

MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DO HPV NO COLO UTERINO

**Ana Vitoria Silva Barreto¹
Rayane Natielly Freitas da Cruz¹
Vivian Karoline de Almeida Vieira¹**

**Orientador (a): Walquirya Borges Simi²
Coorientador: Eduardo Rodrigues Alves
Junior²**

RESUMO

O colo uterino é o órgão mais acometido pelo hpv, causando lesões que podem desenvolver câncer em mulheres. No Brasil, o câncer de colo uterino é a terceira neoplasia mais comum entre a população feminina. O objetivo é realizar um levantamento sobre as técnicas de detecção do Papilomavírus humano. Trata-se de uma revisão bibliográfica onde serão feitas pesquisas em artigos, com a finalidade de mostrar as técnicas que possuem maior sensibilidade para detecção deste vírus.

Palavras-chave: HPV. Método. Diagnóstico. Técnica.

Alunos(as) Ana Vitoria Silva Barreto, Rayane Natielly Freitas da Cruz, Vivian Karoline de Almeida Vieira do curso de Biomedicina no UNIVAG – Centro Universitário de Várzea Grande.
Professor(a) Walquirya Borges do curso de Biomedicina do UNIVAG – Centro Universitário de Várzea Grande.

1. INTRODUÇÃO

Papilomavírus Humano ou HPV como é popularmente conhecido, pertence à família *papillomaviridae*, esse vírus é de ácido desoxirribonucleico, ou seja, possuem DNA, é uma doença sexualmente transmissível, que infecta pele e mucosas. Existem mais de 150 sorotipos diferentes de HPV. Destes 150 sorotipos 13 são considerados oncogênicos, ou seja, possui maior probabilidade de causar lesões precursoras. Dentre eles, especialmente os vírus 16 e 18 são os maiores causadores de lesões no colo do útero, essas lesões aparecem de forma silenciosa, que se não tratadas de forma adequada evoluem rapidamente para um câncer de colo uterino (QUEIROZ; PESSOA; SOUSA; 2005).

Os citologistas Koss e Melsels, iniciaram os estudos sobre as alterações causadas por este vírus em 1957, através destes estudos eles denominaram as infecções causadas por este vírus de displasias leves, moderadas ou acentuadas. Com o passar dos anos, essas nomenclaturas foram alteradas para NIC I, NIC II, e NIC III (FERRARO, et al; 2011).

Historicamente, a ligação do vírus HPV com o câncer de colo de útero teve início no ano de 1949, quando o patologista George Papanicolaou colocou o exame mais divulgado no mundo para rastrear a doença. Esse exame possibilitou a identificação de mulheres com alterações celulares pré-maligna, dando a possibilidade de observar que quem possuía uma vida sexual ativa, tinha mais probabilidade em desenvolver o câncer no colo uterino (NAKAGAWA; SCHIMER; BARBIERI, 2010)

Com o passar dos anos verificou-se um aumento progressivo na incidência de casos de HPV, o fato de ser assintomático na maioria das vezes é o que corrobora para sua propagação, visto que sem sintomas, não há motivos para procurar um médico especialista. Para o rastreio do Papilomavírus Humano, é indicado o exame de CCO ou papanicolau, esse exame é conhecido como preventivo e tem como objetivo reduzir o alto índice de mortalidade por câncer de colo uterino, vagina e vulva que são ocasionados pelo HPV (ABREU, *et al*; 2018).

Atualmente existem três técnicas, que são mais utilizadas e possuem aplicabilidades clínicas, sendo elas captura híbrida, hibridização *in situ* e reação em cadeia polimerase (PCR) (ADORNO, et al; 2020).

A captura híbrida é a técnica mais utilizada. Esta técnica possui um alto valor preditivo negativo, tem a finalidade apenas de detectar se o HPV é de baixo ou alto grau, não é possível saber qual o sorotipo presente. Este método pode ser realizado através de uma pequena raspagem do muco vaginal do colo do útero, podendo também ser utilizada amostras da vagina ou vulva. Através da secreção oral ou anal também é possível realizar a detecção do vírus (ADORNO, et al; 2020).

