



RESEARCH ARTICLE

OPEN ACCESS

REVISÃO COMPARATIVA DOS PRINCIPAIS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA DETECÇÃO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO NA REGIÃO CERVICAL UTERINA

***¹Suzane Meriely da Silva Duarte, ²Iolane Nayara Fontinelle Batista, ³Maria Aleksandra Cavalcante de Oliveira, ⁴Ricardo Matos de Souza Lima, ⁵Laíse Fernandes Bastos, ⁶Greg Resplande Guimarães ⁷Miquéias de Oliveira Martins, ⁸Jeferson Noslen Casarin and ⁹Hildebora Alves Carneiro Alencar**

¹Farmacêutica – docente do curso de Farmácia da Faculdade Pitágoras de Imperatriz, Instituição: Faculdade Pitágoras de Imperatriz – Maranhão, Endereço: Rua Monte Castelo, número 161, Centro, Imperatriz-Ma, CEP 65901- 580

²Discente do curso de Farmácia da Faculdade Pitágoras de Imperatriz, Instituição: Faculdade Pitágoras de Imperatriz – Maranhão, Endereço: Rua São José, Santa Rita, Imperatriz-Ma, CEP 65919- 045

³Enfermeira – coordenadora da Vigilância em Saúde/epidemiologia e imunização do município de Ulianópolis-PA, Instituição: Secretaria Municipal de Saúde de Ulianópolis-PA, Endereço: Av. Paraíba, número 442, Caminho das Árvores, Ulianópolis-PA, CEP 68632- 000

⁴Farmacêutico – farmacêutico da Farmácia Hospitalar do Hospital Municipal Infantil de Imperatriz, Instituição: Hospital Municipal Imperatriz – Maranhão, Endereço: Rua Ceará, número 1600, Nova Imperatriz, Imperatriz-Ma, CEP 65907- 090

⁵Odontóloga – docente do curso de Odontologia da Faculdade Pitágoras de Imperatriz, Instituição: Faculdade Pitágoras de Imperatriz – Maranhão, Endereço: Rua Monte Castelo, número 161, Centro, Imperatriz-Ma, CEP 65901- 580

⁶Engenheiro de Alimentos – docente do curso de Farmácia da Faculdade Pitágoras de Imperatriz, Instituição: Faculdade Pitágoras de Imperatriz – Maranhão, Endereço: Rua Monte Castelo, número 161, Centro, Imperatriz-Ma, CEP 65901- 580

⁷Farmacêutico – citopatologista do Laboratório de Análises Clínicas Citoclínica, Instituição: Citoclínica / Imperatriz – Maranhão, Endereço: Rua Marechal Castelo Branco, número 939, Centro, São Pedro da Água Branca-Ma, CEP 65920- 000

⁸Biomédico graduado pela Universidade do Oeste de Santa Catarina, Instituição: Universidade do Oeste de Santa Catarina, Endereço: Rua Benedito Leite, número 812, Centro, Imperatriz-Ma CEP 65903-290

⁹Enfermeira – especialista em Ginecologia e Obstetrícia pelo Centro Sul Brasileiro de Pesquisa Extensão, Instituição: Centro Sul Brasileiro de Pesquisa Extensão e Pós-graduação LTDA/ Joinville, Endereço: Rua 14 de julho, número 9, Jardim São Luís, Imperatriz-Ma CEP 65913-130

ARTICLE INFO

Article History:

Received 17th August, 2019

Received in revised form

26th September, 2019

Accepted 11th October, 2019

Published online 30th November, 2019

Key Words:

Identificação em infecções,
Moleculares e aperfeiçoamento,
Utilizada por comprovar sua acurácia.

