCR em tempo real pode ser usada para a detecção de agentes patogénicos, por discriminação positiva ou negativa, com utilização de um controlo positivo, mas também permite a sua quantificação.

Os ensaios com sondas baseiam-se na FRET (*Fluorescence resonance energy transfer*), que consiste numa transferência de energia dependente de distância entre dois fluoróforos adjacentes. Estão descritas duas formas de FRET: com sondas de hidrólise e com sondas de hibridação. [16,18,19,26]

Outra técnica também usada para a detecção de DNA do HPV, mas em tecidos fixados (biópsias ou esfregaços celulares), é a hibridação *in situ* (ISH) (figura 11). O método resulta através de diferentes colorações, uma coloração nuclear das células contendo DNA do HPV, e coloração citoplasmática, que representa a detecção de RNA do vírus. A interpretação clínica de qualquer coloração ou da sua ausência deve ser complementada por estudos morfológicos utilizando controlos adequados, e deve ser avaliada no contexto da história clínica do doente e de outros testes complementares de diagnóstico.

Mais uma das técnicas utilizadas na detecção do vírus é a Captura Híbrida. É baseada na hibridação em fase líquida usando sondas de RNA sintéticas complementares com a sequência do genoma de 13 tipos de HPV de alto risco e 5 de baixo risco. O DNA presente na amostra é hibridado em fase de solução com sonda sem cocktails e forma complexos híbridos de DNA-RNA específicos do HPV. Estes híbridos são capturados pelos anticorpos ligados aos poços de placas de microtitulação, que reconhecem os complexos específicos. É um ensaio clínico que usa a quimioluminescência para detectar qualitativamente a presença do HPV, através de um anticorpo que é capturado consoante o sinal da amplificação. Este ensaio não permite distinguir os vários tipos de HPV. Como a intensidade do produto luminescente é proporcional à quantidade de DNA específico do HPV na amostra, pode se dizer que a reacção é semiquantitativa. [13,24]



**Figura 11. Hibridação insitu numa verruga comum com coloração nuclear positiva, adaptada de [6]**

#### **b) Detecção do mRNA e das proteínas virais**

A E6 e a E7 são oncoproteínas envolvidas no processo carcinogénico. A expressão persistente de E6 e E7 pode servir como indicador de progressão de neoplasia intraepitelial para cancro invasivo. Detectar o mRNA codificado pela E6 ou pela E7 pode proporcionar um melhor valor preditivo positivo e detectar lesões de alto risco.

Do mesmo modo, a quantificação das proteínas E6 ou E7 pode proporcionar um melhor valor preditivo do que a detecção de DNA viral sozinho. No entanto, a medição das proteínas E6 e E7 pode não ser a melhor das hipóteses, por estas serem produzidas em pequenas quantidades em células transformadas, e pela sensibilidade do ensaio.[31]

A detecção das proteínas é feita por Imuno-histoquímica (IHQ). Tem como princípio localizar antígenos em células de uma amostra de tecido, através da ligação específica de anticorpos a antígenos no tecido biológico. A coloração Imuno-histoquímica é amplamente utilizada no diagnóstico de células características de neoplasias. IHQ é também amplamente utilizada no estudo da distribuição e localização de biomarcadores e proteínas expressas em diferentes partes de um tecido biológico, como marcadores moleculares específicos da proliferação ou de apoptose por exemplo. A visualização de uma interação antígeno-anticorpo pode ser obtida de diversas formas. Na situação mais comum, um anticorpo é conjugado a uma enzima, como a peroxidase, que pode catalisar uma reacção que produzirá coloração. Alternativamente, o anticorpo pode também ser marcado com um fluoróforo. [3,13]

