

Infecção por múltiplos tipos de Papilomavirus humano em mulheres jovens sexualmente ativas

Infection with multiple types of human papillomavirus in sexually active young women

Ana Paula Machado de Almeida¹, Ana Paula Machado², Flávia Gatto de Almeida³, Leandro Sobrinho Ávilla⁴, Thiago Theodoro Martins Prata¹, Larissa Zatorre Almeida¹, Camila Mareti Bonin¹, Cacilda Tezelli Junqueira Padovani⁵, Alda Maria Teixeira Ferreira^{2,5}, Carlos Eurico dos Santos Fernandes⁵, Inês Aparecida Tozetti^{1,2,5}

RESUMO

Modelo do estudo: transversal. **Objetivo do estudo:** estimar a frequência e a distribuição dos tipos de Papilomavírus humano (HPV) em mulheres jovens sexualmente ativas. **Metodologia:** foram coletadas amostras do canal vaginal e endocérvice de 158 mulheres, com idade entre 18 e 35 anos, por meio da técnica de autocoleta. O DNA-HPV foi extraído e amplificado pela técnica de PCR *end point* utilizando os *primers* consensus PGMY09/11. A genotipagem foi executada pela técnica de PCR tipo específico (TS-PCR) e por análise dos fragmentos obtidos com o uso de enzimas de restrição (RFLP). **Resultados:** DNA-HPV foi detectado em 23% das amostras, 92% foram genótipos de alto risco oncogênico (HR), sendo prevalente o HPV45, seguido do HPV16 e 31. Infecções por múltiplos tipos de HPV foram detectadas em 35% das amostras, demonstrando infecção por mais de dois tipos em 22,2% das genotipadas. Maior frequência do DNA-HPV foi observada entre mulheres com idade ≤ 25 anos. **Conclusão:** Este estudo demonstrou alta frequência da infecção pelo HPV em mulheres jovens sexualmente ativas, assim como uma alta prevalência de infecção múltipla com tipos de alto risco oncogênico.

Palavras-chave: Papillomavirus Humano. HPV. Reação em Cadeia da Polimerase. PCR. Polimorfismo de Fragmento de Restrição. RFLP.

1. Programa de Pós Graduação em Doenças Infeciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) - Cidade Universitária - Campo Grande - Mato Grosso do Sul, Brasil.
2. Programa Multicêntrico de Pós Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular. UFMS.
3. Programa de Residência Multiprofissional no Cuidado ao Paciente Crítico - Instituto de Ensino e Pesquisa Sírio Libanês. São Paulo, Brasil
4. Programa de Pós Graduação em Imunologia Básica e Aplicada. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP. Universidade de São Paulo, Brasil
5. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. UFMS.

Correspondência:
Inês Aparecida Tozetti¹
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Faculdade de Medicina (FAMED-UFMS) Caixa Postal 549
79070-900 - Campo Grande, MS / Brazil.

Artigo recebido em 10/09/2014
Aprovado para publicação em 31/03/2015

ABSTRACT

Study design: cross. **Study objective:** estimate the frequency and distribution types of human papillomavirus (HPV) in sexually active young women. **Methods:** samples of vaginal and endocervical canal of 158 women, aged between 18 and 35 years were collected through self-collection technique. The HPV DNA was extracted and amplified by PCR *end point* using the consensus *primers* PGMY09/11 and genotyping was performed by PCR specific type (TS-PCR) and by analysis of the fragments obtained from the use of restriction enzymes (RFLP). **Results:** HPV DNA was detected in 23% of participants, 92% were high-risk HPV genotypes (HR), being the prevalent HPV45, followed by HPV16 and 31 infections with multiple HPV types were detected in 35% of samples, indicating infection by more than two types in 22.2% of the genotyped. Higher frequency of HPV DNA was detected in women ≤ 25 old. **Conclusion:** this demonstrated a high frequency of HPV infection in sexually active young women, as well as a high prevalence of infection with multiple types of high oncogenic risk.

