

Aplicação do método PCR-RFLP para tipagem de HPV em infecções cervicais de pacientes atendidas no Lepac, Universidade Estadual de Maringá

Edilson Nobuyoshi Kaneshima*, Carlos Cristiano de Godoi Bidoia, Maristela Gabriel, Linda Emiko Suzuki e Marcia Edilaine Lopes Consolaro

Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, Campus Universitário, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil. e-mail: enkaneshima@uem.br. *Author for correspondence.

RESUMO. O método da Reação em Cadeia da Polimerase, associado com o Polimorfismo de Fragmentos de DNA obtidos por Enzimas de Restrição (PCR-RFLP) foi, aplicado em 20 amostras clínicas cervicais de pacientes portadoras de anormalidades colpocitológicas atendidas no Lepac, Universidade Estadual de Maringá (UEM). O DNA e o tipo de HPV foram detectados e determinados em todas as amostras analisadas. A grande maioria das amostras cervicais era portadora de tipos de HPV com alto potencial para o desenvolvimento neoplásico. O método PCR-RFLP demonstrou grande poder discriminatório, pois foi capaz de detectar o DNA e determinar o potencial para o desenvolvimento neoplásico de até quatro tipos de HPV presentes de forma concomitante em uma única amostra cervical. Os resultados obtidos demonstraram que esse método pode ser utilizado rotineiramente com alta sensibilidade e reprodutibilidade, sendo um método de escolha na triagem primária de pacientes com risco de desenvolver neoplasias cervicais, contribuindo com informações que auxiliem num possível controle dessa doença.

Palavras-chave: tipagem de HPV genital, PCR-RFLP, neoplasias intra-epiteliais cervicais, câncer cervical.

ABSTRACT. Application of the method of PCR-RFLP to the knowledge of HPV types in cervical infections from patients assisted in Lepac, State University of Maringá (UEM). The method of Polymerase Chain Reaction associated with Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) was applied in 20 cervical clinical samples from patients with cytologic abnormalities, assisted in LEPAC-UEM. The DNA and the type of HPV were detected and determined in all of the analyzed samples. The great majority of the cervical samples showed HPV types, with high potential for neoplasia development. The method of PCR-RFLP proved great discrimination power, because it was able to detect the DNA and to determine the potential of neoplasia development for up to four different HPV types present in the same cervical sample. The results obtained demonstrated that this method can be used routinely, with high sensibility and reproductibility, being a choice method in primary screen of patients with risk of developing cervical cancer, contributing with information that help a possible control of this disease.

Key words: types genital HPV, PCR-RFLP, cervical intraepithelial neoplasia, cervical cancer.

A utilização da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) como metodologia no diagnóstico molecular do *Papilomavírus* Humano (HPV) tem se mostrado como a mais sensível na identificação do DNA viral existente nos mais diversos materiais clínicos (Manos *et al.*, 1989; Bauer *et al.*, 1991; Adams *et al.*, 1996; Iwasawa *et al.*, 1997; Gravitt *et al.*, 1998; Chow *et al.*, 2000; Nelson *et al.*, 2000; Rólon *et al.*, 2000), bem como na resolução de dúvidas originadas durante o diagnóstico citohistopatológico e colposcópico, não apenas de lesões

pré-neoplásicas, mas também nas infecções latentes ou subclínicas associadas a esse agente viral (Manos *et al.* 1989; Adams *et al.*, 1996; Hietanen *et al.*, 1997; Cox, 1999; Tenti *et al.*, 1999; Cuzick, 2000; Villa, 2000; Wright *et al.*, 2000). A detecção do DNA do HPV pela técnica de PCR é importante, mas se torna imperativo discriminar o tipo de HPV presente em materiais clínicos provenientes das mucosas genitais, a fim de verificar se os tipos presentes são de alto ou baixo potencial para o desenvolvimento de neoplasias cervicais (Bernard *et al.*, 1994; Villa, 2000).

A determinação do tipo de HPV auxilia também na condução de um tratamento mais apropriado para pacientes acometidas por essa infecção viral. Com base nesses dados, o objetivo deste trabalho foi aplicar o método da Reação em Cadeia da Polimerase, associado com o Polimorfismo de Fragmentos de DNA obtidos por enzimas de restrição (PCR-RFLP), para realizar a tipagem de HPV, em amostras de pacientes portadoras de anormalidades colpocitológicas atendidas no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (Lepac-UEM).