*Corresponding author:

Suzane Meriely da Silva Duarte

ABSTRACT

Hoje existem várias técnicas para a identificação em infecções como o HPV. Apresentam graus de sensibilidade e especificidades altas em comparação aos testes histológico e citológicos, podem determinar o genótipo viral e assim determinar quais poderiam ter o risco maior de desenvolver o câncer. Os testes também diminuem os riscos de obter resultados falsos-negativos ou indeterminados na citologia, servindo como rastreamento em pacientes que já fazem o uso do tratamento. Enquanto exames citológicos e colposcopia sugerem um resultado, os testes de PCR e hibridização confirmam e mostram qual o genótipo viral mesmo antes de surgir uma alteração. Estando associados ocorre uma maior eficácia do rastreamento e da sensibilidade e diminuem os resultados de falsos-negativos. A preocupação acerca do aprimoramento e descoberta de novas técnicas para detecção do HPV tem sido motivo de muitas discussões da comunidade científica em torno da evolução dos testes moleculares e aperfeiçoamento das técnicas para os testes de colposcopia e citologia, de tal forma que a citologia em meio líquido tem sido cada vez mais utilizada por comprovar sua acurácia. O presente trabalho busca discutir as características das técnicas e colposcopia, citologia em meio líquido, PCR e hibridização, apontando suas vantagens e desvantagens no rastreamento das lesões precursoras para câncer cervical.

Copyright © 2019, Suzane Meriely da Silva Duarte et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Citation: Suzane Meriely da Silva Duarte, Iolane Nayara Fontinelle Batista, Maria Aleksandra Cavalcante de Oliveira, et al. 2019. "Revisão comparativa dos principais métodos diagnósticos para detecção do papilomavírus humano na região cervical uterina", *International Journal of Development Research*, 09, (11), 31701-31704.

INTRODUCTION

O estudo do carcinoma cervical denotou bastante interesse na comunidade científica desde que o pesquisador zurHausen, um médico que em meados da década de 70, sugeriu através de suas análises a associação do HPV com o câncer de colo do útero. Diversos estudos epidemiológicos, fisiopatológicos e moleculares surgiram do decorrer dos anos, o que confirma ainda mais que o HPV está totalmente envolvido na patogenicidade do câncer cervical e de suas lesões precursoras. A maioria das lesões causadas por HPV podem ser prevenidas e até controladas por meio de rastreamento, já que em média as pacientes começam a apresentar características de lesões cervicais por volta de 10 anos após o primeiro contato com o vírus (DUARTE & FARIA, 2019). Desde a descoberta da capacidade oncogênica do Papilomavírus humano (HPV), medidas foram adotadas para o diagnóstico de infecção precoce provocadas por este vírus, principalmente antes dele gerar um câncer cervical sendo importante ações de saúde publique diminuem casos deste tipo de câncer. Há vários métodos para se rastrear a infecção e o câncer cervical por HPV, dentre estes, os exames citológicos (sendo a citologia em meio líquido uma das mais utilizadas), a colposcopia e biópsias sugerem presença da infecção devido ao efeito citopático que o vírus causa, e para a identificação da tipologia do vírus outros meios de diagnósticos passam a ser uma ferramenta importante para a confirmação da infecção por HPV, pois mostram o genótipo viral (ROCHA *et al*, 2016), serão abordadas neste trabalho as técnicas de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e a Hibridização. As técnicas de biologia molecular e a engenharia genética avançaram muito nas últimas décadas, principalmente a partir da década de 60, quando a estrutura do DNA foi completamente descrita, na técnica de PCR para permitir a amplificação seletiva, é necessário desenhar dois oligonucleotídeos iniciadores (*primers* ou amplificadores), que deverão ser específicos para a sequência-alvo e apresentarem cerca de 15 a 25 nucleotídeos de extensão. Após os *primers* terem sido adicionados ao DNA molde desnaturado, ligam-se as sequências de DNA complementares especificamente ao seu local-alvo. Esses iniciadores definem a sequência a ser replicada e o resultado obtido é a amplificação de uma determinada sequência de DNA com bilhões de cópias, de modo que quando um par de oligonucleotídeos (iniciadores) se liga ao DNA alvo, a enzima Taq DNA polimerase sintetiza uma sequência complementar de DNA ao filamento de uma molécula de DNA em um lado de sequência-alvo e o outro é complementar ao outro filamento da molécula de DNA no lado oposto da sequência-alvo ((DUARTE & FARIA, 2019).