Keywords: Papillomaviridae. Polymerase Chain Reaction. Polymorphism, Restriction Fragment Length .

Introdução

O Papilomavírus humano (HPV) é a causa da infecção sexualmente transmissível mais comum na atualidade, podendo ser considerada como principal fator de risco para o desenvolvimento de lesões intraepiteliais de alto grau e carcinoma cervical invasivo.^{1,2}

Os mecanismos que determinam a regressão, persistência, bem como as lesões precursoras do câncer de colo uterino são principalmente influenciados por aspectos relacionados a própria infecção, tais como o tipo viral, carga viral, infecção única e múltipla, bem como fatores relacionados a imunidade do hospedeiro, comportamento sexual, uso de contraceptivos, paridade, sexarca, álcool e tabaco.³

Mais de 200 tipos de HPV já foram identificados filogeneticamente e dentre estes, cerca de 40 tipos possuem a habilidade de infectar a mucosa genital, sendo classificados em baixo risco (Low risk – LR), destacando-se HPV6 e 11; e alto risco oncogênico (High risk –HR), por exemplo HPV16, 18, 31, 45.^{4,5}

A infecção persistente por HR-HPV constitui o principal fator de risco para o desenvolvimento de neoplasia cervical⁶, onde cerca de 20-50% das mulheres infectadas são portadoras de múltiplos tipos de HR-HPV.⁷

Considerando o importante papel da infecção pelo HPV no desenvolvimento do câncer do colo uterino, este estudo objetivou estimar a frequência da

infecção por HPV e identificar os tipos virais mais prevalentes em amostras autocoletadas de mulheres jovens sexualmente ativas.

Metodologia

Sujeitos do pesquisa

Este estudo transversal, não probabilístico por conveniência, envolveu 158 estudantes universitárias do sexo feminino, com idades entre 18-35 anos, sob o protocolo de aprovação nº2186 do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

As amostras vaginais e endocervicais foram obtidas pelo método de autocoleta com o auxílio de escova endocervical com ponta macia própria para esfoliação.

Detecção do DNA-HPV

Amostras autocoletadas foram submetidas ao protocolo de extração de DNA com o kit Wizard® Genomic Dna Purification (Promega, A1125), seguido de adaptações.

O DNA-HPV foi detectado por PCR *end point* utilizando os *primers* consensus PGMY09/11, que amplificam um fragmento de 450pb da região L1 do genoma de HPV⁸ e como controle endógeno da reação foram utilizados os *primers* GH20/PC04 que amplificam uma região de 286pb do gene da β -globina humana.⁹

Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5%, contracorados com brometo de etídio e fotodocumentados em transiluminador com luz ultravioleta (UV).

PCR tipo específica (TS-PCR) e análise dos fragmentos obtidos por enzimas de restrição (RFLP)

As amostras positivas para DNA-HPV foram genotipadas por TS-PCR para os tipos HPV6, 11 (LR-HPV) e HPV16, 18, 31, 33, 45 (HR-HPV)¹⁰ e os produtos visualizados em gel de agarose à 2,5% com marcador de 100pb incluso.

As amostras positivas para DNA-HPV que foram indeterminadas por TS-PCR foram submetidas a análise do polimorfismo de fragmentos obtidos com uso de enzimas de restrição (RFLP), com o uso das enzimas *PstI*, *HaeIII*, *DdeI*, *RsaI* segundo algoritmo de identificação.¹¹

Análise estatística

Análise estatística foi realizada utilizando o pacote estatístico SPSS versão 10.0 (*Statistical Package for the Social Sciences*). Um valor de $p \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados

Das amostras analisadas 12% foram excluídas pois não apresentaram amplificação para o gene da β -globina, desta forma o estudo foi composto por 139 participantes.

