

A INDICAÇÃO DE CAPTURA DE HÍBRIDOS II E DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE NO DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR HPV.

THE INDICATION OF HYBRID CAPTURE II AND POLYMERASE CHAIN REACTION IN DIAGNOSIS OF HPV INFECTION.

Larissa Garcia Cabral^{a*}, Ana Marina Reis Bedê Barbosa^a.

^a Faculdades Metropolitanas Unidas (FMU), Avenida Santo Amaro, 1239. São Paulo.

RESUMO

O Papiloma Vírus Humano (HPV) é um vírus de DNA de fita dupla circular e está presente em aproximadamente 98% das lesões associadas ao câncer cervical. O diagnóstico da infecção viral pode ser realizado por técnicas moleculares contemporâneas como a Captura Híbrida II (CHII) e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). O objetivo deste trabalho foi avaliar a indicação da PCR e CHII no diagnóstico do HPV no colo uterino. Os dados da literatura revelaram que a PCR é a técnica mais sensível, porém, devido ao custo elevado é pouco utilizada para fins clínicos, diferentemente da CHII, que possui sensibilidade e custo inferiores e tem sido eleita como controle da eficácia da vacina contra o HPV.

Palavras-chave: Papiloma Vírus Humano, neoplasia cervical, diagnóstico molecular, PCR e CHII.

ABSTRACT

The Human papillomavirus (HPV) is a virus double-stranded circular DNA and is present in approximately 98% of lesions associated with cervical cancer. The diagnosis of viral infection can be performed by contemporary molecular techniques such as Hybrid Capture II (HCII) and Polymerase Chain Reaction (PCR). The objective of this study was to evaluate the indication of HCII and PCR in the diagnosis of HPV in the cervix. Literature data obtained so far revealed that the PCR is the most sensitive technique, however, due to the high cost is not widely used for clinical purposes, unlike HCII, which has sensitivity and lower cost and has been elected as control effectiveness the HPV vaccine.

Keywords: Human Papiloma Virus, cervical neoplasm, molecular diagnosis, PCR and HCII.

INTRODUÇÃO

A segunda neoplasia mais frequente em mulheres é o câncer de colo uterino, que para se desenvolver possui como condição necessária a infecção pelo Papiloma vírus humano (HPV).¹ A cada ano são estimados cerca de 500.000 novos casos da doença e aproximadamente 79% ocorrem em países em desenvolvimento. No Brasil, a região norte apresenta os maiores números de casos registrados.²

As lesões precursoras do câncer podem ser classificadas pelo método histopatológico, de acordo com os graus de evolução, em Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) I, II e III, sendo que a primeira relaciona-se à lesões de baixo grau e a segunda e a terceira à lesões de alto grau no diagnóstico citológico. Todas essas lesões são passíveis de cura em até 100% dos casos quando tratadas precocemente. Se o rastreamento for realizado de forma correta, o mesmo apresenta uma cobertura de 80% para o câncer invasor e se as lesões iniciais forem tratadas, reduz-se o aparecimento de câncer cervical em até 90%.³

Mulheres que se submeteram a várias gestações, tabagismo, a utilização de contraceptivos orais e outras doenças sexualmente transmissíveis, como clamídia e HIV, associados à infecção pelo HPV aumentam consideravelmente as chances de se desenvolver NIC. O uso do tabaco reduz a quantidade e a funcionalidade das células de Langherans, que realizam a defesa do tecido epitelial, além de conter mais de trezentas substâncias com alto poder cancerígeno. Todavia, o uso de anticoncepcionais orais propicia a liberação de uso de preservativo, em alguns casos, uma vez que por algumas pessoas só são utilizados para evitar a concepção de filhos, levando à maior contaminação por doenças sexualmente transmissíveis como o HPV.³

Levando em consideração a alta incidência do câncer do colo uterino e sua íntima associação com a infecção por HPV, torna-se de suma importância o esclarecimento da indicação do uso de técnicas de Biologia Molecular contemporâneas, Reação em cadeia da polimerase (PCR) e Captura Híbrida II (CHII), no diagnóstico deste vírus.