Material e métodos

Amostras clínicas. Neste estudo, foram utilizadas 20 amostras clínicas cervicais coletadas com auxílio de escovas endocervicais do tipo *cytobrush*, de pacientes atendidas no Lepac/UEM e que eram portadoras de alterações colpocitológicas do tipo metaplasia escamosa, células escamosas atípicas de significado indeterminado (Ascus), células glandulares atípicas de significado indeterminado (Agus), lesão intra-epitelial de baixo grau (LSIL), lesão intra-epitelial de alto grau (HSIL) e carcinoma invasivo tipo epidermóide. O material clínico coletado foi acondicionado em frascos, contendo 1,5 mL de solução tampão T.E. (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM) e estocado a - 20°C até a extração do DNA.

Extração de DNA. Nesta etapa, foi utilizado o método de digestão enzimática com proteinase K, conforme o descrito por Mahony *et al.* (1993). O material clínico cervical coletado anteriormente foi centrifugado a 10000 RPM por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspenso em 500 µL de T.E. gelado. Para a extração do DNA das células endocervicais, foram adicionados 5 µL de proteinase K (10 mg/mL) e 10 µL de tween 80 (10%) e incubados durante três horas a 37 °C. Em seguida, a proteinase K foi inativada no banho-maria a 100°C por 10 minutos, e a solução obtida que contém o DNA extraído foi estocada a - 20°C, até ser utilizada na reação de amplificação.

Amplificação do DNA através da técnica de PCR. Neste trabalho, foram utilizados os iniciadores consenso MY09: 5' CGTCCMAARGGAWACTGATC 3' e MY11: 5' GCMCAGGGWCATAAYAATGG 3', descritos por Manos *et al.* (1989), os quais amplificam especificamente uma parte do gene L1, que é a região mais conservada no genoma dos diferentes tipos de HPV, codificando uma proteína do capsídeo

viral. Esses iniciadores são capazes de amplificar um fragmento de aproximadamente 450 pares de bases (pb) do gene L1, tornando possível a detecção da maioria dos tipos de HPV (Gross e Barrasso, 1999; Lancellotti *et al.*, 2000). A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 100 µL, sendo constituída por 50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH 8,3), 2,5 mM de MgCl₂, 200µM de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (dNTP), 12,5 pmoles de cada iniciador e 3 U de Taq DNA polimerase. Para cada reação de amplificação, foram utilizados 5 µL da solução, contendo o DNA extraído anteriormente. Em cada bateria de amplificação pela PCR, sempre foi utilizado um controle negativo, constituído pelas mesmas concentrações e pelos mesmos reagentes da reação de amplificação, exceto o DNA. O sistema de amplificação do DNA foi realizado em tubos de 500 µL, que foram transferidos para o termociclador (MJ Research PTC 150). O programa de PCR consistiu das seguintes etapas: 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de amplificação (95 °C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto) e 72°C por 5 minutos, conforme descrito por Bauer e Manos (1993).

Tipagem de HPV por RFLP. A solução que contém o produto amplificado (fragmento de aproximadamente 450 pb) foi alíquotada em sete tubos de microcentrífuga e submetida à clivagem pelas enzimas de restrição: Bam HI, Dde I, Hae III, Hinf I, Pst I, Rsa I, Sau 3AI (Life Technologies GIBCO/BRL). As condições para a clivagem do fragmento de DNA foram realizadas conforme o descrito pelo fornecedor, utilizando-se 5 U de cada enzima para um volume final de 20 µL. Essa mistura foi incubada em banho-maria a 37 °C por 120 minutos e, ao produto final obtido, foram adicionados 4 µL de *loading buffer* (0,25% de azul de bromofenol, 15% de Ficoll tipo 400). O volume total obtido foi aplicado no gel de agarose a 2%, que foi submetido a corrida eletroforética em cuba horizontal a 110 V durante 45 minutos. O gel foi corado com brometo de etídio, e os fragmentos de DNA foram visualizados através de um transiluminador com luz Ultra Violeta, no comprimento de onda de 302 nm. O perfil de restrição enzimática foi fotografado com filme polaroid tipo 667, para uma posterior análise dos perfis de corte obtidos com as várias enzimas de restrição e comparados com as Tabelas 1a, 1b e 1c, descritas por Bernard *et al.* (1994), para a identificação do tipo de HPV.

