

Identificação do papilomavírus humano por biologia molecular em mulheres assintomáticas

Genital human papillomavirus infection identification by molecular biology among asymptomatic women

Bernadete Nonnenmacher^a, Vanessa Breitenbach^{a*}, Luisa Lina Villa^b, João Carlos Prolla^c e Mary Clarisse Bozzetti^c

^aUniversidade Luterana do Brasil. Canoas, RS, Brasil. ^cInstituto Ludwig de Pesquisa do Câncer. São Paulo, SP, Brasil. ^cDepartamento de Medicina Social da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brasil

Descritores

Papilomavírus humano.[#] Infecções por papovaviridae, epidemiologia.[#] Infecções tumorais por vírus, epidemiologia.[#] Neoplasias do colo uterino, prevenção e controle.[#] Fatores socioeconômicos.[#] Estudos transversais. Comportamento sexual.

Resumo

Objetivo

Verificar a associação entre fatores epidemiológicos e infecção genital pelo papilomavírus humano (HPV).

Métodos

Realizou-se estudo transversal com 975 mulheres atendidas em um serviço público de rastreamento para o câncer cervical, em Porto Alegre, Brasil. As mulheres foram consideradas infectadas pelo HPV quando apresentaram o teste de DNA positivo para esse vírus, tanto pelo método de captura híbrida II (CH II) como pelo método de reação em cadeia da polimerase (PCR). Mulheres infectadas pelo HPV foram comparadas com mulheres não infectadas oriundas da mesma população.

Resultados

Foram estudadas 975 mulheres. A prevalência observada de HPV (pela combinação dos métodos de DNA) foi de 27%. Quando a análise de cada método de DNA foi feito isoladamente, a prevalência de HPV-DNA foi de 15% para a CH II e de 16% para PCR. Regressão logística múltipla incondicional foi utilizada na identificação dos fatores associados à infecção pelo HPV. Foi encontrada associação positiva com as seguintes variáveis: anos de escolaridade (11 anos: OR=2,05; IC95%=1,31; 3,20; referência: até oito anos de escolaridade); ser casada (OR=1,69; IC95%=0,78; 2,00; referência: ser solteira); parceiros sexuais ao longo da vida (dois parceiros: OR=1,67; IC95%=1,01; 2,77; quatro ou mais: OR=2,18; IC95%=1,15; 4,13; referência: um parceiro); idade da primeira relação sexual (15-16 anos: OR=4,05; IC95%=0,89; 18,29; referência: ≥22 anos).

Conclusões

Vários fatores parecem estar associados à presença de infecção genital pelo HPV, especialmente aqueles referentes ao comportamento sexual (idade da primeira relação sexual, número de parceiros sexuais ao longo da vida e estado marital) e aqueles relacionados à situação socioeconômica (escolaridade).

Correspondência para/Correspondence to:

Bernadete Nonnenmacher
Rua Ramiro Barcelos, 910/403
90035-001 Porto Alegre, RS, Brasil
E-mail: bernadet@zaz.com.br

*Aluna bolsista de Iniciação Científica da Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS). Subvencionado pela FAPERGS – Processo nº 98/50616.0.
Recebido em 23/4/2001. Reformulado em 17/10/2001. Aprovado em 14/11/2001.

Keywords

*Papillomavirus, human.[#]
Papovaviridae infections,[#]
epidemiology.[#] Tumor virus infections,
epidemiology.[#] Cervix neoplasms,
prevention and control.[#]
Socioeconomic factors.[#] Cross-
sectional studies. Sexual behavior.*

Abstract**Objective**

To evaluate whether epidemiological factors may be associated to genital human papillomavirus (HPV) infection.

Methods

A cross-sectional study was carried out among 975 women seen at a public health service for cervical cancer screening in Porto Alegre, Brazil. Women were considered infected if tested positive to HPV either by Polymerase Chain Reaction (PCR) or Hybrid Capture II (HC-II) methods. Women with genital HPV infection were compared to women without infection drawn from the same population.

Results

The study enrolled 975 women. The HPV prevalence (both methods combined) in this population was 27%. However, when each diagnostic method is analyzed separately, HPV prevalence was 15% and 16% for HC-II and PCR, respectively. Unconditional multiple logistic regression was used to correlate disease status to women characteristics. A positive association was found with HPV infection for the following variables: years of schooling (11 years: OR=2.05; 95%CI =1.31; 3.20), married (OR=1.69; 95%CI=0.78; 2.00), number of lifetime sexual partners (2 partners: OR=1.67; 95%CI=1.01; 2.77; 4 or +: OR=2.18; 95%CI=1.15; 4.13), age at first intercourse (15-16 years: OR=4.05; 95%CI=0.89; 18.29).