A preocupação acerca do aprimoramento e descoberta de novas técnicas para detecção do HPV tem sido motivo de muitas discussões da comunidade científica em torno da evolução dos testes moleculares, logo a introdução de novos critérios de diagnósticos mais sensíveis e específicos, tal como a captura híbrida e hibridização *in situ*, são extremamente relevantes no processo de evolução dos exames para detecção do HPV em seres humanos. Ressaltando a capacidade de precisão e rapidez dos testes moleculares, a tendência é que os laboratórios cada vez mais passem a utilizar estas técnicas como rotina de trabalho e também para a confirmação do diagnóstico do HPV (DUARTE & FARIA, 2019). O presente trabalho tem como objetivo abordar as técnicas diagnósticas mais utilizadas para detecção e identificação do HPV ou das

alterações causadas por ele, em uma perspectiva positiva de incentivar o avanço nas pesquisas a cerca da temática apresentada, evoluindo para níveis de prevenção contra o câncer cervical cada vez mais precisos.

DISCUSSÃO

Colposcopia: A colposcopia concebe uma importante colaboração na detecção das lesões precursoras para câncer de colo do útero. Como é baseada em interpretações subjetivas do colposcopista, esta técnica sofre as mesmas críticas que a interpretação do exame de Papanicolaou e do exame da biópsia, logo não caracteriza a real presença do vírus do HPV. O índice colposcópico de Reid (ICR) é um método que tem como finalidade estabelecer padrões de gravidade de uma lesão pré-maligna do colo uterino detectada por exame de colposcopia. O índice categoriza quatro achados colposcópicos a serem considerados: margem da lesão, reação ao ácido acético, características dos vasos e impregnação com solução de lugol. O ICR pode prenunciar a classificação histológica da patologia cervical, permitindo a diferenciação entre baixo grau e alto grau da lesão cervical. Através destes parâmetros é permitido que o examinador formule a impressão colposcópica e realize a biópsia na região mais alterada do colo uterino (ROBIAL *et al*, 2006). A história da colposcopia remonta a meados do século XIX, no entanto somente quase um século depois Hans Hinselmann, que era um médico formado pela Universidade de Kiel na Alemanha, contribuiria concisamente para os avanços no estudo do colo uterino ao desenvolver a colposcopia propriamente dita. Hinselmann acreditava que o diagnóstico precoce do câncer de colo do útero fosse o interesse maior dos investigadores dos assuntos, pois em estágio avançado o tratamento e a cura seriam mais difíceis de êxito. A literatura desta época a cerca das neoplasias cervicais era bastante escassa, ainda mais em relação as alterações iniciais, que eram consideradas difíceis de interpretar em exames clínicos (NAUD *et al*, 2006).

A nomenclatura utilizada para a descrição dos achados colposcópicos foi um dos principais empecilhos para a colposcopia, logo estabelecer terminologias adequadas dependia da observação subjetiva e da opinião individual do profissional executor da análise (NAUD *et al*, 2006). Toda via, no argumento de Hinselmann, se era possível reconhecer uma lesão de cerca de 1mm a olho nu, seria também possível o reconhecimento na extensão de 0,1mm com o emprego de um material óptico que permitisse um aumento de 10 vezes na área visualizada. Foi com base nesta ideia que o médico, apoiado pela empresa óptica Zeiss, desenvolveu um aparelho que tinha como objetivo aumentar e detalhar a visão do colo uterino chamado colposcópico. Hinselmann afirmou em seus estudos e divulgação do método, que o tumor, ou o câncer, nunca poderia evoluir decélulas normais, pois havia a necessidade de estados de transição, que identificassem alguma alteração na estrutura e reprodução celular que, no caso do câncer do colo do útero seriam as “zonas matrizes”. Essas lesões precursoras, que indicavam a possibilidade de desenvolvimento de um estado cancerígeno, seriam reconhecidas pelo colposcópico, o que permitiria o estudo das alterações microscópicas (LANA, 2015). A introdução e difusão da colposcopia em países da América do Sul como Argentina, Brasil e Chile ocorreu quase que instantaneamente à criação e difusão da ferramenta na Alemanha, em que o colposcópico foi utilizado, de modo geral, de forma conjunta à citologia, ou mesmo como carro chefe das ações de controle da doença.