Tabela 1a. Padrão RFLP do fragmento de DNA de vários tipos de HPV provenientes da mucosa genital, amplificados com os iniciadores MY09/MY11 e clivados com as enzimas de restrição Bam HI, DdeI, Hae III, Hinf I, Pst I Rsa I e Sau 3AI, segundo Bernard *et al.* (1994)

Tipo de HPV	Bam HI	Dde I	Hae III	Hinf I	Pst I	Rsa I	Sau 3AI
HPV 6b	449	382	217	234	449	161	366
não digerido:		67	124	215		149	63
449 pb			108			72	20
						67	
HPV 11	336	447	217	234	242	216	366
não digerido:	83	2	124	215	207	135	63
449 pb			108			72	20
						26	
HPV 13	372	326	204	240	242	175	372
não digerido:	83	67	127	215	213	135	63
455 pb		62	124			73	20
						72	
HPV 16	452	452	444	452	216	310	369
não digerido:			8		210	72	63
452 pb					26	70	20
HPV 18	372	432	455	455	242	135	372
não digerido:	83	23			213	125	63
455 pb						85	20
						72	
						38	
HPV 26	455	455	455	455	353	365	372
não digerido:					102	72	63
455 pb						18	20
HPV 31	452	283	328	237	216	380	369
não digerido:		167	124	215	210	72	63
452 pb		2			26	20	
HPV 32	366	320	317	234	449	216	366
não digerido:	83	108	124	215		161	63
449 pb		21	8			72	20
HPV 33	449	320	449	234	242	236	267
não digerido:		77		215	207	102	162
449 pb		52				72	20
						39	
HPV 34	458	211	334	458	253	186	438
não digerido:		151	124		179	161	20
458 pb		88			26	96	
		8				15	
HPV 35	452	294	261	452	426	177	369
não digerido:		135	180		26	161	63
452 pb		23	8			72	20
			3			42	
HPV 39	455	324	455	355	330	260	249
não digerido:		131		100	125	123	123
455 pb						72	63
						20	
HPV 40	240	297	447	455	455	365	240
não digerido:	132	158	8			90	132
455 pb	83					63	20
						20	
HPV 42	366	341	449	234	449	242	366
não digerido:	83	108		215		135	63
449 pb						72	20
HPV 44	455	297	223	455	455	222	405
não digerido:		112	124			161	30
455 pb		46	108			72	20
						20	
HPV 45	372	324	447	455	242	338	372
não digerido:	83	131	8		213	72	63
455 pb						45	20
HPV 51	237	362	379	452	452	380	237
não digerido:	215	90	73			72	132
452 pb						63	20
						20	
HPV 52	449	357	258	449	423	449	366
não digerido:		92	183		26	63	63
449 pb			8			20	
HPV 53	449	206	232	368	449	449	342
não digerido:		158	217	81			87
449 pb		85					20

Tabela 1b. Padrão RFLP do fragmento de DNA de vários tipos de HPV provenientes da mucosa genital, amplificados com os iniciadores MY09/MY11 e clivados com as enzimas de restrição Bam HI, DdeI, Hae III, Hinf I, Pst I Rsa I e Saul 3AI, segundo Bernard *et al.* (1994)

