

A IMPORTÂNCIA DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE COMO AUXÍLIO NO DIAGNÓSTICO PARA O PAPILOMAVÍRUS HUMANO

Natalia Diniz Nunes Pazos (1); Elisangela da Costa Farias (1); Eduardo Carlos de Almeida (2); Milena Saavedra Lopes do Amaral (3)

(Faculdade Maurício de Nassau – João Pessoa/PB. natalia_dnpazos@hotmail.com, elis_angela.farias@outlook.com; edu_ebalfa25@outlook.com; msaavedralopes@yahoo.com.br.)

Resumo: O Papiloma Vírus Humano (HPV) é o principal agente causador do câncer de colo uterino e é o que mais afeta a população feminina. O teste do Papanicolau é o mais utilizado na detecção de alterações no colo do útero, porém, este exame não é sensível o suficiente na identificação dos tipos e quantidade de vírus do HPV presente nas células do hospedeiro. O objetivo desse artigo é enfatizar a importância da utilização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) no diagnóstico das lesões intra-epiteliais causadas pelo HPV por meio de uma revisão bibliográfica. Ao longo do estudo a técnica de PCR, apresentou-se como a mais eficaz para diferenciações das lesões e do agente causador do carcinoma cervical, por sua alta sensibilidade, especificidade e velocidade na análise, além de realizar suas funções a partir de uma pequena amostra disponível.

Palavras-chave: Papiloma Vírus Humano, Reação em Cadeia da Polimerase, câncer de colo uterino, Brasil.

Introdução

O HPV (papilomavírus humano) é uma doença sexualmente transmissível e pertence à família Papovaviridae que possui afinidade pelo tecido epitelial e mucoso, podendo atingir de forma assintomática e transitória regredindo na maior parte dos casos, ou persistindo causando lesões precursoras que se não forem devidamente diagnosticadas e tratadas podem progredir para o câncer ¹. No Brasil o câncer de colo de útero ocupa a terceira posição geral, apresenta-se como a neoplasia mais prevalente na população feminina². Segundo o Instituto Nacional de Câncer (Inca), 50% a 80% das mulheres sexualmente ativas serão infectadas por ou mais tipos de HPV em algum momento da sua vida². Os tipos de HPV são classificados de acordo com seu potencial cancerígeno, aproximadamente 40 tipos atingem o trato genital, onde pelo menos 20 estão associados ao câncer de colo do útero³. Com o progresso da biologia molecular, a PCR (reação em cadeia da polimerase) foi evidenciada como o método mais sensível para identificação desses vírus, esta técnica consiste na amplificação de fragmentos de DNA em um bilhão de vezes dentro de apenas algumas horas⁴. O objetivo desse artigo é enfatizar a importância da utilização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) no diagnóstico das lesões intra-epiteliais causadas pelo HPV por meio de uma revisão bibliográfica.

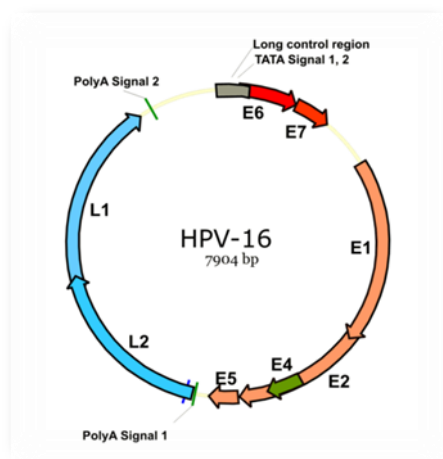
Metodologia

Foi realizada uma revisão bibliográfica levando em conta estudos entre os anos de 2006 a 2016. As publicações analisadas foram retiradas das bases Biblioteca Virtual em Saúde (BIREME), Scientific Electronic Library Online (SCIELO), Literatura Latino-americana e do Caribe em Ciências da Saúde (Lilacs) e Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (MEDLINE). Em seguida foram utilizados critérios para a escolha de artigos e sites, sendo selecionados aqueles que estavam disponíveis na língua portuguesa, que estivessem relacionados estudos sobre o vírus HPV utilizando a técnica de PCR para identificar seus tipos. Entre os termos usados se destacaram, “Papilomavirus humano”, “câncer de colo de útero”, “reação em cadeia da polimerase” e “Brasil”.

