
INFECÇÃO GENITAL

ASSINTOMÁTICA PELO

PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

EM GESTANTES: RISCO DA

TRANSMISSÃO VERTICAL*

ANGELA ADAMSKI DA SILVA REIS, LEONARDO BARCELOS DE PAULA, APARECIDO DIVINO DA CRUZ

Resumo: mais de 100 tipos de HPV já foram identificados. Somente um terço destes tendem a causar infecções anogenital, orais ou laríngeas. A infecção perinatal pode ocorrer através do líquido amniótico durante a gestação e a exposição direta às lesões cervicais e genitais durante o nascimento. O estudo apontou detectar o genoma de HPV nas mulheres grávidas.

Palavras-chave: Gestantes. HPV. PCR. Recém-nascido. Transmissão vertical.

Os papilomavírus são vírus de DNA de fita dupla com cerca de 8.000 pares de bases, pequenos, não envelopados, icosaédrico com diâmetro de 52-55 nm. Esses vírus estão contidos em um capsídeo composto por 72 capsômeros pentaméricos. O capsídeo contém duas proteínas estruturais: L1 (55 kDa, constitui 80% da proteína viral total) e L2 (70 kDa) que são codificadas pelo vírus. As partículas virais podem ser expressas por L1, isoladamente ou em conjunto com L2 em mamíferos (HAGENSEE *et al.*, 1993; KIRNBAUER *et al.*, 1992).

A infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) é frequentemente comum em adultos jovens de ambos os sexos, sendo a prevalência estimada entre 20 e 46%. A disseminação do HPV tende a ser universal entre os indivíduos sexualmente ativos, sendo o homem um importante fator propagador deste vírus entre as mulheres (REIS *et al.*, 2010, TEIXEIRA *et al.*, 2002; WALBOOMERS *et al.*, 1999).

Em aproximadamente de 99,7% dos casos de carcinoma cervical, a infecção do epitélio por HPV tem sido observada, sendo os HPVs 16, 18, 31 e 33 os tipos mais frequentemente encontrados (REIS *et al.*, 2010; BURD, 2003; MUÑOZ *et al.*, 2003; WHO, 2002, CASTELLSAGUÉ *et al.*, 2002; PORNTANAKASEM *et al.*, 2001), conferindo a esta particular neoplasia o segundo tipo de câncer feminino mais prevalente no mundo.

Em consequência da presença de HPV nas mucosas anogenitais, o vírus é mais comumente transmitido durante as relações sexuais (REIS *et al.*, 2010; YU *et al.*, 2005; SCHIFFMAN, CASTLE, 2003; MUÑOZ *et al.* 2003), sendo esta via considerada como a principal forma de transmissão do HPV entre humanos (MOODY; LAIMINS, 2010; SCHIFFMAN, CASTLE, 2003, FRISCH *et al.*, 1999; ELUF-NETO, 1998). Há poucos estudos relacionados à transmissão do HPV por vias não sexuais, tais como fômites, provavelmente devido a sua pouca importância quando comparada à Transmissão sexual. No entanto, a transmissão vertical de HPV tem merecido destaque na literatura, pois esta via de transmissão é particularmente importante na infecção do recém nascido (REIS *et al.*, 2010; ROMBALDI *et al.*, 2008; ROMBALDI *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2003; GHARIZADEH *et al.*, 2003).

A evidência da transmissão vertical ocorre presumivelmente durante a passagem do feto através do canal do parto infectado (ROMBALDI *et al.*, 2009). Quando o feto é contaminado, os HPVs estimulam a proliferação nas vias aéreas superiores, acometendo as regiões laríngea e respiratória (KUI *et al.*, 2003). Um fator preocupante é a disseminação do vírus pela árvore traqueobronqueal, evoluindo para papilomatose pulmonar, resultando em infecção incontrolável e fatal (MEDEIROS *et al.*, 2005). A papilomatose laringo-tráqueo-brônquica com disseminação para o parênquima pulmonar é uma doença rara (DRAGANOV *et al.*, 2006). A enfermidade adquire grande importância por sua grave evolução e acometimento de crianças e adolescentes, apresentando morbidade com sérias complicações e expressiva redução da qualidade de vida, por causa das muitas excisões cirúrgicas e traqueostomias necessárias, com prognóstico desfavorável, que inclui o óbito (ROMBALDI *et al.*, 2009).