Esta especificidade em relação ao uso da colposcopia como primeira ferramenta de diagnóstico foi designada pela literaturacomo “exceção latino-americana”. No Brasil, a instituição pioneira na introdução e difusão das tecnologias de diagnóstico do câncer do colo do úterofoi o Instituto de Ginecologia no Rio de Janeiro, sob a direção do médico ginecologista Arnaldo de Moraes. Emlinhas gerais, as diretrizes das ações de controle do câncer do colo do útero no Brasil até os anos 1960 se basearam no chamado “modelo triplo”, que consistia no exame sistemático a toda paciente que buscasse atendimento, independentemente das queixas apresentadas, com o recurso aos três métodos para diagnóstico: colposcopia, citologia e biópsia. O discurso que fundamentava a estratégia era de que o uso conjunto aumentava as possibilidades reais de detecção de lesões no colo uterino e a realização do diagnóstico precoce da doença (LANA, 2016). Por fim, recentemente, alguns autores têm se referido ao estudo da colposcopia como uma técnica concorrente ao Papanicolaou que teve grande utilização na Alemanha e no Cone Sul da América Latina, apontando os caminhos que fizeram com que essa técnica tivesse sua utilização limitada a essas regiões, no entanto no Brasil o método teve uma introdução “tardia”, quando comparada à sua difusão em outros territórios, como alguns países latino-americanos, sendo ainda possível perceber que a tecnologia foi utilizada na detecção precoce do câncer do colo do útero, principalmente como recurso complementar sob a defesa de propiciar maior precisão no diagnóstico, não descartando o exame citológico e seu valor preditivo (LANA, 2016).

Citologia em meio líquido: A citologia em meio líquido surgiu para atender a demandas tecnológicas. Para que leituras em lâminas fossem viáveis em computadores, eram preparados em menores números de sobreposições celulares. Martins (2016), afirma que a citologia em meio líquido é um resultado de uma década para um preparo de excelência na fixação, preservação celular sendo denominado um grande estudo molecular. Foi desenvolvida para tentar diminuir erros da citologia convencional por apresentar melhores disposições celulares, facilidade na interpretação, reduzir a quantidade de hemácias, exsudato inflamatório e muco. Fora isso é uma metodologia que permite uma melhor randomização em células transferidas para lâminas, contendo um aproveitamento do todo o material contido e conseqüentemente evitando a perda de amostras celulares (SILVA *et al*, 2018). Desde a década de 90, a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou a metodologia de base líquida como uma segunda alternativa para o exame de Papanicolaou convencional no rastreamento do câncer cervical. De forma adicional, além de uma melhor avaliação para os citologistas, a ela ainda proporciona um único meio de coleta que preserva os ácidos nucléicos das amostras, permite o transporte e armazenamento à temperatura ambiente e alguns tipos de algoritmos que são incluídos os do HPV (MARTINS, 2016). A amostra é mergulhada em um líquido a base de metanol contido num tubo fechado e logo em seguida o líquido é centrifugado ou homogeneizado para depois passar pela filtração, o material residual dos filtros: as células epiteliais são dispostas numa lâmina para serem observadas e analisadas (HEISE & LIMA, 2016).

Técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR): Considerado um teste de padrão-ouro para detectar o DNA do HPV, a reação em cadeia da polimerase (PCR), é um método de amplificação de DNA e RNA *in vitro* descrito pela primeira vez na década de 1980 por Kary Mullis e é uma das técnicas