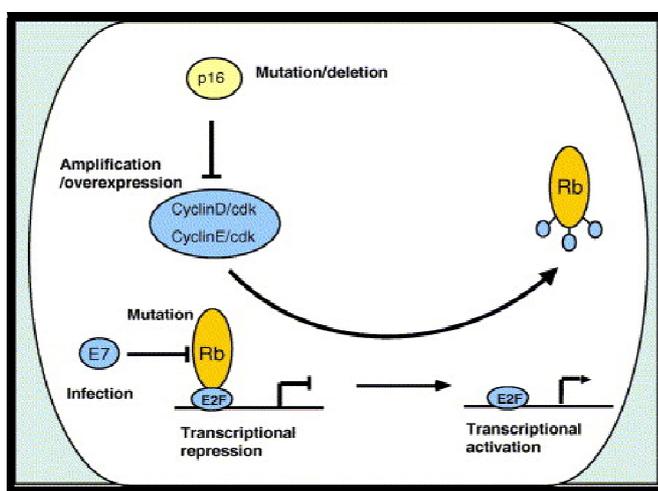
A detecção do RNA viral pode ser feita através de RT-PCR e electroforese em gel. A RT-PCR é um método muito sensível e específico para detecção de RNA. Uma vez que o RNA não é um substrato eficaz para a *Taq* polimerase, é necessário proceder à transcrição reversa antes de iniciar a amplificação. Um *primer* liga-se à sequencia alvo do RNA e a transcriptase reversa cria uma nova cadeia de DNA complementar (cDNA), que pode ser usada como substrato de amplificação.

A detecção do mRNA e das proteínas virais pode ser um meio complementar à citologia ou à detecção do DNA do HPV no rastreio do cancro do colo do útero. [31]

### **c) Detecção de proteínas celulares**

Estudos recentes demonstraram que a proteína p16 está presente em quase 100% dos casos de HSIL, carcinomas escamosos e adenocarcinoma *insitu*, além de auxiliar nos casos de LSIL associados ao HPV de alto risco. A análise imunocitoquímica da p16 pode também ser útil nos casos em que a citologia não distingue HSIL de alterações inflamatórias, reactivas ou mesmo do epitélio normal. A p16 é considerada um bom marcador molecular nos casos em que os resultados na citologia e histologia são inconclusivos.

O genoma do HPV interage com as proteínas da célula do hospedeiro bloqueando algumas funções biológicas e provocando desequilíbrio na expressão das oncoproteínas E6 e E7 nas células. Tanto a oncoproteína E6 como E7 actuam sobre proteínas supressoras de tumor, a p53 e a Rb respectivamente. A fosforilação da pRb é normalmente inibida pelas CdK 4 e 6, as quais são controladas por várias proteínas inibidoras, como é o caso da p16. Há um aumento da expressão de p16, devido a perda da repressão habitualmente mediada pelo complexo Rb/E2F e pela forte activação pela E2F livre (figura 12). Visto que as CdK 4 e 6 não sofrem inibição pela p16, os genes da fase S são continuamente activados, immortalizando a célula.



**Figura 12.** Na fase G0/G1 do ciclo celular, Rb liga-se a E2F, reprime os genes-alvo de E2F. Complexos ciclina / cdk activados fosforilam Rb permitindo a sua libertação do E2F. Transcrição E2F é mediada, permitindo que a célula passe de G1 para a fase S do ciclo celular. Uma mutação de p16, *upregulation* da ciclina / cdk infecção com o vírus do papiloma humano (HPV) a E7 podem levar à activação constitutiva de E2F, adaptada de [39]

Então considera-se que a expressão da p16 pode ser usada como marcador prognóstico de risco de cancro cervical invasivo em mulheres infectadas pelo HPV. Mas em condições de stress fisiológico a p16 é expressa para bloquear o ciclo celular e induzir a apoptose, logo é possível obter resultados positivos da coloração imunohistoquímica de p16 em epitélios escamosos e metaplásicos normais, no entanto a expressão da proteína é maior no carcinoma invasivo do colo do útero. A p16 revelou-se um marcador de lesões cervicais promissor. [17,27,28]

#### **d) Detecção de anticorpos anti-HPV**

A detecção da infecção pelo HPV através de testes serológicos não é usado como rotina na maioria dos laboratórios. É sabido que os primeiros ensaios de serologia desenvolvidos revelaram uma baixa sensibilidade e especificidade. A frequência e o título de vários anticorpos expressos contra o HPV mostraram uma grande variabilidade que depende do tipo de HPV presente na infecção e do epítipo reconhecido. Foi estudado em meio experimental, que a resposta humoral ocorre com uma rápida resposta de IgM e IgA, seguida do desaparecimento da IgM, uma diminuição da IgA e aparecimento de níveis estáveis de IgG.