A papilomatose laríngea é um tumor comum deste órgão, que habitualmente é sintomático, manifestando-se com rouquidão que progride para estridor. Surge na infância e a grande maioria persiste restrita à laringe ou pode envolver durante a adolescência. Em alguns casos pode ocorrer o acometimento da traquéia e brônquios principais, e o envolvimento pulmonar, constituindo-se na papilomatose laringo- tráqueo-brônquica complicada (MEDEIROS *et al.*, 2005; NETO *et al.*, 2002; KRAMER *et al.*, 1985).

O HPV está associado com a papilomatose laríngea e pulmonar, tendo como possível forma de transmissão a região do canal do parto. Neste sentido, o objetivo do estudo piloto foi detectar HPV em 45 gestantes (3º trimestre de gestação) sem história sub-clínica viral e com citologia normal para avaliar a possibilidade de transmissão vertical ao recém-nascido.

PACIENTES E MÉTODOS

O grupo amostral foi composto de 45 mulheres no terceiro trimestre de gestação. Todas as pacientes foram voluntárias do Programa Saúde da Mulher (PSF) em Campinorte - GO. Todas as voluntárias assinaram um termo de consentimento atestando a

participação de caráter voluntário na pesquisa. Após a assinatura, as pacientes respondiam um questionário abordando seus hábitos de vida sexual. As amostras de escovado de cérvix uterina coleta pelo Serviço Médico especializado do PSF foram submetidas a centrifugação de 14.000 r.p.m. por 30 minutos para separar as células para posterior extração de DNA. A purificação do material genômico foi realizada com o kit Wizard® (Promega Corporation, USA), seguindo o protocolo do fabricante.

As reações da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram feitas de acordo com protocolo de Reis (2005); usando volume final de 25uL, contendo aproximadamente 100ng/uL de DNA, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 2.5 mM de MgCl₂, 0.2mM dNTPs, 0.5 U de Taq DNA polimerase. Para a detecção do HPV foi utilizado primers genéricos GP5+/GP6+ (F: 5' TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC 3' / R: 5' GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C 3') que amplifica um fragmento de aproximadamente 150pb. Nas amostras positivas para HPV foi pesquisado o tipo viral usando-se primer tipo específicos para os HPVs 6, 11, 16 e 18. Em todas as amostras foi amplificado a região RH 92600 6q13, usado como um controle interno da reação para avaliar a presença de DNA humano e validar os resultados HPV-negativos.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% com campo elétrico constante de 10V/cm em TBE 1X. Para visualizar os amplicons, o gel foi corado por Nitrato de Prata.

RESULTADOS

As 45 pacientes analisadas apresentavam média de idade de 21 anos, sendo a mais jovem com 14 anos e a mais velha com 33 anos. Em relação aos hábitos de vida sexual, as pacientes afirmaram não ter doença sexualmente transmissível, 15,5% não eram casadas legalmente, mas tinham um único parceiro e 6,6% já tiveram relacionamento extra conjugal anterior ao relacionamento atual. Todas as pacientes informaram não ter verruga genital em momento anterior à gestação. Ambas as pacientes apresentavam bom estado geral de saúde e não tinha doença pré-existente.

A avaliação de DNA extraído das 45 amostras coletadas mostra-se amplificadas para RH 92600 6q13, demonstrando DNA íntegro e que o material genômico era suficiente para posterior detecção para HPV, como também ficou demonstrado que a amplificação deste gene constitutivo é importante para evitar resultados falsos negativo para HPV. Na análise molecular para detecção de HPV, 4,44% (2/45) das pacientes apresentaram amplificação para GP5+/GP6+, indicando infecção assintomática para HPV e ambas as pacientes apresentavam idade de 19 anos.

HPV. No entanto, os primers tipo específico utilizados (HPV 6, 11, 16 e 18) não se apresentaram amplificados. Assim, não foi possível determinar o tipo de HPV na infecção assintomática das pacientes HPV-positivas pela metodologia proposta, sugerindo ser um tipo diferente de HPV dos que foram investigados.

DISCUSSÃO

A proposta do estudo piloto foi padronizar a detecção de HPV por PCR em mulheres gestantes, usando como amostra, o escovado de cérvix uterina. Vários métodos

moleculares são utilizados na detecção de HPV como a hibridização *in situ*, entretanto a PCR demonstra resultados consistentes, por amplificar regiões conservadas do vírus utilizando primers genéricos como GP5+/GP6+, mesmo que o número de tipos virais exceda a casa da centena.