mais comuns em laboratórios em pesquisas biológicas e médicas (PAES *et al*, 2015; ROCHA *et al*, 2016). Em processos de infecções pelo HPV, o vírus adentra as células basais do epitélio cervico vaginal integrando suas proteínas no núcleo da célula hospedeira codificando suas proteínas onde elas se incorporam no DNA celular normal transmitindo os genes do HPV (DE OLIVEIRA, MUTRAM & SANTANA, 2017). No caso do HPV a amplificação do PCR de acordo ROCHA *et al* 2016, é utilizado o sequenciamento de alvos de oligonucleotídeos (*primers*) que permitirá amplificar o DNA dos diferentes genótipos do vírus. Com o DNA amplificado a PCR será analisada em diferentes formas: pela eletroforese em gel; hibridização em pontos e pelo sequenciamento direto do DNA. Para a identificação molecular do HPV por PCR, ocorrem enormes combinações de oligonucleotídeo para amplificação do DNA-HPV nas diversas regiões do genoma viral. Aqueles que são mais empregados são MY09/11, GP5/GP6, GP5+/GP6+, LC1/LC2, P6MY, pU-1m/pU-2r, LCR-E7, E6CF4/E7CRS e a região E1. Outra abordagem na identificação do HPV é através da sequência direta do PCR sendo o alvo o genoma do vírus. Descrito inicialmente por Sanger o sequenciamento do DNA vem sendo utilizado como meios de estudos para a genotipagem viral, identificando todos os casos raros e novos de genótipo (ROCHA *et al*, 2016; BERNADY *et al*, 2018). A pesquisa se realiza com PCR utilizando os primers para identificar os alvos de regiões do genoma viral, seguida pela reação do sequenciamento na busca para descobrir as sequências da base, e em seguida as sequências encontradas do DNA serão processadas em um banco de dados que contém todos os diversos genótipos do HPV. A reação de PCR ocorre em um equipamento chamado de termociclador, no qual o usuário pode alterar os parâmetros como tempo, temperatura e a quantidades de ciclos. Cada ciclo é composto por etapas sendo elas a desnaturação, anelamento e extensão (PAES *et al*, 2015; ROCHA *et al*, 2016).

Hibridização

A captura híbrida é uma técnica molecular de hibridização, onde amplifica os sinais híbridos formados em seguida sendo feita a leitura. É uma técnica bastante utilizada no Brasil para detecção do vírus do HPV, em amostras do colo uterino. Sendo o primeiro teste licenciado e aprovada pela Food Drug and Administration – FDA em 2003 e aprovado sua utilização pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, foi o primeiro teste a chegar no mercado, utilizado no mundo todo também para identificar outros tipos de patógenos como *Clamidia Trachomatis*, *Neisseria Gonorrhoeae* e Herpes vírus (PAES *et al*, 2015; ROCHA *et al*, 2016; MARTINS, 2016). Na técnica de captura híbrida o DNA do vírus é hibridizado com múltiplas sondas de RNA dos genótipos do HPV sendo 18 específicas, em tubos de ensaio com uma solução tampão, não marcada. Essas sondas de RNA detectam os dois grupos do HPV, sendo os de baixo ou alto risco. Esta técnica distingue em dois grupos o A e B: os do grupo A reconhecem os genótipos de baixo risco do HPV; e os do grupo B são considerados de alto risco. Seu diagnóstico se deve ao fato dos DNA/RNA serem capturados em superfícies de uma microplata revestida de anticorpos de captura específica, que serão expostos a um anticorpo conjugado a fosfatase alcalina e detectadas por um sinal de amplificação quimioluminescente. Seus resultados são em valores em unidade relativa à luz – RLU (ROCHA *et al*, 2016). A hibridização *in situ* inicialmente utilizava corantes radioativos, mas foram substituídas por corantes fluorescentes

depois de alguns anos. Os fluorocromo tornou a técnica mais prática, rápida e amplamente aplicada para as detecções cromossômicas (DORFMAN, 2018). Os testes utilizam seqüências específicas de DNA ou RNA usando sondas (complementar de ácidos nucleicos). Podendo utilizar em materiais de raspados citológicos, ou em biopsias congeladas, e permite a localização dos DNA/RNA nas células definidas as suas formas específicas (MARTINS, 2016).