Tipo de HPV	Bam HI	Dde I	Hae III	Hinf I	Pst I	Rsa I	Sau 3AI
HPV 54	369	452	217	234	452	138	369
não digerido:	83		127	218		125	63
452 pb			108			117	20
						72	
HPV 55	455	112	215	215	455	165	405
não digerido:		111	124	207		161	30
455 pb		101	108	33		72	20
		85	8			57	
			46				
HPV 56	449	307	275	449	242	310	429
não digerido:		142	166		207	72	20
449 pb			8			49	
						18	
HPV 57	449	211	449	449	296	449	328
não digerido:		142			153		38
449 pb		50					33
		46					26
							24
HPV 58	449	348	449	235	216	306	366
não digerido:		101		214	207	111	57
449 pb					26	32	26
HPV 59	452	452	396	452	426	452	402
não digerido:			56		26		26
452 pb							24
HPV 61	455	455	212	455	455	185	372
não digerido:			211			180	63
455 pb			32			100	20
HPV 62	449	449	232	449	341	359	399
não digerido:			217		108	72	30
449 pb						18	20
HPV 64	375	211	334	367	253	186	375
não digerido:	83	151	124	91	179	161	63
458 pb		87			26	72	20
		9				39	
HPV 66 (PAP88)	366	291	449	449	207	449	366
não digerido:	83	158			150	63	
449 pb					66	20	
					26		
HPV 67	449	307	266	234	423	310	366
não digerido:		92	183	215	26	72	63
449 pb		50				67	20
HPV 68 (ME 180)	372	455	455	215	455	260	249
não digerido:	83			140		85	123
455 pb				100		72	63
						38	20
HPV 69	372	455	223	455	455	365	372
não digerido:	83		183			72	33
455 pb			49			18	30
						20	
MM4 (W138)	455	288	455	241	455	383	435
Não digerido: 455pb		167		214		72	20
MM7 PAP(291)	369	452	383	452	317	380	369
Não digerido:	83		69		135	72	63
452pb						20	
MM8 PAP(155)	452	220	346	214	452	310	369
Não digerido:		142	106	106		142	63
452pb		90		95		20	
				37			
MM9 PAP(238 ^a)	458	243	458	458	432	201	408
Não digerido:		215			26	161	30
458pb						96	20
HPV 72 (LVX100)	452	297	220	452	452	362	369
Não digerido:		155	208			72	63
452 pb			24			18	20
HPV IS39	455	243	455	241	455	383	435
Não digerido: 455pb		212		214		72	20

Resultados

Neste trabalho, o DNA do HPV foi detectado nas vinte amostras clínicas cervicais de pacientes portadoras de alterações colpocitológicas do tipo metaplasia escamosa, Agus, Ascus, LSIL, HSIL e carcinoma invasivo. A técnica PCR-RFLP foi aplicada, no mínimo, duas vezes em cada amostra, para avaliar a reprodutibilidade dos resultados. Além desse procedimento, também foi avaliado o controle negativo que não apresentou nenhum tipo de fragmento de DNA ou primer-dimer.

Na Figura 1 (canaleta 0), pode ser observado um fragmento de DNA de aproximadamente 450 pares de base, que corresponde ao produto amplificado não digerido. Nas canaletas seguintes, está demonstrado o produto resultante da clivagem do fragmento de DNA pelas enzimas de restrição Bam HI, Dde I, Hae III, Hinf I, Pst I, Rsa I, Sau 3AI, que correspondem ao HPV tipo 16.



Figura 1. Perfil eletroforético do DNA de HPV tipo 16, amplificado com os iniciadores MY09/MY11 e digerido com as enzimas de restrição (BamHI, DdeI, Hae III, Hinf I, Pst I, Rsa I, Sau3a - Life Technologies GIBCO/BRL), conforme mostrado acima. L- 100bp DNA ladder; 0- Fragmento de DNA HPV1 não digerido

A Tabela 2 mostra o resultado colpocitológico das vinte amostras cervicais relacionadas com a tipagem do HPV, obtido através do método PCR-RFLP. Pode-se verificar que a grande maioria das amostras cervicais encontrava-se infectada por tipos de HPV com alto potencial para o desenvolvimento de neoplasias cervicais, exceto os tipos 6b e 61 que estão no grupo de baixo potencial (Bonfiglio e Erozan, 1997; Lancellotti *et al.*, 2000). Verifica-se também que das 20 amostras cervicais analisadas, somente as amostras 7, 15 e 19 apresentaram infecções múltiplas de HPV, com três ou quatro tipos diferentes. A Figura 2 retrata o perfil de restrição enzimática da amostra 19, que estava infectada por partículas virais de HPVs tipo 6b, 18 e 66.

Tabela 2. Resultado da colpocitologia de amostras cervicais e da determinação dos tipos de *Papilomavírus Humano* (HPV), através do método PCR-RFLP

Amostra	Alteração colpocitológica	Tipos de HPV
1	Metaplasia escamosa	66
2	AGUS	58
3	ASCUS	58
4	ASCUS	72
5	ASCUS	16
6	LSIL	68
7	LSIL	6b; 54; 55 e 61
8	LSIL	26
9	LSIL	39
10	LSIL	IS39
11	LSIL	59
12	LSIL	56
13	LSIL	53
14	LSIL	45
15	HSIL	16; 45; 61; 69
16	HSIL	16
17	HSIL	58
18	HSIL	16
19	HSIL	6b; 18; 66
20	Câncer invasivo	58