Hibridização *in situ*, pode ser realizada a partir da própria lâmina de citologia ou no próprio material de biópsia, esta técnica detecta sequências específicas de DNA ou RNA, dando a possibilidade de detectar o tipo viral e a localização das áreas que estão infectadas, e principalmente o estado em que o vírus se encontra, podendo estar na forma episomal ou integrado ao genoma celular. Este método de detecção é trabalhoso e de baixa sensibilidade devido a fixação da amostra que pode comprometer o ácido nucleico, podendo gerar um resultado falso-negativo (FERRARO, et al; 2011).

Reação em cadeia polimerase possui uma alta sensibilidade e é considerado padrão ouro para detecção do HPV. Esse método permite identificar o sorotipo do presente no paciente, diminuindo o risco de falso-negativo, mas se comparada a col-pocitologia esta técnica possui uma baixa especificidade (SAAD, *et al*; 2020). Além disso, a sensibilidade de detecção de HPV pode ser alcançada através de conjuntos de primers de consenso direcionados a regiões específicas do vírus, que podem finalmente ajudar no melhor diagnóstico de vários HR-HPVs (PESIC, et al; 2019).

Para, Martins *et al.* (2012)

“O seguimento e o tratamento adequados das lesões neoplásicas e pré-neoplásicas do colo do útero dependem do diagnóstico histopatológico correto. A instauração de mecanismos de controle de qualidade para esse tipo de procedimento diagnóstico é fundamental para garantir precisão nos exames”.

Através da detecção precoce, o exame citológico de Papanicolau, tem se mostrado um método seguro e eficiente para alterar as taxas de incidência e mortalidade deste câncer (MELO *et al.* 2009).

Diante o exposto acima o objetivo do trabalho é fazer uma revisão bibliográfica para análise de qual método é mais sensível e específico para o diagnóstico de HPV.

2. METODOLOGIA

Este trabalho trata-se de uma revisão bibliográfica. Para desenvolver este projeto foram selecionados artigos científicos nos seguintes idiomas: Inglês, espanhol, e português. Sendo utilizado como base de dados, SciELO, PubMed, Google Acadêmico e EbscoHost, estipulados no período de 1997 à 2020. Para a realização da pesquisa foram utilizadas as seguintes palavras-chave: HPV, método, técnica, e diagnóstico.

Critérios de inclusão artigos contendo informações de pesquisas em pacientes, artigos de técnicas e diagnóstico do HPV.

Critérios de exclusão artigos com dados secundários, artigos de revisão, e os que não foram associados ao diagnóstico do HPV.

3. RESULTADO

Nas pesquisas realizadas nas bases de dados referidas, esta revisão abrange dados publicados de 452 artigos originais, desses foram utilizados 78 sendo referentes aos métodos de diagnóstico do HPV.

Na base de dados Scielo, foram encontrados um total de 20 artigos, sendo selecionados 9 vinculados à detecção do HPV. Na base de dados Google Academico, foram encontrados um total de 20 artigos, sendo selecionados 4 vinculados à detecção do HPV. Na base de dados EBSCO HOST, foram encontrados um total de 332 artigos, sendo selecionados 43 vinculados à detecção do HPV. Na base de dados PUBMED, foram encontrados um total de 120 artigos, sendo selecionados 22 vinculados à detecção do HPV.

As principais técnicas relatadas nesses artigos foram: PCR em 70%, Hibridização em 8,75%, CH em 7,5% e outros métodos combinados as essas técnicas principais foram 13,75%.

Autor	Ano	Técnicas	Local	Nº pacientes	Base de dados
Junior. SFL	2011	Primers MY09/11, GP05+/06+ Nested- PCR	Brasil	120	Scielo/EBSCO
Britto. AMA	2018	Nested- PCR	Brasil	62	Scielo
Torrado . LM	2020	Direct Flow Chip	Colombia	435	Scielo
Serrava lle. K	2015	Linear Array e PapilloChe ck	Brasil	88	Scielo/Google Academico/EBSC O