Várias tentativas foram propostas para desenvolver provas serológicas mais sensíveis e específicas. Os primeiros testes baseavam-se em antígenos do virião desnaturado, mais recentemente desenvolveram-se testes baseados em *viral-like particles* (VLP). Estas partículas derivam da expressão da maior proteína da cápside viral em células eucarióticas, podendo ser usadas para detectar anticorpos no soro de pacientes infectados, através da técnica ELISA.

A utilização da serologia como possível marcador da infecção pelo HPV, traz imensas dificuldades. Devido a reacções cruzadas entre os diferentes tipos de HPV, que podem infectar muitas partes do organismo, assim como a fraca resposta das células imunocompetentes das camadas superficiais do epitélio, onde se dá a expressão viral do HPV.[17,37]

<b>Tabela 7. Comparação dos métodos de detecção do HPV, adaptada [17]</b>		
<b>Método</b>	<b>Vantagem</b>	<b>Desvantagem</b>
<b>DNA HPV</b>		
<b>PCR</b>	Alta sensibilidade	Não distingue clinicamente infecções relevantes das irrelevantes
<b>PCR em tempo real</b>	Alta sensibilidade e especificidade, estimativa da carga viral	Requer um processamento complexo da amostra de tecido (ex. microdissecação, extração de DNA)
<b>ISH</b>	Optimizado para tecidos fixados, visualização da distribuição viral, altamente específico.	Especificidade reduzida e carga viral baixa
<b>Captura híbrida 2</b>	Pode ser aplicado em amostras citológicas, não precisa de processamento.	Mais estudos são necessários para determinar a sensibilidade geral e especificidade
<b>RNA HPV</b>		
<b>PCR transcriptase reversa</b>	Altamente específico e sensível	Limitado a amostras de tecido congeladas
<b>Proteínas do HPV</b>		
<b>E6/E7 imunohistoquímica</b>	Visualização da expressão de oncoproteínas	Fraca “performance”
<b>Proteínas celulares</b>		
<b>P16 imunohistoquímica</b>	Optimizado para tecidos fixados, altamente sensível, forte correlação com a integração do HPV	Baixa especificidade
<b>Soro de anticorpos</b>		
<b>Anticorpos Anti-HPV</b>	Minimamente invasivo, não é preciso tecidos	Baixa sensibilidade e especificidade como marcador de cancro.

## **7. Tratamento e Prevenção**

Numa resposta a uma doença viral em primeiro lugar pensamos na prevenção e em segundo no tratamento. A primeira estratégia assenta em duas abordagens: higiene pública e pessoal, que talvez desempenha uma maior importância dentro da prevenção, e a vacinação, que faz uso do sistema imunitário para combater a infecção viral. A maioria dos danos celulares durante a infecção viral ocorrem no início, muitas vezes antes dos sintomas clínicos da doença aparecerem. Isto torna o tratamento muito difícil, por isso a prevenção, para além de ser mais barata, é considerada um melhor método.

O tratamento das infecções por HPV depende de diversos factores, entre os quais a idade da paciente, o local e o número de lesões e o estado de saúde geral da mulher. É muito importante o acompanhamento médico e uma vigilância assídua, mesmo no pós-tratamento. Apesar de existir várias formas de tratamento, não há um tratamento único, sendo que a maioria tem como finalidade destruir as células infectadas. Há diversos métodos para tratar lesões cervicais, incluindo criocirurgia, laser, cirurgia de alta frequência (CAF) / electrocauterização, conização, tratamentos químicos e imunomoduladores.[9,11,29]

As mulheres com cancro do colo do útero podem ser tratadas através de cirurgia, radioterapia, quimioterapia, radioterapia com quimioterapia ou uma combinação dos três métodos. A cirurgia trata o cancro localmente, no colo do útero e na área adjacente ao tumor. A radioterapia utiliza raios de alta energia para matar as células cancerígenas, afectando apenas as células da região tratada. A quimioterapia utiliza fármacos anti-neoplásicos para matar as células cancerígenas, e é considerado um tratamento sistémico, uma vez que os fármacos entram na corrente sanguínea e afectam as células de todo o corpo.