Estudos epidemiológicos demonstram que a taxa de detecção de HPV em mães e recém-nascidos varia de 4% a 87%. Adicionalmente, esses estudos confirmam que a transmissão vertical por HPV pode causar infecção das vias aéreas superiores e infecção genital em crianças (MAMMAS *et al.*, 2009). As gestantes analisadas apresentam um perfil jovem e com hábitos de vida sexual sem risco de DSTs, característico da região de moradia das pacientes. Neste contexto, apenas duas gestantes voluntárias apresentaram amplificação para o genoma do HPV. A dificuldade na genotipagem viral se deve a existência de mais de 100 tipos virais, mesmo tendo-se usado os primers tipo específicos para os tipos virais mais comuns das infecções anogenitais. Assim, não foi possível determinar se o HPV era de baixo ou alto risco oncogênico, sugerindo infecção por HPV diferente dos subtipos investigados.

O estudo de Rombaldi e Colaboradores (2009) no Sul do Brasil demonstrou a presença de DNA de HPV em amostras genitais maternas em 77,8% e destas 54,9%, os tipos virais identificados foram considerados de alto risco oncogênico. Os dados apresentados são considerados altos quando comparados com a literatura. O mesmo grupo Rombaldi e Colaboradores (2008) encontrou infecção placentária em 23,3% das gestantes avaliadas e transmissão placentária em 12,2%.

A presença de DNA de HPV na genitália materna é considerada um fator de risco que expõe o feto ao vírus. Neste contexto, Worda e Colaboradores (2005) encontraram 36,6% (56/153) de HPV positivo em genitália materna por PCR e captura híbrida e a análise estatística demonstrou a associação entre idade materna elevada e (7/34) das gestantes apresentaram amplificação do genoma viral utilizando os mesmo primers genéricos usados no estudo piloto, sendo os tipos virais de maior prevalência os de alto risco oncogênico. Quanto ao tipo viral, dados da literatura demonstram que os tipos virais mais comuns associados à infecção anogenital apresentam um percentual de 70% de gestantes, sendo que os HPVs 6/11 apresentam a prevalência de 18% e o tipo 16 com 13% (GAJEWSKA *et al.*, 2006).

A primeira meta-análise publicada na literatura sobre a transmissão vertical de HPV ao neonato demonstrou que o risco relativo em nove estudos foi de 7.3 (95% IC; 2,4-22,2) [MEDEIROS *et al.*, 2005], mesmo os dados apresentando heterogeneidade. Assim, verifica-se que a transmissão perinatal de HPV ocorre e que os neonatos apresentam um risco elevado de exposição ao HPV por parto normal em comparação a cesariana (RUFFIN *et al.*, 2006). Adicionalmente, é importante que os estudos epidemiológicos apresentem seguimento das pacientes e suas crianças por um período de pelo menos 36 meses, para ampliar as análises de infecção do neonato por transmissão vertical.

A contaminação por HPV em recém-nascido ainda apresenta controvérsias em função de alguns estudos reportarem infecção por HPV em neonatos nascidos de mães HPV-negativo (CASON; MANT, 2005). Adicionalmente, o número de estudos moleculares e transmissão vertical tem sido destaque na literatura. O objetivo então é compreender a transmissão vertical e a possibilidade da contaminação e persistência de infecção viral

do recém-nascido, que possibilita a condução de uma papilomatose laríngea e/ou papilomatose pulmonar em função do potencial oncogênico do HPV. A elucidação desta via de transmissão é de crucial importância para a prevenção da contaminação durante o parto. Um aspecto importante para diminuir a incidência destas infecções é proporcionar à população programas de vacinação para o HPV no âmbito das políticas públicas.

ASYMPTOMATIC HPV GENITAL INFECTION IN PREGNANT WOMEN: INCREASED RISK FOR VERTICAL TRANSMISSION

Abstract: more than 100 types of HPV have been identified to date. Only one third of these tend to cause anogenital, oral or laryngeal infections, with types 6, 11, and 16 predominating among these. Perinatal infection may occur via amniotic fluid during gestation and delivery and through direct exposure to cervical and genital lesions during birth. This study aimed to detect the HPV genome in pregnant women.

Keywords: Pregnants. HPV. PCR. Newborn. Vertical transmission.

Referências

BURD, E. M. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clin Microbiol Rev.* v.16, n.1, p. 1 – 17, 2003.