Conclusions

Various factors may contribute to genital HPV infection, especially those related to sexual behavior (young age at first intercourse, high number of lifetime sexual partners, and marital status), and those related to social and economic status (years of schooling).

INTRODUÇÃO

A infecção pelo papilomavírus humano (HPV) é altamente prevalente, sendo detectada em aproximadamente 10% a 20% da população sexualmente ativa entre 15 e 49 anos de idade.¹⁰

A introdução de testes mais acurados para a detecção do DNA do HPV em investigações epidemiológicas⁷ permitiu confirmar a importância do HPV, principalmente dos tipos de alto risco, como o principal fator de risco para o desenvolvimento de neoplasia intra-epitelial cervical e câncer do colo uterino.^{2,11,16} Os fatores de risco clássicos para essa neoplasia são basicamente os mesmos relacionados à infecção pelo HPV. Dentre eles, destacam-se: apresentar início precoce para as relações sexuais, ter vários parceiros sexuais ao longo da vida e paridade elevada (partos não cirúrgicos), ser jovem, ter hábito de fumar e ser de baixo nível socioeconômico, sendo os dois primeiros fatores os mais consistentes.^{1,8} Estes têm sido considerados até mesmo independentes da infecção pelo HPV para o desenvolvimento de neoplasia cervical. A literatura cita também fatores de risco considerados menores, como uso de anticoncepcional oral por muitos anos,^{17,18} deficiências nutricionais,³ infecção pelo HIV (vírus da imunodeficiência humana)^{9,14} e outras infecções genitais causadas por agentes sexualmente transmissíveis (*Chlamydia trachomatis*, *Herpes simplex virus*).⁶

A presença de HPV de alto risco, de carga viral alta e de infecção persistente são fatores de risco para progressão de neoplasia intra-epitelial cervical para câncer invasor.^{5,17} Tais fatores, como os marcadores virais, não são considerados importantes em programas em que o rastreamento é rotina, pois são de baixo valor preditivo. Entretanto, outros marcadores intermediários associados à progressão dessas lesões causadas pelo HPV devem ser investigados e identificados.⁴

O presente estudo teve como objetivo identificar fatores associados à infecção genital pelo HPV em mulheres assintomáticas.

MÉTODOS

Realizou-se estudo transversal com 975 participantes entre 15 e 70 anos, oriundas de um programa de rastreamento para o câncer cervical da Liga Feminina de Combate ao Câncer, cujo chamamento é feito regularmente pela mídia. Após receber informações sobre o estudo, essas mulheres deram seu consentimento por escrito para participação na pesquisa. Foram excluídas todas as mulheres com história prévia de histerectomia ou conização. O cálculo amostral foi realizado considerando-se uma prevalência de HPV de 20%, de anormalidades cervicais de 10%, erro tipo I de 5%, poder de 70% para detectar uma razão de chances de 3,0. Por meio de uma escova cervical, foram coletadas células da junção escamo-

colunar introduzidas em uma solução salina. Cada amostra, congelada a 80 C negativos, foi dividida em dois tubos para posterior análise do DNA viral, uma pelo método de reação em cadeia da polimerase (PCR) e outra pelo método de captura híbrida II (CHII).

As mulheres foram consideradas infectadas pelo HPV quando identificada a presença de DNA viral pelo método da PCR e/ou pelo método da CH II.

A tipagem do DNA viral foi realizada por dois métodos: o de CH II,¹² que identifica o DNA viral de papilomavírus considerados de alto risco para câncer cervical, e o de PCR.¹³

Na detecção do DNA de HPV pela PCR, utilizaram-se os “primers” MY 09/11, que amplificam uma região muito conservada de 450 pares de bases (pb) do gene L1 de HPV (Bauer et al,¹ 1991). Foram realizadas as seguintes etapas: amplificação do DNA-alvo pela reação de PCR na presença de uma mistura de oligonucleotídeos iniciadores específicos (MY09 e MY11); DNA polimerase termoestável de *Thermotoga aquaticus* – Taq DNA polimerase (CENTIBIOT, Brasil); quatro desoxirribonucleotídeos; e um tampão contendo 3 MgCl₂, juntamente com dois oligonucleotídeos – G-73² e G-74 –, que amplificam para o gene da beta-globina (268 pares de base) e representam o controle interno da reação para avaliação da integridade e da suficiência de DNA de cada amostra para a amplificação.