Resultados

A espécie do papiloma humano é composta por vírus não-envelopados, possuem um genoma de DNA de fita dupla circular possuindo pelo menos seis genes que se apresentam precocemente e dois genes que se expressam tardiamente, sendo nomeados respectivamente de E (*Early*) e L (*Late*) e com 72 capsômeros de simetria icosaédrica ¹⁻⁵. (Figura 1)

Figura 1 - (HPV16) Genoma circular de dupla-fita, mostrando organização e localização dos genes e a região LCR.



Fonte: <https://www.onclive.com/publications/oncology-live/2015/august-2015>

Os genes E que correspondem a E1 a E7 são expressos imediatamente, após a infecção e codificam as proteínas envolvidas na indução e regulação da síntese do DNA viral ¹⁻⁵ (Tabela

1). A região controladora longa, denominada *Long Control Region* (LCR) é formada pelos genes L1 e L2, que codificam as proteínas do capsídeo¹⁻⁵. (Tabela 1)

Tabela 1 – Genes do vírus HPV e suas respectivas funções.

Gene precoce	Função	Gene tardio	Função
E1	Replicação do DNA Viral	L1	Codifica proteína principal do capsídeo
E2	Controle da transcrição e replicação	L2	Codifica proteína secundária do capsídeo
E4	Maturação do vírus e alteração da matriz intracelular		
E5,E6, E7	Estímulo da proliferação e transformação celular		

Fonte: Adaptado de NAKAGAWA, J.T.T et al. (2010, p. 308)

Como precursores do câncer podemos classificá-los como HPV de baixo risco (6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 42, 43, 44,45, 51, 52, 74) e alto risco (16, 18, 6, 11, 31, 34, 33, 35, 39, 42,44, 45, 51, 52, 56, 58, 66). Visto que cerca de 70% são causados pelo HPV tipos 16 ou 18³⁻⁵⁻⁹. As proteínas E6 e E7 dos HPV 16 e 18 formam complexos com as proteínas anti-oncogênicas p53 e p105-Rb e essas interações contribuem pelo menos em parte, no poder de transformação desses dois vírus⁵⁻⁶. O HPV adentra nas células do colo uterino aproveitando uma eventual fissura, a qual coloca o vírus em contato com o tecido epitelial³⁻⁶. O vírus interage rapidamente com a célula e libera o seu DNA, o qual atinge o núcleo, dando início a sua reprodução⁴. Em condições normais, onde o vírus do HPV mantém seu DNA em formato de anel fechado não existe risco imediato ao hospedeiro, entretanto se este sofrer mutação na sua configuração, seu material genético se incorpora ao DNA da célula infectada, levando a neoplasias no colo uterino⁴⁻⁶.

Dependendo do trecho que ocorre a junção do DNA viral as células do hospedeiro começam a produzir E6 e E7 que saem do núcleo e inibem a proteína p53, que é um gene regulador de uma extensa rede que comanda a integridade do genoma frente a danos celulares, oncoproteínas virais e ativação de oncogenes celulares⁷ e a p105-Rb previne a produção excessiva de células impedindo a continuação do ciclo celular até que a célula esteja pronta para se dividir⁷⁻⁸⁻¹⁸. Apesar das infecções por HPV serem transitórias e combatidas na maioria das vezes pelo sistema imunológico, 35% das mulheres sexualmente ativas são portadoras do vírus, sendo que só 1% desenvolverá o câncer de colo de útero². A reação em cadeia da polimerase é uma técnica de síntese de ácidos nucleicos utilizada principalmente quando a quantidade de DNA disponível é reduzida, esta consegue identificar células infectadas mesmo que com pequenos níveis virais, amplificando fragmentos de uma região específica do DNA *in vitro*, sem o uso de células¹⁰. A PCR em tempo Real é uma variação de PCR, mostrando maior reprodutibilidade, sensibilidade e precisão, além de reproduzir resultados quantitativos, enquanto a PCR convencional reproduz resultados qualitativos¹¹. Os primers se ligam na parte de interesse, ou seja, ao DNA alvo, onde novas fitas de DNA serão sintetizadas pela Taq polimerase, sempre pela extremidade 3' OH livre do primer. Esses primers é quem vão definir a sequência a ser replicada ocorrendo à amplificação de bilhões de cópias do DNA escolhido¹⁰⁻¹¹. A técnica de PCR permite diagnosticar se o tipo de HPV é de baixo ou alto grau, dessa forma representa o método mais sensível disponível na detecção dos tipos virais⁵⁻¹⁰. É importante ressaltar que a sensibilidade e especificidade da PCR sofre variações dependendo dos primers, do tamanho da amostra, desempenho da Taq polimerase utilizada no procedimento e da quantidade de DNA do HPV já amplificado¹⁰⁻¹¹. Entre mil células a PCR consegue captar uma partícula viral, enquanto outros métodos identificam uma partícula viral a cada 10 células. Os primers usados conseguem amplificar uma parte da região mais conservadora do genoma que corresponde ao gene L1, onde é possível identificar diferentes tipos de HPV⁵⁻¹⁰⁻¹¹.