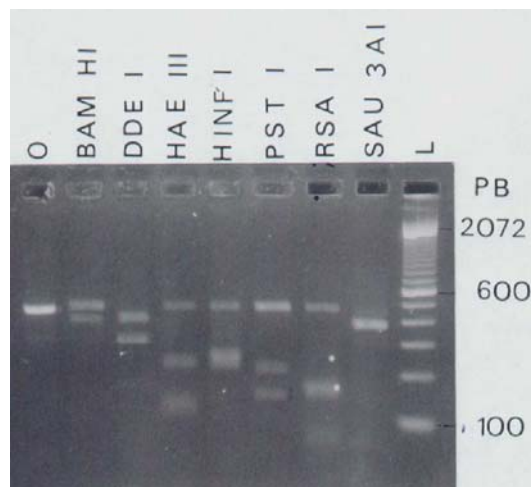


Figura 2. Perfil de restrição enzimática do fragmento de DNA de HPV da amostra 229, que corresponde aos tipos 6b, 18 e 66. O DNA foi amplificado com os iniciadores MY09/MY11 e digerido com as enzimas de restrição (BamHI, DdeI, Hae III, Hinf I, Pst I, Rsa I, Sau3a - Life Technologies GIBCO/BRL), conforme mostrado acima. L- 100bp DNA ladder; 0- Fragmento de DNA HPV1 não digerido

Quando analisamos a distribuição do número de casos de pacientes infectadas por tipos de HPV, conforme a alteração colpocitológica (Tabela 3), observamos que o DNA de HPV do tipo 16 foi detectado e tipado em quatro amostras clínicas, sendo três portadoras de HSIL e uma de Ascus. Nas quatro amostras em que o DNA foi detectado e tipado como 58, as pacientes apresentavam alterações citológicas do tipo Agus, Ascus, HSIL e carcinoma invasivo tipo epidermóide. As amostras tipadas como 18 e 69 foram diagnosticadas pela colpocitologia como HSIL. Os HPVs tipo 45 e 66 foram detectados

em amostras cervicais de pacientes que apresentavam alterações colpocitológicas do tipo LSIL/HSIL e metaplasia escamosa/HSIL, respectivamente. O HPV tipo 72, que também é considerado de alto potencial, foi detectado na amostra cervical portadora de anormalidades citológicas do tipo Ascus. Os HPVs tipo 6b e 61 foram detectados em amostras diagnosticadas pela colpocitologia como LSIL e HSIL. O restante das amostras cervicais (nove amostras) apresentavam alterações citológicas do tipo LSIL, em que cada amostra analisada apresentou HPVs tipo 26, 39, 53, 54, 55, 56, 59, 68 e IS39.

Analisando-se as Tabelas 2 e 3, verifica-se que os HPVs tipo 6b e 61 foram detectados e tipados em três amostras cervicais de pacientes portadoras de LSIL e HSIL, salientando que essas amostras se encontravam infectadas de forma concomitante com outros tipos de HPV de alto potencial para o desenvolvimento de neoplasias cervicais, a exemplo do que ocorreu com a amostra 7, que estava infectada por HPVs dos tipos 6b e 61 (baixo potencial) e 54 e 55 (alto potencial).

Tabela 3. Distribuição do número de casos de pacientes infectadas por tipos de HPV, conforme a alteração colpocitológica observada nas amostras cervicais

Tipos de HPV	Alterações colpocitológicas					
	Metaplasia escamosa	Agus	Ascus	LSIL	HSIL	Câncer invasivo
6b	0	0	0	1	1	0
16	0	0	1	0	3	0
18	0	0	0	0	1	0
26	0	0	0	1	0	0
39	0	0	0	1	0	0
45	0	0	0	1	1	0
53	0	0	0	1	0	0
54	0	0	0	1	0	0
55	0	0	0	1	0	0
56	0	0	0	1	0	0
58	0	1	1	0	1	1
59	0	0	0	1	0	0
61	0	0	0	1	1	0
66	1	0	0	0	1	0
68	0	0	0	1	0	0
69	0	0	0	0	1	0
72	0	0	1	0	0	0
IS39	0	0	0	1	0	0

Discussão

Os métodos de diagnóstico para a infecção por HPV baseados em PCR têm a maior sensibilidade de detecção dos genomas virais, quando comparados com outras metodologias (Chang *et al.*, 1995; Shah *et al.*, 1997; Gravitt *et al.*, 1998; Lancellotti *et al.*, 2000; Villa, 2000). Por ser um método muito sensível, foi necessário controlar muito bem as condições de ensaio, a fim de eliminar os resultados falso positivos. Neste caso, o controle negativo utilizado não apresentou nenhum fragmento de DNA ou de

primer-dimer, demonstrando, assim, que não havia a presença de contaminações ou excesso de iniciadores (Kwok e Higuchi, 1989). Para avaliar a reprodutibilidade do método, as reações de amplificação foram repetidas, no mínimo, duas vezes. Nas pacientes em que não houve reprodutibilidade do resultado, o ensaio foi repetido várias vezes, até a obtenção de um resultado reprodutível.