As amostras de DNA por PCR foram processadas em conjunto pelo Laboratório Simbios, em Porto Alegre, e pelo Instituto Ludwig de Pesquisa Contra o Câncer, em São Paulo. As mesmas amostras foram testadas para DNA por captura híbrida II pelo Laboratório Digene nos Estados Unidos da América.

Para a detecção do DNA viral por captura híbrida, o material para a análise passou por cinco procedimentos: desnaturação, hibridização, captura de híbridos, reação dos híbridos com o conjugado e detecção dos híbridos por quimioluminescência. Reagindo com sonda gênica específica, o material forma híbridos de RNA/DNA capturados por anticorpos que revestem as paredes dos tubos. A seguir, os híbridos imobilizados reagem com anticorpos específicos conjugados à fosfatase alcalina, formando um substrato estável, e são detectados por quimioluminescência ultra-sensível. Com essa metodologia, pode-se conhecer o resultado em seis horas. Todos os testes de captura híbrida são, ao mesmo tempo, qualitativos e quantitativos.¹²

Informações sobre potenciais fatores associados à

infecção pelo HPV e ao câncer cervical foram coletadas por um entrevistador por meio de um questionário padronizado, sempre que a candidata elegível aceitava participar do estudo. Esses fatores foram: idade, raça, escolaridade, renda, tabagismo, estado marital, paridade, método contraceptivo, exame papanicolaou alterado no passado, número de parceiros sexuais ao longo da vida e nos últimos seis meses, idade da primeira relação sexual e passado de infecção ginecológica.

A coleta de células do colo uterino para o exame papanicolaou foi realizada por escova. O resultado da citologia das pacientes foi revisado cegamente por dois citopatologistas. Foram considerados positivos os exames alterados na primeira ou na segunda revisão citológica, e os resultados foram expressos segundo a Classificação Internacional de Bethesda.¹⁵

A análise das variáveis categóricas foi realizada pelo teste qui-quadrado de Pearson convencional. Regressão logística simples foi utilizada para estimar a magnitude das associações (razões de chance) com correspondente intervalo de confiança de 95%. O nível de significância alfa pré-fixado foi de 0,05.

O protocolo da investigação foi analisado e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (protocolo número 056/94).

RESULTADOS

Em relação à tipagem viral do DNA para o HPV nas 975 mulheres, 15% dos casos testaram positivo para o CH II, enquanto 16% testaram positivo pelo método PCR (na associação dos métodos, 27% das pacientes foram positivas para DNA do HPV).

Com relação aos correlatos epidemiológicos da infecção genital pelo HPV, a Tabela 1 descreve os achados da comparação dos grupos HPV/DNA positivo e negativo em relação às variáveis encontradas. Observa-se uma frequência aumentada de positividade para o HPV em mulheres mais jovens, com maior escolaridade, casadas ou divorciadas, nulíparas, com maior número de parceiros sexuais ao longo da vida, com idade precoce de início das relações sexuais e com citologia cervical mostrando lesão cervical de baixo e alto graus, que agrupam as neoplasias intra-epiteliais cervicais de graus I (baixo grau), II e III (alto grau).

A Tabela 2 descreve as razões de chance estimadas para os fatores estudados em relação à presença do HPV na cérvix uterina e seus respectivos intervalos

Tabela 1 - Correlatos epidemiológicos de ordem sociodemográfica, saúde reprodutiva e citológicos da infecção genital pelo HPV (N=975).

Variável	Categoria	% HPV/DNA Positivo	% HPV/DNA Negativo	Valor de p
Idade	≤24	27,9	72,1	0,00159
	25-34	17,0	83,0	
	35-49	12,6	87,4	
	≥50	14,4	85,6	
Escolaridade	Primário	12,0	88,0	0,00001
	Secundário	24,6	75,4	
	Universitário	24,5	75,5	
Estado civil	Solteira	66,3	33,7	<0,00001
	Casada	87,1	12,9	
	Divorciada	87,8	12,2	
	Viúva	76,6	23,4	
Paridade	0	31,6	68,4	<0,00001
	1	15,5	84,5	
	2	13,0	87,0	
	≥3	11,3	88,7	
	≥4	25,5	74,5	
Número de parceiros sexuais na vida	1	11,4	88,6	0,004
	2	18,4	81,6	
	3	21,7	78,3	
	≥4	25,5	74,5	
Idade na 1ª relação sexual	≤14	5,6	94,4	0,1122
	15-16	19,3	80,7	
	17-18	18,3	81,7	
	19-21	13,0	87,0	
	≥22	14,1	85,9	
Citologia	Negativa	13,8	86,2	<0,00001
	ASCUS	26,8	73,2	
	LEIBG	55,0	45,0	
	LEIAG	50,0	50,0	
	Outros	30,8	69,2	