Discussão

O papiloma vírus humano é um dos principais causadores do câncer de colo uterino³⁻¹⁵. O exame que detecta lesões intra-uterinas é o Papanicolau, onde é oferecido de forma gratuita pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e o mais realizado no caráter preventivo. Seu objetivo consiste em reconhecer alterações celulares das mostras colhidas na parte externa

(ectocérvice) e interna (endocervice) do colo e no fundo do saco posterior da vagina¹⁵. Através da associação entre o HPV oncogênico e lesões intra-epiteliais escamosas, a PCR tem sido realizada em diversos estudos para garantir a diferenciação das lesões uterinas com material genético viral para uma maior precisão nos resultados e no diagnóstico para quantificação dos diversos tipos virais¹¹⁻¹⁵⁻¹⁶. O citológico necessita de uma coleta com quantidade suficiente de células para seu diagnóstico final, porém, ainda que esse exame seja feito com excelência, não é possível que os tipos de HPV sejam identificados nas lesões uterinas¹⁵. Ao contrário do exame Papanicolau, a PCR apesar de apresentar um alto custo não sustentado pelo SUS consegue proporcionar uma análise genética utilizando pouco material, onde essa pequena amostra após ser amplificada, possibilita saber se há junção entre o DNA viral do DNA do hospedeiro, dessa forma, complementando o diagnóstico citológico¹⁶. Durante o estudo de Kenne et al¹⁵, foi identificado a presença do DNA do HPV na população estudada e dentre estas, uma paciente apresentou o HPV 16 de alto risco oncogênico, encontrado por meio do citológico e confirmado pela PCR. Já em outro estudo feito por Angeli et al¹⁷, mostrou a viabilidade em utilizar outro material para identificação do vírus de HPV, através da técnica da PCR como coadjuvante no resultado, onde foram recolhidas 70 amostras de urina, e em 9 amostras foi possível identificar 12,9% de compatibilidade para DNA de HPV. Segundo Oliveira et al¹⁴, foi enfatizada a importância da idade das pacientes e da gravidez em relação a infecções por HPV, durante o seu estudo encontrou por meio dos exames citológicos que dentre 153 pacientes, cerca de 18,3% (28 pacientes) possuíam DNA viral do HPV. Em seguida a técnica de PCR foi utilizada para uma precisão dos mesmos. No entanto Santos e Fonseca¹⁹, ao compararem qual seria a melhor técnica para análise do genoma viral, entre a captura híbrida e a técnica de PCR, a mais indicada para o diagnóstico do HPV foi a reação em cadeia da polimerase, por ser um procedimento sensível, específico e rápido para análise. Em todos os estudos, foi possível comprovar a eficácia do método da PCR, alguns enfatizaram sua sensibilidade, outros seu custo benefício ou até mesmo a diversidade de amostras para o procedimento, porém em nenhum dos casos a PCR se mostrou irrelevante no diagnóstico final.

Conclusão

A PCR ainda mantém um caráter restrito nas unidades de saúde e hospitais públicos para o diagnóstico clínico, no entanto, essa técnica se mostra muito sensível e superior aos resultados

citológicos, sendo útil na detecção dos tipos virais do HPV. Na revisão de literatura foi possível notar total êxito desse método molecular, tendo em vista que, quando se tem a identificação desse vírus, ou seja, sabendo seu grau oncogênico, essas pacientes poderão ter um melhor acompanhamento e eficácia no tratamento, já que quanto mais rápido for descoberto o subtipo do vírus, maior é a chance do controle, e conseqüentemente a não evolução ao carcinoma cervical.