CASON, J.; RICE, P.; BEST, J.M. Transmission of cervical cancer-associated human papillomaviruses from mother to child. *Intervirolgy.* v.41, n.4-5, p.213-8, 2005. CASTELLSAGUÉ, X, BOSCH F. X.; MUÑOZ, N.; MEIJER, C.J.L.M.; SHAH, K.V.; SANJOSÉ, A.; ELUF-NETO, J.; NGELANGEL, C. A.; CHICHAREON, S.; SMITH, J.S.; HERRERO, R.; FRANCESCHI, S. for the International Agency for Research on Cancer (IARC) Multicentric Cervical Cancer Study Group., Male circumcision, penile human papillomavirus infection and cervical cancer in female partners. *The New Engl J of Medicine.* v.346p. 1105 – 1112, 2002.

DRAGANOV, P.; TODOROV,S.; TODOROV, I.; KARCHEV, T.,; KALVATCHEV, Z. Identification of HPV DNA in patients with juvenile-onset recurrent respiratory papillomatosis using SYBR Green real-time PCR. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* v.70, n.3, p.469-73, 2006.

ELUF NETO, J. Epidemiologia das lesões relacionadas ao HPV. In: BIBBO, M; MORAES FILHO, A. Lesões relacionadas à infecção por HPV no trato anogenital. Rio de Janeiro: Revinter, pp. 9-27, 1998.

FRISCH M, GLIMELIUS B, VAN DEN BRULE AJC, WOHLFAHRT J, MEIJER CJL, WALBOOMERS JMM, GOLDMAN S, SVENSSON C, ADAMI H, MELBYE MM. Sexually transmitted infection as a cause of anal cancer. *The New Engl J Medicine* v. 337, p.1350-1358, 1999.

GAJEWSKA M, WIELGOS M, KAMINSKI P, MARIANOWSKI P, MALEJCZYK M, MAJEWSKI S, MARIANOWSKI L The occurrence of genital types of human papillomavirus in normal pregnancy and in pregnant renal transplant recipients. *Neuro Endocrinol Lett.* v.27, p.29-534, 2006.

GHARIZADEH, B., KÄLLER, M., NYRÉN, P., ANDERSSON, A., UHLÉN, M., LUNDEBERG, J.; AHMADIAN, A. Viral and microbial genotyping by a combination of multiplex competitive hybridization and specific extension followed by hybridization to generic tag arrays. *Nucleic. Acids Res.* v.31,n.146, 2003.

HAGENSEE, M.E., YAEGASHI, N. & GALLOWAY, D.A. Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins. *J. Virol.* v.67, p. 315-322, 1993.

KRAMER, S.S.; WEHUNT, W.D.; STOCKER, J.T.; KASHIMA, H. Pulmonary manifestations of juvenile laryngotracheal papillomatosis. *Am J Roentgenol.* v.144, n.4, p.687-694, 1985.

KIRNBAUER, R., BOOY, F., CHENG, N., LOWY, D.R.; SCHILLER, J.T. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc. Natl Acad. Sci. SA.* v.89, p.12180–12184, 1992.

KUI, L.L.; XIU, H.Z.; NING, L. Y. Condyloma acuminatum and human papilloma virus infection in the oral mucosa of children. *Pediatr Dent.* v.25, n.2, p.149-53, 2003. MAMMAS, I.N.; SOURVINOS, G.; SPANDIDOS, D.A. Review: Human papilloma virus (HPV) infection in children and adolescents. *Eur. J. Pediatr.* v.168, p.267–273, 2009.

MEDEIROS, L.R.; ETHUR, A. B. M.; HILGERT, J. B.; ZANINI, R. R.; BERWANGER, O.; BOZZETTI, M. C.; MYLIUS, L. C. Vertical transmission of the human papillomavirus: a systematic quantitative review. *Cad. Saúde Pública*, v.21, n.4, p.1006-1015, 2005.

MOODY CA & LAIMINS LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature.* v.10, p. 550 560, 2010.

MUÑOZ, N. BOSCH, FX.; DE SANJOSÉ, S. HERRERO, R. CASTELLSANGUÉ, X. SAH, KV.SNIJDERS, PJF. MEIJER, CJLM for the International Agency for Research on Cancer (IARC) Multicentric Cervical Cancer Study Group. Epidemiological classification of human papillomavirus types associates with cervical cancer. *The New Engl J Med.* v.348, p. 518-527, 2003. NETO, C.A.A.; CAMPOS, R. M. C.; BASTOS, M.L. S. Papilomatose Respiratória Recorrente Com Disseminação Pulmonar – Relato de Dois Casos. *Radiol Bras.* v.35, n.2, p.117–120, 2002.