Como medidas preventivas deve-se aprender sobre os sinais e sintomas da infecção, consequências e métodos de transmissão. Como se trata de uma infecção sexualmente transmissível o uso de preservativo é recomendado. A mulher, com idade entre 25 e os 65 anos, deve realizar regularmente um exame ginecológico e fazer a colpocitologia e/ou o teste de HPV-DNA, mesmo que tenha feito a vacina. Na vigilância ginecológica deve-se discutir com o médico o rastreio de situações a que possa ter estado exposta. Inicialmente, o rastreio deve ser feito uma vez por ano, depois de dois

resultados normais seguidos no exame citológico, deve-se fazer o rastreio de três em três anos. O rastreio do carcinoma do colo do útero foi concebido para detectar células do colo do útero anormais nas suas fases precoces, pois é nesse momento que essas são facilmente removidas, evitando-se assim que evoluam para cancro do colo do útero. [20,33]

## **7.1 Vacinação**

Como já foi falado o HPV possui uma proteína principal, da cápside viral chamada L1, que tem a capacidade de se auto-estruturar em partículas do tipo viral e ser expressa em células eucarióticas. O HPV fica localizado no epitélio e assim tem o mínimo de contacto com o sistema imunitário do hospedeiro, e em geral a resposta imunitária é baixa e transitória. A descoberta da vacina contra o HPV veio tentar combater esta fraca resposta imunitária.

Segundo o programa nacional de vacinação de 2012, meninas com 13 anos são vacinadas contra a infecção do papiloma humano. O objectivo desta medida é prevenir as infecções por HPV e diminuir a incidência do cancro do colo do útero, que em Portugal mata mais de 300 mulheres por ano. [20,21]

Espera-se que as vacinas contra o HPV venham a ser uma forma custo-efectiva de reduzir as infecções anogenitais por HPV, a incidência de cancro cervical e as infecções recorrentes pelo vírus. A vacina tetravalente contra o HPV foi aprovada nos EUA em 2006 e ficou disponível em Portugal em 2007. É uma vacina recombinante não-infecciosa produzida em leveduras, contendo partículas semelhantes ao vírus, composta por proteínas L1 do HPV. A vacina contém partículas derivadas do HPV tipos 6, 11, 16 e 18, sendo eficaz na prevenção de infecções persistentes pelos 4 tipos de HPV e no desenvolvimento de lesões genitais pré-cancerosas genitais ligadas ao HPV. Contudo, mostra-se menos eficaz quando a infecção pelo HPV já está estabelecida [40]. Adolescentes e adultos jovens são a população alvo inicial para vacinação. Uma vez que a proteína L2 contém mais epitopos reactivos cruzados, uma vacina baseada nesta proteína poderia proteger contra um número ainda maior de serotipos de HPV.[25]

Não se sabe a duração da imunidade conferida por esta vacina, tratando-se de um fármaco novo, não é possível comprovar a sua persistência para além de cinco anos[40].A vacina não protege contra todos os tipos de HPV que podem provocar cancro, mas previne o cancro do colo do útero associado aos dois tipos de HPV mais frequentes. A toma é feita em 3 doses. A vacina é exclusivamente preventiva e deve ser administrada, de preferência, antes do início da vida sexual activa. A infecção por HPV no homem raramente evolui para doença grave, embora a vacinação no homem possa ser efectuada pontualmente, por indicação médica, não é recomendada.

A vacina é profilática, pois visa impedir a infecção pelo vírus. Funciona estimulando a produção de anticorpos específicos para os tipos de HPV incluídos. A protecção contra a infecção vai depender da quantidade de anticorpos produzidos pelo indivíduo vacinado, a presença destes anticorpos no local da infecção e a sua persistência ao longo do tempo. No entanto, a vacinação não substitui os exames de rotina do colo do útero, pois nenhuma vacina é 100% efectiva e a vacina só irá prevenir para os subtipos de HPV incluídos.[10,23]

As vacinas contra o HPV comercializadas em Portugal são:

- Bivalente (Cervarix) - Contempla os serotipos 16 e 18, responsáveis por cerca de 70% de casos de cancro do colo do útero.
- Tetravalente (Gardasil) - Contempla os serotipos 16, 18, 6 e 11, responsáveis por cerca de 90% das verrugas anogenitais.