REVISÃO DA LITERATURA

Os papilomas vírus são espécies- específicos, ou seja, são específicos de cada hospedeiro e não causam lesões em outras espécies. Esses vírus pertencem a um grupo de DNA vírus da família Papoviridae, que contêm mais de 16 gêneros, e se caracterizam por apresentarem cerca de 55 nm, não apresentarem envelope e possuírem um capsídeo. Dentre esses gêneros destacam-se o *Alphapapillomavírus*, *Betapapillomavírus*, *Gamapapillomavírus*, *Mupapillomavírus* e *Nupapillomavírus*, que infectam humanos, e alguns outros que infectam somente animais.⁴

Cada gênero é composto por membros que ocasionam infecções em locais específicos do hospedeiro, como por exemplo, os membros do *Alphapapillomavírus* que infectam mucosas orais e anogenitais dos primatas e os *Gamapapillomavírus* que formam lesões cutâneas nos humanos. O genoma destes vírus contém aproximadamente 7.500 a 8.000 pares de base (pb) e peso molecular de $5,2 \times 10^6$ daltons e é composto por uma cadeia dupla circular que é dividida em várias regiões, nomeadas em Open Reading Frame (ORF) ou fase aberta de leitura.⁴

Na camada basal do epitélio estratificado escamoso repousam os queratinócitos, as principais células hospedeiras do Papiloma vírus, que têm como ação controlar a expressão e replicação viral. Essa expressão nos queratinócitos indiferenciados ou medianamente diferenciados acarreta na expressão de seis proteínas não estruturais (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) e duas outras proteínas estruturais, L1 e L2.⁵

Ao redor das partículas virais, também denominadas de virions, está presente uma cápsula externa expressa pelas sequências L1 e L2. Essas sequências fazem parte da região tardia do genoma viral, que apresenta ainda mais duas regiões denominadas de Região regulatória contracorrente (RRCC) e região precoce.⁶

A RRCC é também chamada de região longa de controle (RLC) e contém os nucleotídeos necessários para o controle da replicação viral e responsáveis também pela expressão genômica do mesmo. Já a região precoce é separada pelas sequências E1 e E2 cuja função está intimamente ligada a replicação e transcrição viral, controlando-as, além de inibir a transcrição de E6 e E7, proteínas que resultam em alterações no genoma celular do hospedeiro.⁶

A proteína E5 realiza a modulação da divisão celular e possui papel mutagênico através da estimulação mitogênica, atuando em receptores do fator de crescimento, interferindo em sua ação. Outra proteína importante é a E4 que participa da liberação de novas partículas dos vírus, desestruturando os filamentos de citoqueratina presentes no epitélio escamoso.⁶

Dos 200 tipos de HPV já identificados cerca de 40 infectam o trato genital inferior, sendo 20 associados às neoplasias do colo do útero.⁷ O genoma viral é encontrado em 98% dos casos de câncer de colo uterino, sendo a principal causa desta infecção o contato sexual.⁸

O vírus pode ser classificado em duas classes de acordo com o poder oncogênico, de baixo risco (ou que não possuem risco oncogênico) e de alto risco. Os tipos de HPV são oriundos de pequenas variações genômicas virais.⁹

O aparecimento de lesões benignas como verrugas planas ou elevadas e NIC estão associadas a infecção pelos tipos virais considerados de baixo risco: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 e 81. No entanto, aqueles relacionados ao surgimento de lesões de alto grau como NIC II e III e câncer são considerados tipos de alto risco, sendo estes, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 e 82. Pesquisas atuais demonstram que os tipos 16 e 18 têm a probabilidade de possuírem poder carcinogênico maior que os demais.¹⁰

A infecção pode se apresentar de três formas distintas no corpo humano denominadas de latente (onde paciente não apresentará verrugas visíveis e tão pouco lesões microscópicas), subclínica (onde não ocorrem sintomas clínicos, porém existem alterações sutis detectáveis) e clínica, na qual após realizados os exames clínicos notam-se a presença de lesões. Quando esta desencadeia em sintomas clínicos, a detecção viral é realizada por meio de procedimentos como colposcopia e biópsia, no entanto, se após a infecção o vírus permanecer na forma latente este pode ser detectado por métodos de biologia molecular.⁸

O presente artigo tem como objetivo avaliar a utilização de CHII e PCR no diagnóstico de infecção por HPV no colo uterino.