Neste trabalho, a reação da PCR, que pode ser associada com o método RFLP, foi realizada com os iniciadores MY09 / MY11. Dessa forma, é possível identificar aproximadamente 40 tipos de HPV provenientes das mucosas genitais, baseando-se nas Tabelas 1a, 1b e 1c, descritas por Bernard *et al.* (1994). Na Figura 1, a análise do perfil eletroforético do DNA de HPV digerido com as enzimas de restrição tornou possível a tipagem como sendo HPV 16. A partir da determinação do tipo de HPV, é possível enquadrá-lo em dois grupos: de alto potencial e de baixo potencial para o desenvolvimento neoplásico (Bonfiglio e Erozan, 1997; Gross e Barrasso, 1999; Lancellotti *et al.*, 2000). O conhecimento desse potencial torna possível estabelecer uma triagem das mulheres com o risco de desenvolver neoplasias cervicais e encaminhá-las mais precocemente para tratamento e acompanhamento (Pereyra *et al.*, 2000; Villa, 2000).

Conforme a Tabela 2, das 20 amostras cervicais das pacientes analisadas neste trabalho, a grande maioria encontrava-se infectada por tipos de HPV com alto potencial para o desenvolvimento neoplásico. Algumas dessas amostras também se encontravam infectadas por HPV de baixo potencial, porém, de forma concomitante com os tipos de alto potencial, caracterizando uma infecção múltipla, que pode ocorrer em decorrência das mudanças dos costumes e aumento da permissividade sexual (Franco, 1995; Bonfiglio e Erozan, 1997; Wright *et al.*, 2000).

A Figura 2 apresenta o perfil de restrição enzimática do fragmento de DNA de mais ou menos 450 pares de bases provenientes da amplificação do DNA de HPV presente na amostra 19, em que foram detectados os tipos 6b, 18 e 66. Apesar da paciente estar infectada pelo HPV tipo 6b (baixo potencial), era portadora de anormalidades citológicas correspondentes a lesões de alto grau, sendo que esse grau de lesão provavelmente está relacionado com os HPV tipos 18 e 66. Esses tipos são considerados como de alto potencial, e vários autores associam essa classe de HPV como a causa primária do câncer cervical (Manos *et al.*; 1989; Bonfiglio e Erozan, 1997; Iwasawa *et al.*; 1997; Gross

e Barrasso, 1999; Cuzick, 2000; Okada *et al.*; 2000; Villa, 2000). A capacidade de detectar três tipos distintos de HPV demonstra o grande poder discriminatório do método PCR-RFLP, que pode ser utilizado como adicional na triagem primária de mulheres com risco de desenvolver neoplasias cervicais, pois, através da detecção do DNA viral, este pode ser utilizado como marcador molecular de lesões precursoras ou avançadas de carcinomas cervicais.

Conforme a Tabela 3, verifica-se que o DNA de HPV dos tipos 16 e 58, considerados com alto potencial para a carcinogênese, foram detectados em amostras clínicas de pacientes portadoras de Agus, Ascus, HSIL e carcinoma invasivo, demonstrando mais uma vez a associação desses tipos de HPV com a formação de lesões pré-cancerosas ou cancerosas cervicais. Em duas amostras cervicais que foram diagnosticadas como HSIL, foram detectados, respectivamente, os HPVs tipo 18 e 69. No entanto, essas amostras cervicais também estavam infectadas por outros tipos de HPV, tanto de alto como de baixo potencial, justificando a severidade da lesão cervical. Os HPVs tipo 45 e 66 tiveram o seu DNA amplificado e tipado em amostras cervicais de pacientes que apresentavam alterações colpocitológicas do tipo LSIL/HSIL e metaplasia escamosa/HSIL, respectivamente. As duas pacientes acometidas por alterações citológicas do tipo HSIL também estavam infectadas por outros tipos de HPV.