PENG, P.; WENG, X.; GU, Z. Detection of the asymptomatic infection by human papillomavirus in pregnant women and neonates. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* v.35, n.9, p.523-6, 2000.

PORNTHANAKASEM W, SHOTELERRSUK K, TERMRUNGRUANGLERT W, VORAVUD N, NIRUTHISARD, S, MUTIRANGURA A. Human Papillomavirus DNA in plasma of patients with cervical câncer. *BioMedCentral J.* v.1n. 2, p. 1471-2407, 2001.

REIS AA, BARCELOS L, DE PAULA AAP, DA CRUZ AD. Aspectos clínicos epidemiológicos do câncer de pênis. *Rev. Ciência e Saúde Coletiva.* v.15, n.1, p. 1105-1111, 2010.

REIS AAS. O papel do papilomavírus humano na carcinogênese dos tumores de pênis: uma abordagem epidemiológica e molecular. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Goiás. Goiânia, GO. 196p. 2005.

ROMBALDI R.L., SERAFINI E.P., MANDELLI J., ZIMMERMANN E., LOSQUIAVOL K.P. Transplacental transmission of human papillomavirus. *Virology Jour.* v.5, n. 106, p. 1-14, 2008.

ROMBALDI R.L., SERAFINI E.P., MANDELLI J., ZIMMERMANN E., LOSQUIAVOL K.P. Perinatal transmission o human papillomavirus DNA. *Virology Jour.* v.6, n. 83, p. 1-12, 2009.

RUFFIN, M. T.; BAILEY, J.M.; LEE, D.R.; TUCKER, ROULSTON, D.R. A.; SWAN, D.C.; UNGER, E. R. Human papillomavirus in amniotic fluid. *BMC Pregnancy Childbirth.* v.6; n.28, p.1-3, 2006.

SCHIFFMAN M & CASTLE PE. Epidemiology of Human Papillomavirus. *Arch pathol Lab Medicine.* v.127, p. 930 – 934, 2003.

SILVA AMTC, AMARAL MVT, DA CRUZ AD. 2003. HPV e Câncer (O Papel do Papiloma Vírus Humano na Carcinogênese). *Revista Biotecnologia.* v.29, p. 48-54, 2003.

TEIXEIRA JC, DERCHAIN SFM, TEIXEIRA LC, DOS SANTOS CC, PANETTA K, ZEFERINO LC. Avaliação do parceiro sexual e risco de recidivas em mulheres tratadas por lesões genitais induzidas por Papilomavírus Humano (HPV). *Revista Bras Ginecol e Obst.*v.24, n.5, p.315 – 320, 2002.

WALBOOMERS JMM, JACOBBS MV, MANOS M, BOSCH FX, KUMMER JA, SHAH KV, SNIJDERS PJF, PETO J, MEIJER CJLM, MUÑOZ N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The J Pathol.* v.189, n.1, p.12-19, 1999.

WHO (World Health Organization), WHO informal workshop: development of International HPV reference reagents.; 2 - 4 september 2001, Florianopolis, Brazil. Department of vaccines and Biologicals. Geneva: WHO Publication . v.02.14, 2002

WORDA, C.; HUBER, A.; HUDELIST, G.; SCHATTEN, C.; LEIPOLD, H.; CZERWENKA, K.; EPPEL, W. Prevalence of cervical and intrauterine human papillomavirus infection in the third trimester in asymptomatic women. *J Soc Gynecol Investig.* v.12, n. 6, p.440-4, 2005.

YU T, FERBER MJ, CHEUNG TH, CHUNG TK, WONG YF, SMITH DI. The role of viral integration in the development of cervical cancer. *Cancer Gen Cytogen.* v.158, n.1, p. 27-34, 2005.

* Recebido em: 04.03.2012.

Aprovado em: 14.03.2012.

ANGELA ADAMSKI DA SILVA REIS

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. Instituto de Ciências Biológicas (ICB)
Universidade Federal de Goiás.

LEONARDO BARCELOS DE PAULA

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo.

APARECIDO DIVINO DA CRUZ

Núcleo de Pesquisas Replicon. Departamento de Biologia da PUC Goiás.