O DNA-HPV foi detectado em 23% das amostras, genótipos de alto risco oncogênico foram identificados em 92%, infecção simples em 65% e infecção múltipla em 35% das amostras analisadas. Todas estas variáveis foram expressivas em pacientes de idade ≤ 25 anos como se observa na figura 1.

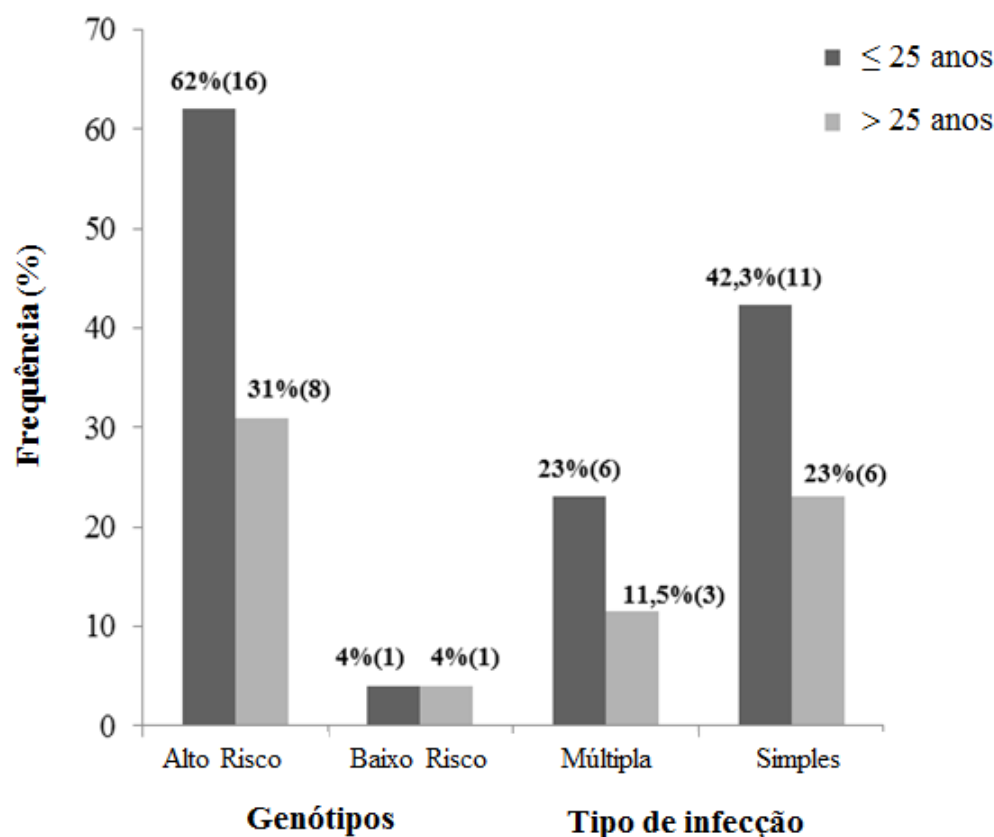


Figura 1: Frequência dos genótipos de baixo e alto risco oncogênico e infecção múltipla ou simples entre mulheres HPV positivas jovens sexualmente ativas, segundo a faixa etária.

A infecção por mais de dois tipos virais foi observada em 22,2% não associadas aos tipos LR-HPV. A Tabela 1 demonstra a distribuição de infecções de HPV segundo seu grau de oncogenicidade e o tipo de infecção.

O genótipo mais frequente entre as amostras foi o HPV45, sendo frequente em 21,9%, seguido do HPV16 em 15,6% e HPV31 em 15,6% das analisadas. A Figura 2 demonstra a frequência dos genótipos de HPV e a tabela 2 as características de risco da população analisada segundo a presença da infecção viral.