ASCUS - "Atypical squamous cells of undetermined significance" (atipias de células escamosas de significado incerto)

LEIBG - Lesão escamosa intraepitelial de baixo grau

LEIAG - Lesão escamosa intraepitelial de alto grau

de confiança de 95% (IC95%). Ao controlar o efeito de potenciais variáveis de confusão, observa-se que permanecem significativamente associados à infecção genital para HPV as variáveis escolaridade, para a qual mulheres com nível secundário apresentam uma associação positiva com a doença quando comparadas às mulheres com nível inferior ao primário; mulheres casadas também têm associação positiva com a infecção quando comparadas às solteiras; quanto maior o número de parceiros sexuais ao longo da

vida maior a associação com a doença, sendo que os achados mostram uma tendência linear positiva e significativa ($p=0,03$). A associação também parece ser maior e positiva nas mulheres que iniciaram a vida sexual mais precocemente, porém a significância foi limítrofe ($0,05 < p < 0,10$).

DISCUSSÃO

Quanto à concordância entre os dois métodos de

Tabela 2 - Razões de chance dos fatores estudados em relação à infecção genital pelo HPV. Resultados por regressão logística múltipla (N=975).

Variável	Categoria	Análise ajustada HPV/DNA	
		RC	IC(95%)
Escolaridade	≤Primário	1,0	-
	Secundário	2,05	1,31-3,20
	Universitário	1,38	0,63-3,04
Estado civil	Solteira	1,0	
	Casada	1,24	0,78-2,0
Paridade	0	1,0	
	1	2,12	1,08-4,17
	2	1,23	0,68-2,22
	≥3	1,17	0,67-2,03
Número de parceiros sexuais na vida	1	1,0	
	2	1,67	1,01-2,77
	3	1,84	0,99-3,43
	≥4	2,18	1,15-4,13
Idade da primeira relação sexual	≤14	1,0	
	15-16	4,05	0,89-18,29
	17-18	3,59	0,80-16,05
	19-22	3,02	0,66-13,87
	≥22	3,08	0,65-14,60

RC - Razões de chance ajustadas para idade, história prévia de CP (exame citopatológico) alterado, uso de contraceptivos, história prévia de infecção genital pelo HPV e as demais variáveis da tabela.

tipagem viral do DNA do HPV, observou-se que a maioria dos 15% de casos que testaram positivo para a CH II não foram os mesmos 16% que testaram positivo pelo método PCR. Isto pode ser explicado pela diferença entre os métodos, já que o CH II utilizado testa apenas tipos de HPV de alto grau (16, 18 entre outros) e o PCR identifica HPV de alto grau e de baixo grau, ou seja, todos os tipos de HPV presentes nas células cervicais.

Para a análise dos correlatos epidemiológicos, utilizaram-se os resultados que mostravam positividade em pelo menos um dos métodos para caracterizar as mulheres positivas ao HPV e negatividade a ambos os métodos para identificar as mulheres negativas ao HPV. Segundo esse critério, a prevalência de infecção genital pelo HPV observada foi de 27%. Esse achado é mais elevado que os achados da literatura, e poderia ser justificado pelo maior número de mulheres jovens nas quais se observa uma maior prevalência de HPV.

A maioria das variáveis que se mostram significativamente associadas à infecção genital pelo papilomavírus humano (HPV-DNA positivas) está em concordância com achados de outros estudos da literatura.^{7,8,10,11,16,17} Os resultados do presente estudo sugerem que mulheres com início de vida sexual precoce e com maior número de parceiros sexuais ao longo da vida estão positivamente associados à infecção genital pelo HPV. Esperava-se que as mulheres casadas (aqui definidas como as com união estável há mais de 12 meses) estivessem associados negativamente à infecção genital pelo HPV, porém o resultado foi inverso. Uma possível explicação para esse fato seria que as solteiras, pelo fato de se exporem a um

maior número de parceiros sexuais, estariam utilizando métodos de barreira (tipo condom), o que protegeria também para a infecção pelo HPV. Já as mulheres casadas, por terem uma vida sexual mais estável, com menos troca de parceiros, não se preocupariam em utilizar métodos de barreira, e sim em usar anticoncepcional oral (ACO) com a finalidade de controle da natalidade – o uso desse método também está descrito na literatura^{8,10,18} como fator associado a essa infecção. Além disso, também deve ser considerada a possibilidade de o parceiro ser promíscuo e, assim, contribuir para essa associação positiva observada entre infecções pelo HPV – tipagem viral e mulheres com união estável.