O desenvolvimento da vacina profilática contra os tipos oncogénicos do HPV foi um dos avanços científicos mais importantes nos últimos anos. [23]

## **8. Conclusão**

Desde o início dos anos 90, a associação do HPV com o desenvolvimento do carcinoma do colo do útero, verrugas e outras patologias anogenitais têm sido muito fortes, acreditando-se hoje que esteja presente em 99% dos casos de cancro do colo do útero, o mais prevalente e de suma importância. Sendo a infecção pelo HPV tão frequente, tornou-se uma preocupação mundial. Investigadores de todo o mundo têm estudado os melhores métodos de detecção da infecção precoce, sendo este um problema devido à infecção ser assintomática na maioria dos casos, bem como as melhores medidas preventivas e formas de tratamento.

O melhor método de detecção da infecção é a conjugação de várias vertentes, a citologia/histologia e a biologia molecular. A detecção do DNA do vírus em conjunto com o teste de Papanicolau reduz substancialmente o número de casos de cancro e minimiza o número de mulheres com cancro indetectado no rastreio citológico.

Tendo em conta o avanço recente na compreensão da relação entre a infecção persistente pelo HPV e a neoplasia do colo do útero, é necessária uma tecnologia sensível e específica para uma detecção precisa do genótipo do vírus.

A descoberta da vacina contra os tipos mais prevalentes de HPV foi um passo importante, apesar de a vacina ser exclusivamente preventiva e ter de ser administrada, de preferência, antes do início da vida sexual activa. Esta reduz o risco de cancro do colo do útero, mas não o elimina, sendo o mais importante manter um rastreio regular.

## **Referências Bibliográficas**

1. Specter S., Hodinka R., Young S.,(2000)Clinical Virology Manual, 3ªedição Washington, D.C., 2000
2. Lorincz Attila T., Richard Ralph M., Human Papillomavirus DNA Testing as an Adjunct to Cytology in Cervical Screening Programs. Arch Pathol Lab Med, Vol 127, 2003
3. Kroupis C., Vourlidis N., Human papilloma vírus (HPV) molecular diagnostics, ClinChem Lab Med 2011; 49(11):1783-1799
4. Tristão W., Ribeiro R., Oliveira C., Betiol J., Bettini J., Epidemiological study of HPV in oral mucosa through PCR. Brazilian Journal of Otorhinolaryngology 78(4) 2012: 66-70
5. Murray R. P, Rosenthal S. K, Pfaller A. M (2006). Microbiologia Médica. 5ª Edição, Elsevier Editora Ltd.
6. Cardoso J. C., Calonje E., Cutaneous manifestations of human papillomaviruses: A review. ActaDermatoven APA Vol 20, 2011, No3
7. Burd E. M., Human Papillomavirus and Cervical Cancer. Clinical Microbiology Reviews, 2003: 1-7
8. Dimmock N. J., Easton A. J., Leppard K. N. (2007). Introduction to Modern Virology. 6ªEdição, Blackwell Publishing Ltd.
9. Collier, L., Kellam, P. (2011) Human Virology. 4ªEdição, Oxford, J., Oxford University Press
10. Bragueto T., Suzuki L. E., Vacinas contra o Papilomavírus Humano- HPV. NewLab, edição 87, 2008
11. <http://www.roche.pt/sites-tematicos/infocancro/index.cfm/tipos/cancro-do-colo-do-utero/>
12. [http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_protein/5.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_protein/5.html)
13. Chan P. K. S., Picconi M. A., Cheung T. H., Giovannelli L., Park J. S., Laboratory and clinical aspects of human papillomavirus testing. Critical reviews in Clinical laboratory Sciences. 2012; 49(4):117-136
14. Schiffman M., Wentzensen N., Wacholder S., Kinney W., Gage J. C., Castle P. E., Human Papillomavirus Testing in the Prevention of Cervical Cancer. Oxford University PressVol 103, 2011