Discussão

A frequência da infecção pelo HPV demonstra-se variável em alguns estudos globais¹² e essa variação pode ser atribuída as diferenças epidemiológicas da população analisada, metodologia empregada para coleta e extração do DNA-HPV¹³, no trabalho proposto a frequência encontrada da infecção pelo HPV foi de 23%.

Estudo conduzido entre mulheres gregas envolvendo adolescentes, encontrou taxa semelhante de 22,7%.¹⁴ Frequências inferiores foram relatadas por

Tabela 1: Distribuição das infecções por HPV segundo grau de oncogenicidade e o tipo de infecção.

Risco oncogênico	Infecção múltipla				Total		p ^a
	Presença		Ausência		Nº	%	
	Nº	%	Nº	%			
HR	5	27.7	13	72.3	18	72.0	0.01
HR/LR	3	100.0	0	0	3	12.0	
LR	0	0	4	100.0	4	16.0	
Total	8	32.0	17	68.0	25*	100.0	

^a Teste de χ^2 de Pearson; HR: Alto risco; LR: Baixo risco.

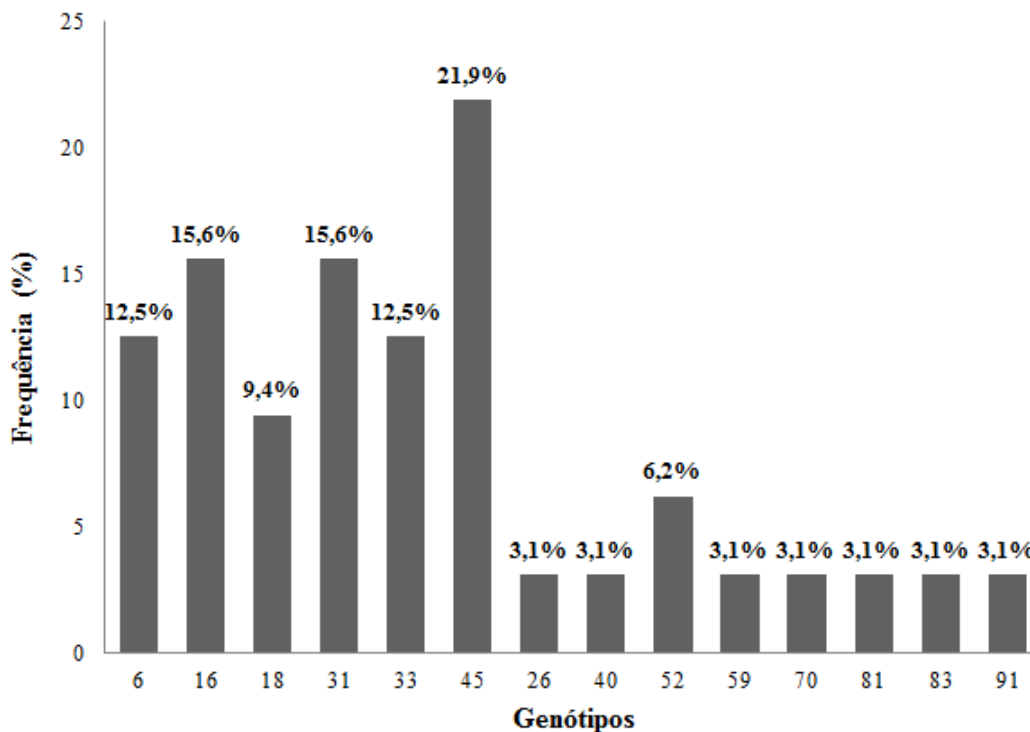


Figura 2: Frequência dos genótipos HPV encontrados em mulheres jovens sexualmente ativas.

Tabela 2: Características de risco associadas a infecção por HPV em mulheres jovens sexualmente ativas.