Rodrigu es. AD	2009	Hibridizaçã o de DNA; captura híbrida; Southern blot; hibridizaçã o in situ; Hibridizaçã o em fase sólida; PCR	Brasil	56	Scielo/Google Academico
Gugliel mo. ZC	2008	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	Venezuela	70	Scielo
Corzo. SV	2003	Reverse- line blot; Anticorpos policlonais anti-GST e anti-RAS; Elisa	Colombia	116	Scielo
Santos. ALF	2003	Hibridizaçã o; Conização	Brasil	105	Scielo
Flores. Y	2002	Hibridizaçã o	Mexico	19	Scielo
Bringhe nti. MEZ	2010	PCR utilizando- se os primers MY9/11 e	Brasil	3.000	Google Academico

		GP5+/6+; Real-Time NASBA			
Castro. TMPPG	2009	Amplificação do DNA primers consensus MY09/MY1 1; PCR.	Brasil	30	Google Academico/ EBSCO
Carón. Torroba	2015	Inmunocito química p16/ki-67		306	EBSCO
Burgos. Teruel	2020	Bethesda	Ribera-Valencia	1.372	EBSCO
Griseld a. TL	2014	Inmunoquí mico y la RCP-TR		92	EBSCO
Adriana . RD	2009	RT-PCR		56	EBSCO
Carolin a. W	2013	Tecnica de Tamizado	Colombia	74	EBSCO
Olivia. LB	2017	Biopsia	Espanha	408	EBSCO
Medina. B	2020	Hibridizaçã o	Peru	227	EBSCO
Joao Pedro. B	2018	RT-PCR utilizando fluorescênc ia por SYBR Green	Brasil	99	EBSCO
Yvonne.	2002	Colposcopi	Mexico	7 868	EBSCO

F		a e Biopsia			
Gomez. S	2009	PCR	Barcelona	16.022	EBSCO
Michelin e.OLPC	2015	PCR	Brasil	525	EBSCO
Sergio. FLJ	2011	PCR sistemas de primers MY09/11, GP05+/06+ e pela Nested- PCR	Brasil	120	EBSCO
José Luiz. LF	2018	PCR primers MY09/11 e GP5+/6+	Brasil	1.480	EBSCO
Liliana Patricia. SV	2011	PapilloChe ck®	Brasil	994	EBSCO
Joao Pedro. B	2018	RT-PCR utilizando fluorescênc ia por SYBR Green	Brasil	99	EBSCO
Murillo. B	2016	RT-PCR (p16)	Equador	256	EBSCO
Zoraya. DG	2008	PCR; PCR múltiplex	Venezuela	70	EBSCO
Yanelis. SM	2008	Citológicos e Histológico	Cuba	159	EBSCO

		s			
Maria da Conceição. VI	2018	PCR do tipo Multiplex	Brasil	356	EBSCO
Elba Lucia. RG	2013	PCR	Mexico	18	EBSCO
Tomás. GL	2015	PCR a tiempo real del cobas®	Espanha	600	EBSCO
Andre Luis. FS	2003	Captura híbrida II (CH II)	Brasil	105	EBSCO
Lafalla Bernad. O	2017	Biopsia e conização	Espanha	408	EBSCO
Karol. FF	2018	PCR convencional com os primers MY09/11 e GP5+/6+	Brasil	1.480	EBSCO
Arthur Hipolito. PL	2018	PCR	Brasil	95	EBSCO
Solé Sedenó	2013	PCR COBAS 4800	Barcelone	4.800	EBSCO
Elisab Aparecida. C	2007	PCR	Brasil	60	EBSCO
Sarabia Vega.	2014	Primers de consenso para o	Peru	Trabalhadoras sexuais (Não especificou)	EBSCO

		gene L 1 (primers PGMY09 / 11) e sondas específicas para cada genótipo.		quantidade)	
A.G	2017	PCR Digene® HC2 DNA Collection Device	Mexico	142	EBSCO
Fernan da. VF	2016	PCR	Brasil	192	EBSCO
Prado. P	2017	PCR	Venezuela		EBSCO
Militza. V Q	2008	PCR-RFLP	Venezuea	189	EBSCO
Adela. C	2004	PCR	Mexico	154	EBSCO
Giana. RM	2003	Captura Hibrida - II e PCR	Brasil	188	EBSCO
Sung. BC	1997	PCR e hibridizaçã o por pontos	Brasil	31	EBSCO
Ana Cândid a. MS	1999	PCR	Brasil	42	EBSCO
Arturo. B	2004	Hibridación in situ com	Mexico	63	EBSCO