METODOLOGIA

Levantamento de artigos nas bases de dados: SCIELO, PUBMED, LILACS entre outras, e consulta em livros.

Descrição e indicação da captura híbrida II

A técnica em microplaca elaborada pela DIGENE® visa, por meio da utilização de sondas marcadas e específicas de RNA complementares às sequências do DNA viral, detectar por amplificação de sinal por quimioluminescência a presença dos espécimes virais em amostras cervicovaginais. A intensidade de luz gerada é quantificada e expressa em unidade relativa de luz.²

Os espécimes que contêm o DNA podem ser submetidos à hibridização com dois tipos de sondas de RNA, utilizadas para o rastreamento de 18 tipos de HPV diferentes. O primeiro grupo de sondas consiste em cinco tipos de HPV não-oncogênicos e o segundo em 13 tipos de HPV compreendendo os intermediários e os de alto risco.^{1, 2, 7, 10}

Os híbridos formados são capturados a partir da utilização de microplaca com anticorpos específicos para os mesmos. Os híbridos imobilizados serão colocados em contato com a fosfatase alcalina conjugada à anticorpos específicos e a detecção será realizada por meio de um substrato quimioluminescente, demonstrada na figura 1. A intensidade de luz formada é equivalente à presença ou ausência de DNA viral na amostra observada.¹

A CH II é destinada à auxiliar no diagnóstico de infecções oriundas do HPV, para diferenciação entre HPV de alto e baixo riscos e na avaliação em caso de desenvolvimento de neoplasia cervical. Além de determinar a realização de colposcopia para pacientes com resultados citológicos não conclusivos.²

De acordo com Rodrigues *et al.*¹⁰, essa técnica é mais demorada e não permite determinar o tipo viral específico causador da infecção e a presença de vírus tem a probabilidade de não ser detectada no início da infecção por possuir uma sensibilidade inadequada (em torno de 5.000 cópias/mL), permitindo a detecção de somente alguns HPVs oncogênicos. Dentre suas vantagens destacam-se o menor custo comparada as outras técnicas disponíveis e sua utilização para o acompanhamento da eficácia da vacina contra o vírus.

Descrição e indicação da Reação em Cadeia da Polimerase

Nos anos 80 foi desenvolvida por Kary Mullis a PCR convencional (PCRc) que se baseia no uso de *primers* (iniciadores) específicos para sequências de nucleotídeos presentes no DNA alvo, era possível amplificar regiões, mesmo possuindo quantidades ínfimas da amostra analisada, resultando em milhões de cópias.¹¹

Essa técnica, quando utilizada para o rastreamento de HPV, permite a escolha de amostragem a partir de esfregaços ou escovados do orifício externo do colo

uterino, bem como de lavados e de tecido retirado por biópsia, podendo ser mantido congelado ou fixado em formol e incorporados em parafina.⁶ A parafina é utilizada após a fixação do tecido analisado com a finalidade de manter integras as condições do mesmo, e permitindo a visualização dos cortes histológicos em outras ocasiões sem a necessidade de realizar a coleta do material novamente.

Segundo Mullis¹¹, para que haja a amplificação do DNA viral, é necessário que ocorra a formação de uma mistura utilizando cloreto de magnésio, o buffer, a TAQ DNA polimerase, o trifosfato de desoxinucleosídeo, os *primers*, e o DNA template ou molde.

A PCR fundamenta-se em três etapas descritas como desnaturação, anelamento ou hibridização e extensão, ocorrendo em aproximadamente 35 à 40 ciclos e sua amplificação é detectada através da aplicação de brometo de etídeo, seguida de eletroforese em gel.^{6,12} A tipagem viral é realizada mediante o uso de *primers* específicos e a detecção é feita através de sistemas radioativos ou enzimáticos.⁶

Para detecção do HPV os *primers* utilizados são complementares as regiões E6 e E7 dos vários subtipos de HPV e também das regiões conservadas L1e L2. A PCR é o método mais sensível que existe atualmente e permite a detecção de 10 a 100 moléculas de DNA viral por amostra, porém é pouco utilizada no meio clínico devido ao alto custo para sua realização.²