Conclusão

Ao longo dos anos as pesquisas a cerca das lesões precursoras para câncer de colo de útero se tornaram alvo para pesquisadores do mundo inteiro, tendo em vista que tratar as infecções provocadas por HPV em sua fase inicial são mais simples de tratar em relação ao carcinoma já instalado. Neste trabalho discutiu-se as técnicas de colposcopia, citologia em meio líquido, reação em cadeia de polimerase e hibridização, visto que dentre as tantas técnicas utilizadas para rastreamento do HPV, estas estão entre as mais utilizadas. No entanto, a colposcopia e a citologia em meio líquido apontam características celulares de reatividade por HPV, mais não podem identificar de fato a genética do vírus, pois tratam-se de exames diagnósticos de análise subjetiva, baseados na morfologia do tecido e das células presentes na camada cervical vaginal. Já as PCR e os testes de hibridização, são testes moleculares perfeitamente capazes de identificar a tipologia dos vírus presentes no organismo do hospedeiro, o que é importante, visto que os HPVs são classificados em baixo e alto risco oncogênico, entretanto tem custo elevado, por se tratarem de técnicas que requerem equipamentos e reagentes de maior valor aquisitivo. Contudo todas as técnicas expostas têm sua contribuição na detecção precoce do HPV ou das lesões patognomônicas do vírus, pois não se pode deixar de comentar que exames como colposcopia e citologia em meio líquido já salvaram centenas de mulheres pelo mundo ao se identificar lesões precursoras para o câncer cervical. E os testes diagnósticos de PCR e hibridização por terem a capacidade de identificar a tipologia viral, são profundamente utilizados em pesquisas no intuito de se descobrir as características patológicas do vírus e assim criar mecanismo de defesa contra eles, como é o caso da criação da vacina contra o HPV.

REFERÊNCIAS

BERNARDY, João Pedro *et al.* Padronização da PCR em tempo real para a genotipagem de HPV 6-11, HPV 16 e HPV 18 utilizando controle interno. *Revista Jovens Pesquisadores*, v. 8, n. 1, p. 37-48, 2018.

- DE OLIVEIRA, Joseana; MUTRAN, Tangara Jorge; SANTANA, Vinicius Canato. Prevalência de HPV em amostras cervicovaginais sem alterações citológicas. *Arquivos de Ciências da Saúde*, v. 24, n. 1, p. 47-51, 2017.
- DO CARMO, Emily Francini Silva; FIORINI, Adriana. Principais técnicas moleculares para detecção do papilomavírus humano. *Sabios-Revista de Saúde e Biologia*, v. 2, n. 1, 2007.
- DORFMAN, Luiza Emy. Implementação da produção de sondas de DNA para hibridização in situ fluorescente. 2018. Tese de Doutorado.
- DUARTE, Suzane Meriely da Silva; FARIA, Felipe Venancio. *Fisiopatologia do Papilomavírus Humano: base teóricas e práticas*. Goiânia: Editora Espaço Acadêmico. 2019.
- HEISE, Amanda; LIMA, Ana Paula Weinfurter. Citopatologia convencional e Citologia em meio líquido: uma revisão integrativa. *Revista Saúde e Desenvolvimento*, v. 10, n. 5, p. 208-221, 2016.
- LANA, Vanessa *et al.* A colposcopia no diagnóstico precoce do câncer do colo do útero: a experiência norte-americana. *Revista Brasileira de História da Ciência*, v. 8, n. 1, p. 39-50, 2015.
- MARTINS, Toni Ricardo. Citologia líquida e teste molecular para HPV de alto risco: avaliação de novas modalidades de rastreamento para prevenção de câncer de colo do útero na rede pública de Saúde do Estado de São Paulo. 2016. *Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo*.
- NAUD, Paulo Sergio Viero *et al.* História da colposcopia: do invento de Hinselmann aos ensaios clínicos atuais. *Femina. Rio de Janeiro*. Vol. 34, n. 9 (set. 2006), p. 597-605, 2006.
- PAES, Eliana Ferreira *et al.* Desenvolvimento de um teste biomolecular para detecção de HPV em amostras cervicouterinas: descrição do método e avaliação inicial. 2015.
- ROBIAL, Renata; RAMA, Cristina Helena; ROTELI-MARTINS, Cecília M. O Desempenho da colposcopia através do índice de Reid. *Femina*, p. 681-685, 2006.
- ROCHA, Bruno Garcia *et al.* Desenvolvimento de metodologias para identificação molecular do HPV. 2016.
- SILVA, Ruan Carlos Gomes da *et al.* Desempenho da citologia em meio líquido na identificação de agentes microbiológicos cérvico-vaginais. *Rev. bras. anal. clin.*, p. 130-134, 2018.