Variáveis	Infecção por HPV						p ^a
	Negativa		Positiva		Total		
	N.	%	N.	%	N.	%	
Idade							0.315
18-25	63	74.2	22	25.8	85	61.2	
26-35	10	18.5	44	81.5	54	38.8	
Sexarca							0.343
≤ 18 anos	27	25.8	78	74.2	105	78.4	
> 18 anos	5	17.3	24	82.7	29	21.6	
Parceiros nos últimos 2 anos							0.311
≤ 2	28	22.8	95	77.2	123	91.8	
> 2	4	36.4	7	63.6	11	8.2	
Uso de preservativo							0.678
Sim	24	82.8	5	17.2	29	24.1	
Não	66	72.5	25	27.5	91	75.9	
Uso do álcool							0.691
Sim	51	85.0	9	15.0	60	43.2	
Não	69	87.3	10	12.7	79	56.8	
Uso do tabaco							0.573
Sim	6	85.7	1	14.3	7	5.0	
Não	101	76.5	31	23.5	132	95.0	
Exame citológico							0.239
Sim	90	79.0	24	21.0	114	82.0	
Não	17	68.0	8	32.0	25	18.0	

^a Teste de χ^2 de Pearson.

outros trabalhos, compreendendo 19% e 16%.^{15,16,17} Proposta envolvendo estudantes universitárias em Honduras encontrou 45% da infecção¹⁸, já no Brasil as frequências quanto a população feminina em geral oscilam entre 21 a 48%.^{19,20}

Os genótipos HR-HPV foram detectados em 92% das amostras positivas para DNA-HPV, e dentre estes, 62% pertenciam a mulheres de idade ≤ 25 anos. Estudo realizado nos EUA relatou uma alta frequência de HR-HPV entre mulheres com idade de 20-29 anos²¹, consistente com outro que encontrou 85% de positividade para HPV composto por genótipos de alto

risco oncogênico em mulheres jovens.²² Esta prevalência é atribuída à maior exposição aos fatores de risco que esta faixa está sujeita e que favorecem a aquisição viral.^{23,24,25}

A infecção por múltiplos tipos de HPV foi detectada em 35% das amostras positivas, com associação significativa entre a detecção de genótipos HR-HPV ($p \leq 0,05$). Estudo encontrou 33% de infecção múltipla em mulheres na região de Honduras.²⁶ A literatura ressalta que o risco da infecção persistente é quase duas vezes maior em mulheres com infecção múltipla.^{27,28}

O tipo viral mais frequente em nosso estudo foi o HPV45, detectado em 21,9% das amostras, seguido pelo HPV16 (15,6%) e HPV31 (15,6%). Resultados discordantes apontam o HPV16 como o genótipo mais frequente^{29,30} e de fato diversos trabalhos apontam que o HPV16 e HPV18 juntos, respondem por 70% dos casos de câncer do colo de útero, assim como, são frequentemente envolvidos nos casos de infecção assintomática e câncer cervical em todas as regiões do mundo.^{31,32,33}

A técnica de auto coleta utilizada neste estudo demonstrou grande eficácia para detecção do DNA-HPV, com pequena perda amostral. Trabalhos apontam que a técnica é promissora, viável e de fácil adesão em estudos que visam elucidar a história natural da infecção, bem como a progressão para cancro e carcinoma, além disso, o uso desta em programas de rastreio para o câncer de colo útero, pode ser mais eficaz na redução da mortalidade se comparado a abordagens mais invasivas, das quais a paciente necessita do exame preventivo.^{34,35}

Em conclusão, ressalta-se a importância do trabalho no cenário nacional da infecção pelo HPV, contribuindo para a adequação de políticas públicas de vacinação para este agente. Nossos resultados reforçam a utilidade da aplicação da vacina para os tipos já cobertos pela atual formulação ministrada e também a necessidade de desenvolvimento, para uso na população em geral, de novas formulações com maior espectro de tipos virais, uma vez que dentro do grupo analisado observou-se alta frequência do HPV45, o qual não é alvo da vacina em uso, bem como a presença de outros HR-HPV. Ressalta-se a relevância de estudos envolvendo populações distintas, a fim de identificar a frequência da infecção, bem como os tipos presentes. Portanto, estes resultados fornecem informações pertinentes para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e profiláticas para a prevenção do câncer de colo uterino.