		sondas biotiniladas			
Eliane Regina. ZMO	2002	PCR	Brasil	600	EBSCO
José. JNV	1999	PCR	Mexico	55	EBSCO
Daniela. C	2018	PCR em Tempo Real, arrays e Liras	Brasi	78	EBSCO
B. Cassani	2018	Digene HC2 HPV DNA Test, no Sistema RCS (QIAGEN); Teste de HPV BD Onclarity ™, na plataforma automatiza da BD Viper™ LT (Becton Dickinson); C) Xpert® HPV, na plataforma GeneXpert ® Infinity		1284	PUBMED

		Systems (Cepheid) e RT-PCR			
Jordan. AG	2020	Hibridizaçã o In Situ		97	PUBMED
Hyun-Woong Cho	2019	Real Time HR-S HPV, Anyplex™ II HPV e Cobas® HPV assays.		84	PUBMED
Carolin. G	2016	P16INK4a HPV DNA-related PCR		7	PUBMED
Aleksandra. P	2019	HPV DNA Array		500	PUBMED
Elizaveta. P	2015	Teste Abbott RealTime High Risk HPV, INNO-Lipa HPV Genotyping Extra e Full Spectrum PCR Amplificaçã o e Detecçã o / Genotipag		2.014	PUBMED

		em de HPV do Lab2Lab			
R Bathia	2018	Papilloplex HR-HPV Linear Array e um teste de genotipagem de HPV Optiplex.		500	PUBMED
L Wang	2018	O INNO-LiPA HPV Genotyping Extra; Isomega e cobas 4800		2.774	PUBMED
Irene. T	2007	AMPLICO R HPV; Linear Array (LA).		180	PUBMED
<u>Jiangfeng Lyu</u>	2018	PCR; LATE-PCR)		1.104	PUBMED
Kandali. S	2019	PCR Multiplex	Africa	104	PUBMED
Q Chen	2019	PCR Multiplex		804	PUBMED

		BioPerfectus (BMRT)			
A Dumont	2018	Roche Diagnostic s Cobas® Test.		120	PUBMED
Xin Yin	2011	MassARRAY com base na espectrometria de massa de dessorção / ionização a laser assistida por matriz (MALDI-TOF)		4.500	PUBMED
Amir. S	2016	Real Time PCR, GenoFlow HPV Array e INNO-LiPA HPV Genotyping Extra Assays com LCD-Array.	Iran	108	PUBMED

Ali. A	2018	Cepheid Xpert HPV com o teste de DNA de HPV de alto risco; HC2		343	PUBMED
N J Polman	2017	Hybrid Capture 2; HPV-Risk		1.300	PUBMED
Janaina . C	2011	Nested-PCR-RFLP		128	PUBMED
Christer . B	2019	HPV assay (AHPV)		193	PUBMED
Esra. Y	2019	Nested-PCR		100	PUBMED
Farzane . J	2018	Ensaio COBAS de DNA		2.453	PUBMED
Yimin. Ge	2019	Ensaio de Cobas 4800		252	PUBMED

5. DISCUSSÃO

O método mais simples para prevenção do câncer cervical é o Papanicolaou. Entretanto, nas últimas décadas, vários estudos tem mostrado para índices não-ideais de sensibilidade do preparado convencional. Recentemente, a citologia em base líquida começou a ser utilizada, objetivando maximizar a sensibilidade do teste citopatológico e permitir a realização de testes biomoleculares a partir da mesma amostra coletada para a análise morfológica (SIUMARA, et al; 2007).

Com referência aos métodos de identificação e tipagem do HPV nas mulheres, 56 desses artigos pesquisados utilizaram o PCR, 7 utilizaram hibridização, 6 utilizaram a captura híbrida e 11 utilizaram outros métodos de identificação. O diagnóstico molecular da infecção pelo HPV é importante para a triagem e diagnóstico do vírus e baseia-se, principalmente, em métodos como: captura híbrida (CH), hibridização in situ, e reação em cadeia da polimerase (PCR).