Segundo Novais e Alves¹² deste método derivaram outros com o mesmo princípio como a PCR real time (PCR-RT ou PCR quantitativa), também utilizada para o rastreamento do HPV. A PCR quantitativa é um método completamente automatizado, mais seguro que o PCR convencional por não sofrer influências do meio externo e quantificar de forma exata e com maior reprodutibilidade os espécimes virais, através de fluorescência emitida pela reação com compostos, apresentando alta sensibilidade. As fases da PCR Real time são as mesmas da PCR convencional, porém, são adicionados ao tubo corantes específicos como o SYBR GREEN ou SONDA TAQ MAN, sendo esta última mais eficiente devido corar somente os produtos amplificados por possuir em sua composição, além da sequência interna do produto amplificado, um fluoróforo (ou Reporter) e um quencher. No momento da polimerização da TAQ DNA ocorre a quebra da fita separando o quencher e o fluoróforo, emitindo luminescência (figura 2).

Assim como a Captura híbrida, este método está voltado para a prevenção do desenvolvimento de neoplasias e para controle de pacientes com a infecção por HPV de alto risco.⁷

CONCLUSÃO

Os dados obtidos permitem verificar que a CHII é uma técnica de baixo custo e possui sensibilidade inferior comparada à PCRc e a PCR-RT, utilizadas para o rastreamento do HPV em amostras citológicas da cérvix uterina, características estas que explicam porquê este método é considerado padrão ouro no país. No entanto, a PCRc quando comparada com a CHII apresenta custo e sensibilidade superiores, podendo amplificar pequenas quantidades dos espécimes, além de sua realização ser mais rápida.

Ao comparar a PCRc com a PCR-RT, pode-se notar que esta última é mais eficiente por ser realizada em ambiente fechado e automatizado, resultando em quantidades maiores de cópias do vírus.

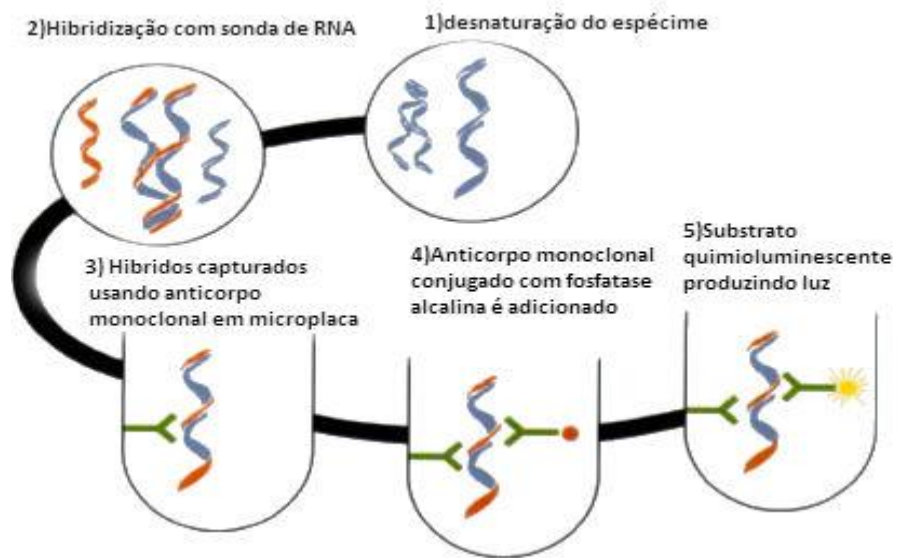


Figura 1. Esquema das reações decorrentes do Sistema de Captura Híbrida II. Adaptado de: www.papillomavirus.cz/eng/diagnosis_kits_hybrid.html