Referências

1. Tota JE, Chevarie-Davis M, Richardson LA, Devries M, Franco EL. Epidemiology and burden of HPV infection and related diseases: Implications for prevention strategies. *Prev Med.* 2011; 53(Suppl 1):S12-S21.
2. Torres LM, Páez M, Insaurrealde A, Rodriguez MI, Castro A, Kasamatsu E. Detection of high risk Human Papillomavirus Cervical Infections by the Hybrid Capture in Asunción, Paraguay. *Braz J Infect Dis.* 2009;13: 203-6.
3. Confortini M, Carozzi F, Zappa M, Ventura L, Iossa A, Cariaggi P, et al. Human papillomavirus infection and risk factors in a cohort of Tuscan women aged 18-24: results at recruitment. *BMC Infect Dis.* 2010; 10: 2-11.
4. IARC. International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Human Papillomaviruses. France: Lyon, 2007.
5. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004; 342: 17-27.
6. Gravitt PE. The know unknowns of natural history. *J Clin Invest.* 2011; 121: 4593-9.
7. Coser J, Boeira TR, Fonseca AS, Ikuta N, Lunge VR. Human papillomavirus detection and typing using a nested PCR-RFLP assay. *Braz J Infect Dis.* 2011; 15: 467-72.
8. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlée F, Hildesheim A, et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 357-61.
9. Husnjak K, Grce M, Magdiæ L, Paveliæ K. Comparison of Five different polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus in cervical cell specimens. *J Virol Methods.* 2000; 88: 125-34.
10. Guo M, Sneige N, Silva EG, Jan YJ, Cogdell DE, Lin E, et al. Distribution and viral load of eight oncogenic types of human papillomavirus (HPV) and HPV 16 integration status in cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Mod Pathol.* 2007; 20: 256-66.
11. Nobre RJ, Almeida LP, Martins TC. Complete genotyping of mucosal human papillomavirus using a restriction fragment length polymorphism analysis and a original typing algorithm. *J Clin Virol.* 2007; 42: 13-21.
12. Carvalho MO, Almeida RW, Leite FM, Fellows IB, Teixeira MH, Oliveira LH, et al. Detection of human papillomavirus DNA by the hybrid capture assay. *Braz J Infect Dis.* 2003; 7: 121-5.
13. Fedrizzi EN, Laureano JK, Schlup C, Campos MO, Menezes ME. Infecção pelo papilomavírus humano (HPV) em mulheres de Florianópolis, Santa Catarina. *DST J Bras Doenças Sex Transm.* 2011; 23: 205-9.
14. Stamatakis P, Papazafiropoulou A, Elefsiniotis I, Giannakopoulou M, Brokalaki H, Apostolopoulou E, et al. Prevalence of HPV infection among Greek women attending a gynecological outpatient clinic. *BMC Infect Dis.* 2010; 10:2-6.
15. Woodman CB, Collins S, Winter H, Bailey A, Ellis J, Prior P, et al. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet.* 2001; 357: 1831-6.
16. Winer RL, Hughes JP, Feng Q, Xi LF, Chernes S. Early natural history of incident, types-specific human papillomavirus infections in newly sexually young women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011; 20: 699-707.
17. Herrero R, Hildesheim A, Bratti C, Sherman ME, Hutchinson M, Morales J, et al. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J Natl Cancer Inst.* 2000; 92: 464-74.
18. Ferrera A, Tábora N, Flores Y, Zelaya A, Massuger L, Melchers WJ. Assessment of HPV infection among female university students in Honduras via Roche linear array. *Int J Gynaecol Obstet.* 2011; 113: 96-9.