A hibridização in situ é um dos métodos utilizados para detecção do HPV por algumas razões, mas principalmente, pela possibilidade de estudo retrospectivo de biópsias, pois permite a detecção, a subtipagem e localização do HPV em tecidos parafinados disponíveis em arquivos de patologia cirúrgica e também em raspados citopatológicos e biópsias congeladas, porém, maioria dos estudos utiliza técnicas de reação da polimerase em cadeia, combinada ou não a outras técnicas, para detectar DNA do HPV em tecidos com diferentes formas de conservação e armazenamento. A razão para tal é que a técnica de reação da polimerase em cadeia é o método mais sensível entre os disponíveis para a identificação do HPV e é em teoria e prática, mais confiável e com menor risco de resultados falso-negativos (ALMEIDA, et al; 2008).

O método de reação em cadeia da polimerase (PCR), que é um padrão ouro para a maioria dos tipos de HPV (conhecidos e desconhecidos) usando primers de consenso específicos em configuração mínima de laboratório, ou seja, vários estudos validaram a eficácia e eficiência dos diferentes conjuntos de primers de consenso no rastreamento de HPVs. Numerosos primers de consenso, como E6, E6 / E7, GP-E6 / E7, MY09 / 11, GP5 + / GP6 +, SPF10 e PGMY09 / 11 foram desenvolvidos para detectar a presença de DNA de HPV. Além disso, a sensibilidade de detecção de HPV

pode ser alcançada por meio de conjuntos de primers de consenso direcionados para regiões específicas e que podem finalmente contribuir para um melhor diagnóstico de vários HR-HPVs (GAUTAM, et al; 2019).

A CH II para detecção do DNA-HPV de alto risco oncogênico com quantificação viral, apresenta uma alta sensibilidade para o diagnóstico das lesões de alto grau, ou seja CH II testa apenas tipos de HPV de alto grau (16, 18 entre outros) e o PCR identifica HPV de alto grau e de baixo grau, abrangendo todos os tipos de HPV presentes nas células cervicais.

As técnicas estudadas (CH, PCRc e PCR-TR) mostraram-se úteis e eficazes para o diagnóstico do HPV em amostras clínicas. Entretanto, devido à técnica de CH2 ser mais complexa e demorada, exigindo duas reações separadas para a detecção de HPV dos tipos de alto e baixo riscos, e, ainda, por ter apresentado resultados possivelmente falso-positivos, a PCR (PCRc ou PCR-TR), principalmente por sua sensibilidade, poderia ser o método de escolha para a triagem de HPV em amostras clínicas. A PCR-TR tem a vantagem de ser mais rápida (30 min vs. 3 h) que o convencional e tem sido considerado em muitos casos mais sensível e eficiente. Contudo, os resultados positivos de qualquer uma das técnicas de PCR devem ser confirmados com outra técnica molecular, como, por exemplo, microarray ou linear array, que permitem a genotipagem para a identificação do tipo de HPV presente na amostra (RODRIGUES, et al; 2009).

6. CONCLUSÃO

Em conclusão, as técnicas abordadas são de grande valia e adequadas para o diagnóstico do HPV e para o acompanhamento do impacto das vacinas contra HPV em ensaios clínicos. Também são necessários mais estudos comparativos para definir os custos de cada técnica na prática clínica, pois a CH acaba sendo mais barata que as técnicas de PCR e pode ser utilizada com mais frequência em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. Enfim, é necessário que cada vez se tenha um cuidado maior na triagem do HPV, visto que a infecção por este vírus é muito frequente na população e se não prevenida ou tratada, pode levar a lesões sérias e desenvolver câncer ou até mesmo à morte. Concluimos que cada técnica tem uma determinada função, o método de PCR é tem a capacidade de detectar qual tipo do vírus está presente no corpo humano, a Hibridização in situ é indicado para saber o estado físico do vírus se ele se encontra na forma episomal quando não há presença de lesões pré inasivas, ou incorporado ao genoma significando que há lesões pré invasivas no colo uterino, já a Captura Híbrida apenas faz a tipagem viral, detectando se o vírus é de baixo ou alto grau. O médico responsável determina qual o melhor método a ser utilizado, a partir do histórico do paciente.

