



Centro Universitário de Brasília

Faculdade de Ciências da Saúde

BIOLOGIA MOLECULAR DO VÍRUS PAPILOMA HUMANO

Edilamar Gonçalves

Brasília – 2001

Centro Universitário de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Licenciatura em Ciências Biológicas

BIOLOGIA MOLECULAR DO VÍRUS PAPILOMA HUMANO

Edilamar Gonçalves

Monografia apresentada à Faculdade de Ciências da Saúde do Centro Universitário de Brasília como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof.: MSc. Cláudio Henrique Cerri e Silva

Brasília - 2001

Agradecimentos

À Deus que me capacitou para que se tornasse possível a realização de um dever cumprido.

À minha mãe, irmãos e cunhados pelo entusiasmo e incentivo à cada barreira sobreposta.

Ao meu marido e filhos pelo carinho e compreensão nos momentos em que estive ausente para dedicação à vida acadêmica.

Ao professor Cláudio Cerri por sua paciência e conhecimentos ministrados na orientação desta Monografia.

Resumo

Os vírus são microrganismos submicroscópicos de dimensões ínfimas, medindo entre 20 e 300 nm. São destituídos de metabolismo próprio e por isso considerados parasitas intracelulares obrigatórios. Reconhecidos como partículas filtráveis, Existem em formas variadas. São constituídos por ácidos nucléicos, DNA ou RNA, proteínas e lipídios. São encontrados em formas de simetria icosaédrica e helicoidal. Conseguem penetrar no organismo através de soluções de continuidade na pele ou através das membranas mucoepiteliais. Uma partícula viral infecciosa liga-se à membrana celular e penetra na célula hospedeira; ocorre o desnudamento do genoma viral e posterior replicação do vírus. As mutações do DNA e RNA viral, que são alterações na sequência de bases do DNA, ocorrem pelo processo de substituição de bases, deleção e mudança de fase de leitura. Na genética a recombinação é um termo utilizado para descrever a troca de material genético que venha a resultar num rearranjo de genes diferente do original. Na recombinação viral, quando dois vírus geneticamente diferentes infectam uma célula podem ocorrer os fenômenos de recombinação viral, complementação e mistura fenotípica. O vírus papiloma humano – HPV, contém DNA de filamento duplo em configuração circular. Atualmente mais de 70 genótipos do HPV já foram identificados. O genoma do HPV contém dois tipos de molduras abertas de leitura (ORFs [o equivalente viral dos “genes”]): precoce e tardio. As ORFs precoces de transcrição (E1, E2, e E4 até E7) regulam a replicação viral e transformação da célula hospede. As duas ORFs tardias de transcrição (L1 e L2) codificam as informações relativas às proteínas capsides menores e maiores que recobrem o vírus. A replicação dos HPVs ocorre nas camadas basais do epitélio e tem acesso às células permissivas através de lesão e/ou abrasão. Os HPVs mucosotrópicos são encontrados exclusivamente nos locais urogenitais ou bucorrespiratórios. As causas de condilomas acuminados de exuberante proliferação é a infecção por HPV-6 ou 11 considerados subtipos de baixo risco. Os subtipos de alto risco mais recorrentes são o 16 e o 18, que estão relacionados ao carcinoma invasor do colo de útero, de pênis, de pele. A ciência tem avançado, e tem trazido inúmeros métodos de detecção através da biologia molecular, tais como: captura híbrida, PCR, southern blotting, hibridização in situ.