19. Giuliano AR, Harris R, Sedjo RL, Baldwin S, Roe D, Papenfuss MR, et al. Incidence, prevalence, and clearance of type-specific human papillomavirus infections: the young women's health study. *J Infect Dis.* 2002; 186: 462-9.
20. Stoler MH. Human papillomaviruses and cervical neoplasia: a model for carcinogenesis. *Int J Gynecol Pathol.* 2000; 19: 16-28.
21. Dunne EF, Unger ER, Sternberg M, McQuillan G, Swan DC, Patel SS, et al. Prevalence of HPV infection among females in the United States. *JAMA.* 2007; 29: 813-9.
22. Oliveira LHS, Rosa MLG, Cavalcanti SMB. Patterns of genotype distribution in multiple human papillomavirus infections. *Clin Microbiol Infect.* 2007; 14: 60-5.
23. Casalegno JS, Benchaib M, Le Bail Carval K, Piaton E, Mathevet P, Mekki Y. Human papillomavirus genotype distribution among french women with and without cervical abnormalities. *Int J Gynaecol Obstet.* 2011; 114: 116-9.
24. Cotton SC, Sharp L, Seth R, Masson LF, Little J, Cruickshank ME, et al. Lifestyle and socio-demographic factors associated with high-risk HPV infection in UK women. *Br J Cancer.* 2007; 97: 133-9.
25. Franceschi S, Herrero R, Clifford GM, Snijders PJ, Arslan A, Anh PT, et al. Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide. *Int J Cancer.* 2006; 119: 2677-84.
26. Tábora N, Bakkens JM, Quint WG, Massuger LF, Matute JA, Melchers WJ, Ferrera A. Human papillomavirus infection in honduran women with normal cytology. *Cancer Causes Control.* 2009; 20: 1663-70.
27. Perrons C, Jelley R, Kleter B, Quint W, Brink N. Detection of persistent high risk human papillomavirus infections with hybrid capture II and SPF10/LiPA. *J Clin Virol.* 2005; 32: 278-85.
28. Schmeink CE, Melchers WJ, Siebers AG, Quint WG, Massuger LF, Bekkers RL. M. Human papillomavirus persistence in young unscreened women, a prospective cohort study. *PLoS ONE.* 2011; 6: e27937.
29. Eren F, Erenus M, Bas E, Ahiskali R, Yoldemir T. Prevalence of HPV infection by cytologic diagnosis and HPV DNA extraction and prevalence of the HPV genotypes detected in urban Turkish women. *Int J Gynecol Obstet.* 2010; 109: 235-8.
30. Srivastava S, Gupta S, Roy JK. High prevalence of oncogenic HPV-16 in cervical smears of asymptomatic women of eastern Uttar Pradesh, India: a population-based study. *J Biosci.* 2012; 37: 63-72.
31. Liu SS, Chan KY, Leung RC, Chan KK, Tam KF, Luk MH, et al. Prevalence and risk factors of Human Papillomavirus (HPV) infection in southern Chinese women - population-based study. *PLoS ONE.* 2011; 6: e19244.
32. de Sanjose S, Quint WG, Alemany L, Geraets DT, Klaustermeier JE, Lloveras B, et al. Human papillomavirus genotypes attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol.* 2010; 11: 1048-56.
33. Clifford GM, Rana RK, Franceschi S, Smith JS, Gough G, Pimenta JM. Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005; 14: 1157-64.
34. Sowjanya AP, Paul P, Vedantham H, Ramakrishna G, Vidyadhari D, Vijayaraghavan K et al. Suitability of self-collected vaginal samples for cervical cancer screening in peri-urban villages in Andhra Pradesh. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009; 18: 1373-8.
35. Stewart DE, Gagliardi A, Johnston M, Howlett R, Barata P, Lewis N, et al. Self-collected samples for testing of oncogenic human papillomavirus: a systematic review. *J Obstet Gynaecol Can.* 2007; 29: 817-28.