Referências

1. ROTELI-MARTINS, C. M. et al. Associação entre idade ao início da atividade sexual e subseqüente infecção por papilomavírus humano: resultados de um programa de rastreamento brasileiro. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29, n.11, p. 580-587, Mai./Set. 2007.
2. INCA. Incidência do câncer no Brasil – estimativa 2014. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/2013/inca_ministerio_saude_apresentam_estimativas_cancer. Acesso em: 09 de Out de 2017.
3. FERRAZ, C. L.; SANTOS, R.B.A.; DISCACCIATI, G.M. Ciclo celular, HPV e evolução da neoplasia intraepitelial cervical: seleção de marcadores biológicos. Disponível em: https://www.unip.br/comunicacao/publicacoes/ics/edicoes/2012/02_abr-jun/V30_n2_2012_p107-111.pdf. Acesso em: 14 de Out de 2017
4. SANTOS, C.G.S. O diagnóstico do câncer cérvico vaginal. Universidade Paulista, 2011.
5. NAKAGAWA, J.T.T.; SCHIRMER, J.; BARBIERI, M. Vírus HPV e câncer de colo de útero. **Revista Brasileira de Enfermagem**, Brasília, vol 63, n.2, Mar/ Abril 2010.
6. OLIVEIRA, M.P.; PASSOS, D.A.C.; PEREIRA, C.M.; ALVES, V.F. A associação entre o vírus HPV e o desenvolvimento do carcinoma. **Revista de Biotecnologia e Ciência**, v. 2, n. 1, p. 83-92, Set. / Dez. 2012.

7. PIMENTA, C.S.V. P53 e o câncer: Revisão de Literatura, Universidade Federal de Goiás, 2012.
8. ROSA, M. I. et al. Papilomavírus humano e neoplasia cervical. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, n. 5, p. 953-964, maio/2009.
9. PITTA, D.R. et al. Prevalência dos HPV 16,18,45 e 31 em mulheres com lesão cervical. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.32, n.7, p. 315-320, Jun/2010.
10. MAGALHÃES, A. H. et al. Papiloma Vírus Humano: As técnicas moleculares: Captura híbrida e reação em cadeia da polimerase. Disponível em: <http://faculdadeguanambi.edu.br/PAPILOMAVÍRUS-HUMANO-AS-TÉCNICAS-MOLECULARES-CAPTURA-HÍBRIDA-E-REAÇÃO-EM-CADEIA-DAPOLIMERASE.pdf>. Acesso em: 10 de Out de 2017
11. CARMO, S.F.E.; FIORINI, A. Principais técnicas moleculares para detecção do Papiloma Vírus Humano. **Revista de Saúde e Biologia**, Campo Mourão, v. 2, n. 1, p. 29-31, jan/jun 2007.
12. CARMO, S.F.E.; FIORINI, A. Principais técnicas moleculares para detecção do Papiloma Vírus Humano. **Revista de Saúde e Biologia**, Campo Mourão, v. 2, n. 1, p. 29-31, jan/jun 2007.
13. RAMA, C. et al. Rastreamento anterior para câncer de colo uterino em mulheres com alterações citológicas ou histológicas. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 42, n.3, Jun/2008
14. OLIVEIRA, R.G. et al. Fatores de risco e prevalência da infecção pelo HPV em pacientes de Unidades Básicas de Saúde e de um Hospital Universitário do Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.35, n.5, p.226-232, Mar/ Maio 2013.

15. KENNE, E. et al, Diagnóstico molecular de HPV em amostras cérvico-vaginais de mulheres que realizam o papanicolaou. **Revista do Departamento de Educação Física e Saúde e do Mestrado em Promoção da Saúde da Universidade de Santa Cruz do Sul/Unisc**, v. 15, n.4, Out./ Dez. 2014. Disponível em: <http://online.unisc.br/seer/index.php/cinergis>. Acesso em: 13 de Out de 2017.

16. TULIO, S. et al. Relação entre a carga viral de HPV oncogênico determinada pelo método de captura híbrida e o diagnóstico citológico de lesões de alto grau. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.43, n.1, p. 31-35, fev./2007. Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=393541933007>. Acesso em: 11 de Out de 2017

17. ANGELI, S. et al. Detecção de DNA de Papilomavírus Humano (HPV) em mulheres grávidas utilizando a urina. Disponível em: www.periodicos.ulbra.br/index.php/ic/article/view/1696. Acesso em: 10 de Out de 2017.

18. RODRIGUES, F.A.; SOUSA, A.J. Papilomavírus humano: prevenção e diagnóstico. Disponível em: <https://online.unisc.br/seer/index.php/epidemiologia/article/viewFile/6043/4633>. Acesso em: 11 de out de 2017.

19. SANTOS, M. S. F.M.; FONSECA, G.M. Estudo comparativo das técnicas de PCR e captura híbrida para o diagnóstico do HPV: Revisão de Literatura. **Revista eletrônica Atualiza Saúde**, Salvador, v.4, n.4, p.59-65, jul./dez. 2016.