Um achado que contradiz a maioria dos trabalhos publicados é referente ao nível de escolaridade, pelo qual se observou que as mulheres com mais anos de escolaridade estão positivamente associadas à infecção quando comparadas às de menor tempo de escolaridade. Uma explicação para esse fato poderia ser que mulheres com maior escolaridade teriam mais acesso à informação e poderiam utilizar métodos adequados para a prevenção dessa infecção ou poderia também ser resultado de um efeito amostral em que se observa uma menor frequência de HPV genital nas mulheres com menor escolaridade.

Em conclusão, o presente estudo reforça o importante papel de fatores ligados ao comportamento sexual e socioeconômico para a infecção genital pelo HPV, sugerindo que o câncer derivado dessa infecção poderia ser potencialmente previsível com melhor orientação dessas mulheres por programas que envolvam aspectos de educação sexual e com a melhoria do nível socioeconômico da população.

REFERÊNCIAS

1. Bauer HM, Ting Y, Greer CE, Chambers JC, Tashiro CJ, Chimera J et al. Genital human papillomavirus in female university students as determined by PCR-based method. *JAMA* 1991;265:472-7.
2. Bosh FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:796-802.
3. Butterworth CE-Jr, Hatch KD, Macaluso M, Cole P, Sauberlich HE, Soong SJ et al. Folate deficiency and cervical dysplasia. *JAMA* 1992;267:528-33.
4. Coutlée F, Mayrand MH, Provencher D, Franco E. The future of HPV testing in clinical laboratories and applied virology research. *Clin Diagn Virol* 1997;8:123-41.
5. Cox JT, Lorincz AT, Schiffman MH, Sherman ME, Cullen A, Kurman RJ. Human papillomavirus testing by hybrid capture appears to be useful in triaging women with a cytologic diagnosis of atypical squamous cells of undetermined significance. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172:946-54.
6. Franco EL. Viral etiology of cervical cancer: a critique of the evidence. *Rev Infect Dis* 1991;13:1195-206.
7. Franco EL. Cancer causes revisited: human papillomavirus and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:779-80.
8. Hildesheim A, Gravitt PE, Schiffman MH, Kurman RJ, Barnes W, Jones S et al. Determinants of genital HPV infection in low-income women in Washington, DC. *Sex Transm Dis* 1993;29:279-85.

9. Ho GYF, Burk RD, Fleming I, Klein RS. Risk of genital human papillomavirus in women with human immunodeficiency virus-induced immunosuppression. *Int J Cancer* 1994;56:788-92.
10. Koutsky LA, Galoway DA, Holmes KK. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Epidemiol Rev* 1998;10:122-63.
11. Lorincz AT, Reid R, Jenson B, Greenberg MD, Lancaster W, Kurman RJ et al. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* 1992;79:328-37.
12. Lorincz AT. Hybrid capture method for detection of human papillomavirus DNA in clinical specimens. *Papillomavirus report* 1996;7:1-5.
13. Manos MM, Ting Y, Wright DK et al. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomavirus. In: Furth M, Greaves M, editors. *Molecular diagnostics of cancer: cancer cells*. New York: Cold Spring Harbor Press; 1989. v.17. p. 209-14.
14. Matorras R, Ariceta JM, Rementeria A, Corral J, Gutierrez de Teran G, Diez J et al. Human immunodeficiency virus-induced immunosuppression: a risk factor for human papillomavirus infection. *Am J Obstet Gynecol* 1991;164(1Pt 1):42-4.
15. National Cancer Institute Workshop. The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnosis. *Acta Cytol* 1989;33:567-74.
16. Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN. Epidemiological evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasias. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:958-64.
17. Schiffmann MH, Brinton LA. The epidemiology of cervical carcinogenesis. *Cancer* 1995;76:1888-901.
18. WHO Collaborative Study of Neoplasia and Steroid Contraceptives. Invasive squamous-cell cervical carcinoma and combined oral contraceptives: results from a multinational study. *Int J Cancer* 1993;55:228-36.