Sumário

1- INTRODUÇÃO	06
1.1- O QUE SÃO OS VÍRUS.....	06
1.2- ESTRUTURA GERAL E ELEMENTOS BÁSICOS DA PARTÍCULA VIRAL.....	07
1.3- CLASSIFICAÇÃO E CATEGORIA DOS VÍRUS.....	09
1.4- FORMAS DE INFECCÃO NO ORGANISMO HUMANO.....	10
1.5- REPLICAÇÃO VIRAL.....	12
1.6- MUTAÇÃO VIRAL.....	17
1.7- RECOMBINAÇÃO VIRAL.....	19
2- O PAPILOMA VÍRUS HUMANO - HPV	21
2.1- HISTÓRICO.....	21
2.2- CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DO HPV.....	23
2.3- EPIDEMIOLOGIA E FORMAS DE INFECCÃO PELO HPV.....	24
2.4- ESTRUTURA, REPLICAÇÃO E GENOMA VIRAL.....	25
2.5- CLASSIFICAÇÃO E TIPOS DE HPV.....	29
2.6- MÉTODOS DE DETECÇÃO DO HPV.....	32
2.6.1- PAPANICOLAU, COLPOSCOPIA E PENISCOPIA.....	32
2.6.2- TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA.....	33
2.6.3- TÉCNICA SOUTHERN BLOTTING.....	34
2.6.4- TÉCNICA DE HIBRIDIZAÇÃO IN SITU.....	34
2.6.5- TÉCNICA DE CAPTURA HÍBRIDA.....	35
2.6.6- TÉCNICA PCR - REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE.....	35
3- RELAÇÃO EXISTENTE ENTRE O HPV E AS DOENÇAS.....	36
3.1- HPV E O CÂNCER DE COLO UTERINO.....	37
3.2- HPV E O CÂNCER DE PÊNIS.....	39
3.3- HPV E O CÂNCER DE PELE.....	39
3.4- PAPILOMA ESCAMOSO DE ESÔFAGO.....	40
3.5- MECANISMOS DE INTERAÇÃO HPV x HIV.....	41
4- DOS AVANÇOS DA CIÊNCIA.....	43

1 - Introdução

O papel dos vírus na história da humanidade remonta aos registros pré-históricos. Evidências de fósseis encontrados sugerem que formas de vida existem no planeta há pelo menos 3,5 bilhões de anos. A interpretação de fósseis de primatas considerados *Homo sapiens*, caracteriza que naquela época já existiam doenças virais. Quadros semelhantes ao da varíola, foram encontrados e registrados em múmias egípcias (Couceiro, 2001).

Hipócrates (460-377 a.C) registrou ocorrências de vírus da caxumba e possivelmente de influenza na ilha de Thasos. Acredita-se que possivelmente, as primeiras tentativas, registradas, de controle de uma doença viral foi na China no século XI, onde curandeiros inoculavam extratos de pústula de varíola em crianças (Couceiro, 2001).

1.1 - O que são os vírus?

Veneno, assim é traduzido do latim a palavra “vírus”. Microrganismos sem metabolismo independente, constituído de corpo denominado *virion*. Numa tentativa de definição afirma-se que “vírus são partículas com estruturas características, passíveis de subsistirem extracelularmente e formadas por complexos biológicos dotados de informações genéticas elementares. Os vírus possuem a capacidade de adentrar células vivas, alterando-lhes os processos metabólicos normais, com a finalidade de recodificá-las para sua própria replicação” (Soares, 1993; D. Falke, 1979).

É reconhecido como forma extracelular do vírus a fase em que ele se encontra simplesmente estático, completamente inerte quando fora de células vivas, porque os vírus são *organismos/parasitas intracelulares obrigatórios* que não conseguem de forma alguma se replicar fora da célula (Murray *et al.*, 1994; Falke, 1979; Soares, 1993).

No meio extracelular por demasiado tempo chega a ser comparado a um cristal, por isso não pertencem à nenhum dos cinco reinos dos seres vivos, existindo controvérsias em torno de sua existência, já que o seu estado dinâmico só é atingido no momento em que se inicia o processo de replicação no interior da célula, ou seja, quando em contato com o hospedeiro, utilizando para se multiplicar no interior da

célula, a energia e equipamento químico da própria célula hospedeira (Amabis *et al.*, 1974; Falke, 1979).

1.2 - Estrutura Geral e Elementos básicos da Partícula Viral

Os vírus são partículas que passam por filtros que retêm bactérias, por isso são reconhecidos como partículas filtráveis. Possuem um tamanho entre 20nm e 300nm. Suas estruturas geométricas são simples e precisas, apresentam-se em forma de esferas, bastonetes, projéteis e tijolos, são constituídos por ácidos nucleicos, proteínas e lipídios. São organismos que contêm apenas um tipo de ácido nucleico: RNA ou DNA, de acordo com o grupo a que pertencem, mas nunca os dois ao mesmo tempo (Levinson *et al.*, 1998; Burnett, 1978).

As partículas virais são compostas por três elementos básicos: os ácidos nucleicos - são como portadores de informação genética. Composto também por propriedades antigênicas, a capsídeo ou camada protetora dos ácidos nucleicos - que é de natureza protéica e também pode atuar como antígeno e o envoltório - que é encontrado em determinados tipos virais, envolve a capsídeo externamente como um envelope; de natureza protéica, glicoprotéica e lipídica e também apresenta propriedades antigênicas.