15. Crum C., Richart R., Clinical Assessment, Therapies, New Tests, and Algorithms. The Papillomaviruses. Springer 2007: 371-382
16. Espy M. J., Uhl J., Sloan L., Buckwalter S., Jones M., Vetter E., Yao J., Wengenack N., Rosenblatt J., Cockerill III F., Smith T., Real-time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. Clinical Microbiology Reviews 2006: 165-256
17. Westra W. H., Detection of Human Papillomavirus in Clinical Samples. OtolaryngolClin N Am 45, 2012: 765-777
18. <http://learn.genetics.utah.edu/content/labs/pcr/>
19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechQPCR.shtml>
20. Alan J. Cann,(2012) Principles of Molecular Virology 5ªedição, Elsevier
21. <http://www.min-saude.pt/portal/conteudos/informacoes+uteis/vacinacao/vacinas.htm>
22. <http://www.min-saude.pt/NR/rdonlyres/43664D00-28C4-4C56-83E3-78C0E8C450D8/28255/4951149511.pdf>
23. Galani E., Christodoulou C., Human papilloma viruses and cancer in the post-vaccine era, Journal Compilation European Society of clinical Microbiology and infectious Diseases, 2009; 15:977-981
24. Park Y., Lee E., Choi J., Jeong S., Kim H., Comparison of the Abbott Real time High-Risk Human Papillomavirus (HPV), Roche Cobas HPV, and Hybrid Capture 2 Assays to Direct Sequencing and Genotyping of HPV DNA. Journal of Clinical Microbiology, 2012: 2359-2365
25. Geo. F. Brooks, Karen C. Carroll, Janet S. Butel, Stephen A. Morse, Timothy A. Mietzner, MicrobiologiaMédica de Jawetz, Melnick e Adelberg, LANGE, 25ª Edição2011
26. Hoffman M., Obermaier I., Tellmann G., Goldenstein C., LightCycler Real Time PCR Systems Application. Germany, Roche Diagnostics,2009
27. Oliveira M., Merlin J., Is the protein p16 a new mark for neoplastic progression in the cervix? RBAC, vol 42, 2010: 181-185
28. Pinto A., Degen M., Villa L., Cibas E. Immunomarkers in Gynecologic Cytology: The Search for the Ideal BiomolecularPapanicolaouTest.ActaCytologica 2012: 109-121
29. <http://www.iporto.min-saude.pt/InfoUtente/hpv.htm>

30. Nathanson, Neal. (2008) *Viral Pathogenesis and Immunity*. 2ª edição, Elsevier Ltd.
31. Halfon P., Benmoura D., Agostini A., Khiri H., Martineau A., Penaranda G., Blanc B., Relevance of HPV mRNA detection in population of ASCUS plus women using the NucliSENSEasyQ HPV assay. *Journal of Clinical Virology*, 2010: 177-181
32. <http://www.ipolisboa.min-saude.pt/Default.aspx?PageId=140>
33. [www.ecca.info](http://www.ecca.info)
34. [www.hpv.com.pt](http://www.hpv.com.pt)
35. Gravitt, Patti E., The known unknowns of HPV natural history. *The journal of clinical investigation*, vol 121, 2011
36. Miller D., Puricelli M., Stack M., Virology and pathogenesis of HPV (human papillomavirus)- associated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *The Authors Journal compilation, Biochemical Society*, 2012: 339-353
37. Rama C., Martins C., Dechain S., Oliveira E., Aldrighi J., Detecção sorológica de anti-HPV 16 e 18 e sua associação com os achados do Papanicolaou em adolescentes e mulheres jovens. *RevAssocMedBras*, 2006: 43-7
38. Lehoux M., D'Abramo C. M., Archambault J., Molecular Mechanisms of Human Papillomavirus- Induced Carcinogenesis. *Public Health Genomics*, 2009:268-280
39. Helen S. Bell, Kevin M. Ryan, Intracellular signaling and cancer: complex pathways lead to multiple targets. *European Journal of Cancer*, vol 41, 2005: 206-215
40. D'Souza G., Dempsey A., The role of HPV in head and neck cancer and review of the HPV vaccine. *Preventive Medicine*, 53 (suppl 1), 2011: S5-S11