7. REFERÊNCIA

ABREU, Mery; et al. **Conhecimento e percepção sobre o HPV na população com mais de 18 anos da cidade de Ipatinga, MG, Brasil.** Ciênc. saúde colet. 2018. 23 (3). Disponível em: <https://www.scielo.org/article/csc/2018.v23n3/849-860/pt/>. Acesso em: 5 de set.2020.

ADORNO, Flora; et al. **A utilidade da captura híbrida para o HPV de alto risco em pacientes com atipia de células escamosas na colpocitologia.** J Bras Patol Med Lab. 2020; 56: 1-6. Disponível em: https://cdn.publisher.gn1.link/jbpml.org.br/pdf/pt_v56a0006.pdf. Acesso em: 29 de ago.2020.

GAUTAM, Abhilasha; et al. **Human Papillomavirus Genome based Detection and Typing: A Holistic Molecular Approach.** Curr Mol Med. 2019. 19 (4):237-246. Disponível em : <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30950352/>. Acesso em: 7 de nov.2020.

PESC, Aleksandra; et al. **CIN2+ detection of the HPV DNA Array genotyping assay in comparison with the Cobas 4800 HPV test and cytology.** Virol J. 2019. 23;16(1):92. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31337408/>. Acesso em: 31 de out. 2020.

FERRARO, Cíntia; et al. **Infecção oral pelo HPV e lesões epiteliais proliferativas associadas.** J. Bras. Patol. Med. Lab. 2011. vol.47 no.4. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1676-24442011000400010&script=sci_arttext&tlng=pt . Acesso em: 3 de set.2020.

MELO, Simone; et al. **Alterações citopatológicas e fatores de risco para ocorrência do câncer de colo uterino.** Rev. Gaúcha Enferm. (Online). 2009; vol. 30 no.

4. https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1983-14472009000400004&script=sci_art-text. Acesso em: 10 de abril. 2020.

NAKAGAWAL, Janete; et al. **Vírus HPV e câncer de colo de útero Vírus HPV e câncer de colo de útero**. Rev Bras Enferm. 2010; 63 (2): 307-11. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/reben/v63n2/21.pdf>. Acesso em: 3 de mai.2020.

QUEIROZ, Danielle; PESSOA, Sarah; SOUSA, Rosélea. **Infecção pelo Papiloma Vírus Humano (HPV): incertezas e desafios**. Acta paul. enferm. 2005. vol.18 no.2. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-21002005000200012&script=sci_arttext&tlng=pt. Acesso em: 5 de set. 2020.

RODRIGUES, Adriana; et al. **Comparação das técnicas de captura de híbridos e PCR para a detecção de HPV em amostras clínicas**. J Bras Patol Med Lab. 2009. v. 45 • n. 6 • p. 457-462. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/jbpml/v45n6/a04v45n6>. Acesso em: 3 de nov.2020.

SAAD, Sarhan; et al. **Comparação entre citologia anal, colposcopia anal e genotipagem do HPV por reação em cadeia da polimerase no seguimento pós-operatório de condiloma acuminado**. Rev. Col. Bras. Cir. 2020. vol.47. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-69912020000100180&script=sci_arttext&tlng=pt. Acesso em: 29 de agos. 2020.

SANTOS, Andre; et al. **Desempenho do exame colpocitológico com revisão por diferentes observadores e da captura híbrida II no diagnóstico da neoplasia intra-epitelial cervical graus 2 e 3**. Cad. Saúde Pública. 2003. 19(4):1029-1037. Disponível em: <https://www.scielosp.org/pdf/csp/2003.v19n4/1029-1037/pt>. Acesso em: 17 de nov. 2020.

TULIO, Siumara; 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**. J. Bras. Patol. Med. 2007. Lab. vol.43. No.1. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1676-24442007000100007&script=sci_arttext. Acesso em: 16 de nov. 2020.