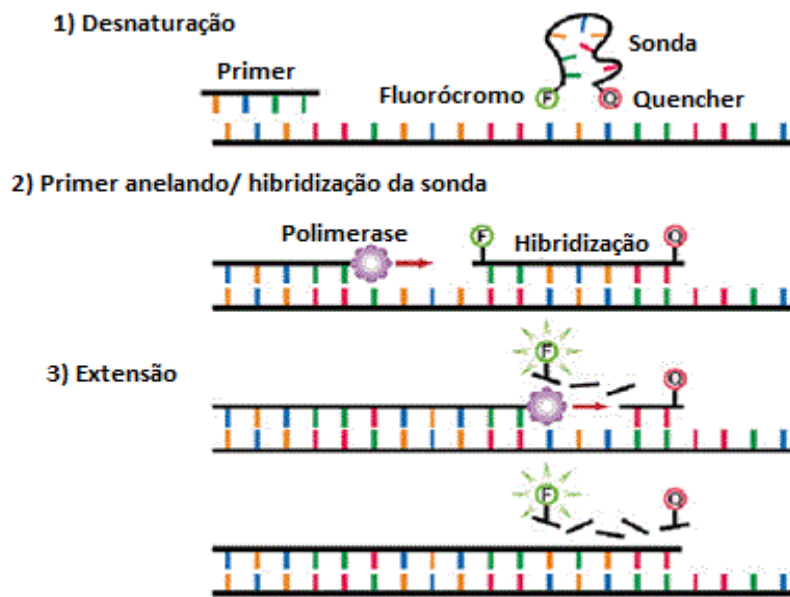


Figura 2. Esquema das reações e fases da PCR Real time. Adaptado de: www.foodsafetywatch.org

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Raposo LM, Velasque L, Luz PM, Friedman RK, Cytryn A, De Andrade ACV, et al. Desempenho do exame citológico e da captura híbrida II no rastreamento de lesões intraepiteliais escamosas de alto grau em mulheres HIV+. *Cad. Saúde Pública*. 2011; 27;7:1281-1291.
2. Wolschick NM, Consolaro MEL, Suzuki LE, Boer CG. Câncer do colo do útero: tecnologias emergentes no diagnóstico, tratamento e prevenção da doença. *R.B.A.C.* 2007; 39;2:123-129.
3. De Melo SCCS, Prates L, Carvalho MDB, Marcon SS, Pelloso SM. Alterações citopatológicas e fatores de risco para a ocorrência do cancer de colo uterino. *Rev. Gaúcha Enferm.* 2009; 30;4:602-608.
4. Trabulsi LR, Alterthum F. *Microbiologia. Papilomavírus*. São Paulo: Atheneu, 2008: 663-665. ISBN:978-85-7379-981-1.
5. Zheng Z, Baker CC. Papillomavírus genome structure, expression, and post transcriptional regulation. *National Institutes of Health*. 2006;11:2286-2302.
6. J.Mortoza G. *Patologia cervical da teoria à prática clínica. Infecção pelo Papiloma Vírus Humano*. Rio de Janeiro: Med book, 2006: 133-139. ISBN:85-99977-01-6.
7. Bringhenti MEZ, Dozza TG, Dozza TG, Martins TR, Bazzo ML. Prevenção do câncer cervical: Associação da citologia oncótica a novas técnicas de biologia molecular na detecção do Papiloma Vírus Humano (HPV). *J. Bras. Doenças. Sex. Transm.* 2010;.22;3:135-140.

8. Xavier SD, F. Bussoloti I, De Carvalho JM, Framil VMDS, Castro TMPPG. Frequência de Aparecimento de Papilomavírus Humano(HPV) na mucosa oral de homens com HPV anogenital confirmado por biologia molecular. Arq. Int. Otorrinolaringol. 2007;11;1:36-44.
9. Castro TMPPG, F. Bussoloti I, Nascimento VX, Xavier,SD. Detecção de HPV na mucosa oral e genital pela técnica de PCR em mulheres com diagnóstico histopatológico positivo para HPV genital. Braz. J. Otorhinolaryngol. 2009;75;2:167-171.
10. Rodrigues AD, Cantarelli VV, Frantz MA, Pilger DA, Pereira FDS. Comparação das técnicas de captura de híbridos e PCR para a detecção de HPV em amostras clínicas. J. Bras. Patol. Med. Lab. 2009;45;6: 457-462.
11. Mullis KB. TARGET Amplification for dna analysis by the polymerase chain reaction. Ann. Biol. Clin. 1990;48;8:579-582.
12. Novais CM, Alves MP. PCR em tempo real. Rev. biot. Ciência e desenv. 2004;33.