Analisando-se as Tabelas 2 e 3 verifica-se que os HPVs tipo 6b e 61, apesar de serem de baixo potencial, foram detectados e tipados em três amostras cervicais de pacientes portadoras de LSIL e HSIL, no entanto essas amostras clínicas também encontravam-se infectadas por outros tipos de HPV de alto potencial. As amostras cervicais de pacientes portadoras de alterações citológicas do tipo LSIL encontravam-se infectadas pelos HPVs dos tipos 26, 39, 53, 54, 55, 56, 59, 68 e IS39 que são de alto potencial carcinogênico, existindo fortemente a possibilidade de esse tipo de alteração citológica de alterações, como metaplasia escamosa, Agus e Ascus, progredirem para lesões do tipo HSIL ou câncer invasivo (Bonfiglio e Erozan, 1997; Cox, 1999; Gross e Barrasso, 1999; Okada *et al.*, 2000; Wright *et al.*, 2000)

O método PCR-RFLP também pode ser utilizado no monitoramento terapêutico ou até como método de escolha para a resolução de citologias indeterminadas (Lancellotti *et al.*, 2000). Conforme as Tabelas 2 e 3, verifica-se que as três pacientes portadoras de anormalidades com

significado indeterminado (Ascus) encontravam-se infectadas por tipos de HPV de alto potencial para a carcinogênese. Esse resultado está condizente com a literatura, em que vários autores sugerem que as pacientes portadoras de Ascus e Agus sejam examinadas por testes biomoleculares, uma vez que cerca de 10 a 39 % das pacientes com Ascus apresentam, na verdade, lesões de alto grau ou câncer (Cox, 1999; Wright *et al.*, 2000; Zeferino, 2000).

Uma vez demonstrado que os testes para DNA-HPV podem ser realizados rotineiramente com alta sensibilidade e reprodutibilidade, abre-se a perspectiva da aplicação do método PCR-RFLP para a detecção e a tipagem do DNA de HPV das pacientes atendidas no Lepac-UEM bem como de outros laboratórios de análises clínicas. A utilização desse método possibilitará um melhor acompanhamento das pacientes, o que contribuirá para o controle da infecção viral e para a diminuição da incidência e da mortalidade por câncer cervical. Entretanto, esses resultados só poderão ser avaliados após vários anos da introdução de métodos biomoleculares, como a PCR-RFLP (Cuzick, 2000; Zeferino, 2000).

Agradecimentos

Os autores são gratos à Dra. Mônica Lúcia Gomes pelo auxílio na revisão deste manuscrito, ao Laboratório de Doença de Chagas – DAC/UEM, pela cessão dos equipamentos necessários para a realização deste trabalho, e ao Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas – Lepac/UEM, pelo auxílio financeiro.

Referências

- ADAMS, V. *et al.* Detection and typing of human papillomavirus in biopsy and cytological specimens by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis: A method suitable for semiautomation. *J. Med. Virol.*, New York, v. 48, p.161-170, 1996.
- BAUER, H.M. *et al.* Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *JAMA*, Chicago, v. 265, p.472-477, 1991.
- BAUER, H.M.; MANOS, M.M. PCR Detection of Genital Human Papillomavirus. In: PERSING, D.H. *et al.* (Ed.). *Diagnostic molecular microbiology principles and applications*. Rochester: Mayo Foundation, 1993. cap. 2.16, p.407-413.
- BERNARD, H.U. *et al.* Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic

- algorithms. *J. Infect. Dis.*, Chicago, v. 170, p.1077-1085, 1994.
- BONFIGLIO, T.A.; EROZAN, Y.E. *Gynecologic cytopathology*. New York: Lippincott-Raven, 1997.
- CHANG, D.Y. *et al.* Comparison of detection of human papillomavirus 16 DNA in cervical carcinoma tissues by Southern blot hybridisation and nested polymerase chain reaction. *J. Med. Microbiol.*, London, v. 43, p. 430-435, 1995.
- CHOW, V.T.K. *et al.* Identification of multiple genital HPV types and sequence variants by consensus and nested type-specific PCR coupled with cycle sequencing. *Pathology*, Abingdon, v. 32, p.204-208, 2000.
- COX, J.T. Evaluating the role of HPV testing for women with equivocal Papanicolaou test findings. *JAMA*, Chicago, v. 281, p. 1645-1647, 1999.
- CUZICK, J. Human Papillomavirus testing for primary cervical cancer screening. *JAMA*, Chicago, v. 283, p.108-109, 2000
- FRANCO, E.L. Epidemiologia do câncer mamário ginecológico. In: ABRÃO, F.S. (Ed.). *Tratado de oncologia genital e mamária*. São Paulo: Editora Roca, 1995. cap.1, p. 3-16.
- GRAVITT, P.E. *et al.* Genotyping of 27 human papillomavirus types by using L1 consensus PCR products by a single hybridization, reverse line blot detection method. *J. Clin. Microbiol.*, Washington D.C., v. 36, p. 3020-3027, 1998
- GROSS, G.E.; BARRASSO, R. *Infecção por Papilomavírus humano: atlas clínico de HPV*. Porto Alegre: Artmed, 1999.
- HIETANEN, S. *et al.* Type I diabetic pregnancy and subclinical human papillomavirus infection. *Clin. Infect. Dis.*, Chicago, v. 24, p.153-156, 1997.
- IWASAWA, A. *et al.* J. Human papillomavirus in squamous cell carcinoma of the vulva by polymerase chain reaction. *Obstetr. Gynecol.*, New York, v. 89, p. 81-84, 1997.
- KWOK, S.; HIGUCHI, R. Avoiding false positives with PCR. *Nature*, London, v. 339, p. 237-238, 1989.
- LANCELLOTTI, C.L.P. *et al.* Diagnóstico Laboratorial. In: CARVALHO, J.J.M.; OYAKAWA, N. (Ed.). *I Consenso Brasileiro de HPV Papilomavírus humano*. São Paulo: BG Cultural, 2000. cap. 4, p.45-60.
- MAHONY, J.B. *et al.* Comparison of plasmid and chromosome based polymerase chain reaction assays for detecting *Chlamydia trachomatis* nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.*, Washington D.C., v. 31, p.1753-1758, 1993.
- MANOS, M.M. *et al.* Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells*, New York, v. 7, p. 209-214, 1989.
- NELSON, J.H. *et al.* A novel and rapid PCR-based method for genotyping human papillomaviruses in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.*, Chicago, v. 38, p.688-695, 2000.
- OKADA, M.M.K. *et al.* Epidemiologia e patogênese do Papilomavírus humano (HPV). In: CARVALHO, J.J.M.; OYAKAWA, N. (ed.). *I Consenso Brasileiro de HPV Papilomavírus humano*. São Paulo: BG Cultural, 2000. cap. 1, p.01-06.
- PEREYRA, E.A.G. *et al.* Papilomavírus humano. In: MARTINS, N.V.; PEREYRA, E.A.G. (Ed.). *Conhecendo o HPV: patologia do trato-genital inferior Colposcopia e CAF*. São Paulo: Frôntis Editorial, 2000. cap. 1, p.1-12.
- RÓLON, P.A. *et al.* Human papillomavirus infection and invasive cervical cancer in Paraguay. *Int. J. Cancer*, New York, v. 85, p. 486-491, 2000.
- SHAH, K.V. *et al.* Comparison of PCR and hybrid capture methods for detection of human papillomavirus in injection drug-using women at high risk of human immunodeficiency virus infection. *J. Clin. Microbiol.*, Washington D.C., v. 35, p. 517-519, 1997.
- TENTI, P. *et al.* Perinatal transmission of human papillomavirus from gravidas with latent infections. *Obstetr. Gynecol.*, v. 93, p. 475-479, 1999.
- VILLA, L.L. Biologia Molecular: Conceitos e Princípios Básicos. In: MARTINS, N.V.; PEREYRA, E.A.G. (Ed.). *Conhecendo o HPV Patologia do trato-genital inferior Colposcopia e CAF*. São Paulo: Frôntis Editorial, 2000. cap. 20, p.137-143.
- WRIGHT, T.C. *et al.* HPV DNA testing of self-collected vaginal samples compared with cytologic screening to detect cervical cancer. *JAMA*, Chicago, v. 283, p. 81-86, 2000.
- ZEFERINO, L.C. *et al.* Prevenção. In: CARVALHO, J.J.M.; OYAKAWA, N. (Ed.). *I Consenso Brasileiro de HPV Papilomavírus humano*. São Paulo: BG Cultural, 2000. p.135-140.

Received on March 20, 2001.

Accepted on May 29, 2001.