Em suma, o ácido é recoberto por um invólucro formado por proteínas denominado capsídeo, composto por subunidades chamadas capsômeros. Cada capsômero consiste de uma ou mais proteínas que visualizadas ao microscópio, apresentam-se como partículas esféricas, algumas vezes com um orifício central. O arranjo dos capsômeros fornece ao vírus a sua simetria geométrica. Há duas formas de simetria nos capsídeos virais:

- Icosaédrica - na qual os capsômeros são arranjados em 20 triângulos que formam uma figura simétrica, com uma forma aproximada de esfera:
- Helicoidal - na qual os capsômeros são arranjados em uma estrutura helicoidal oca que tem a forma de bastão. A hélice pode ser rígida ou flexível.

As formas icosaédricas e helicoidais podem existir como um nucleocapsídeo nu ou como uma camada externa de envelope, como representado na figura 1 (Levinson *et al.*, 1998).

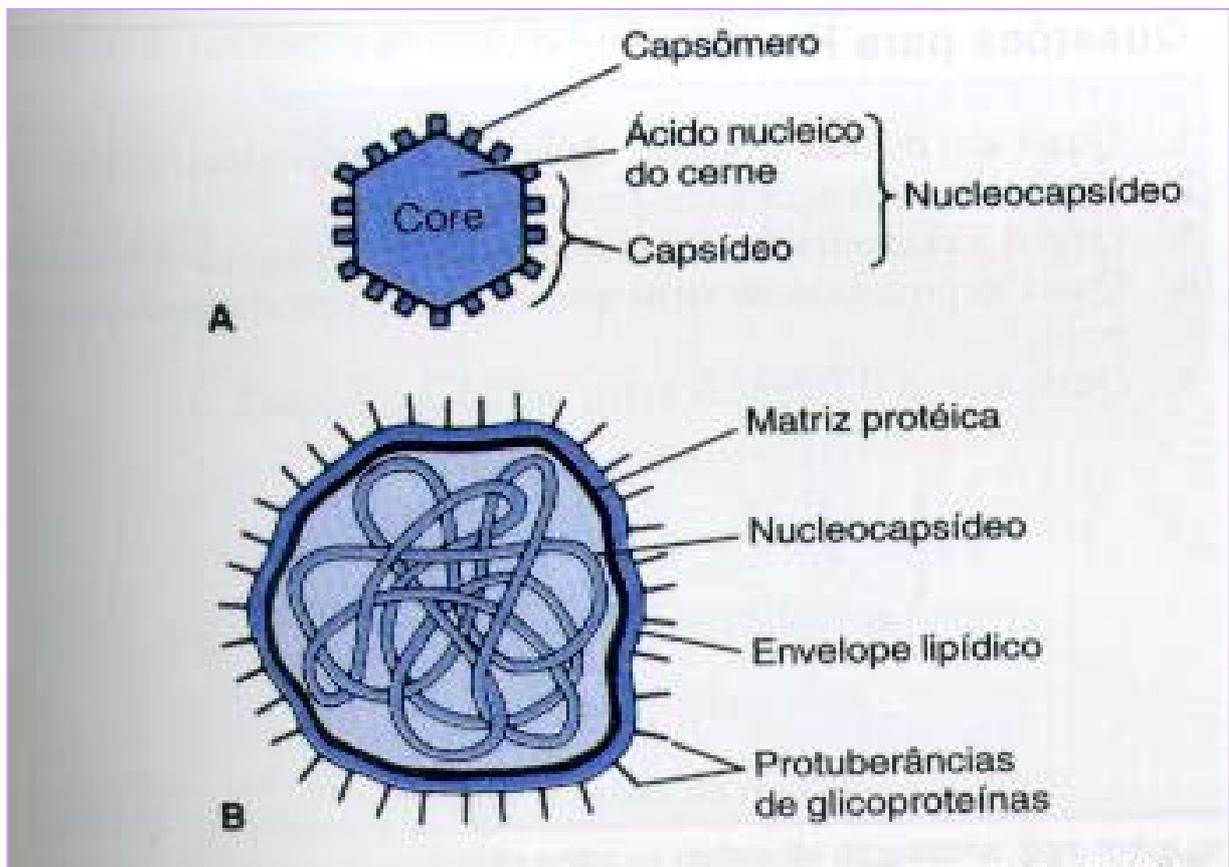


Figura 1 : capsômero, ácido nucléico, capsídeo, matriz protéica, nucleocapsídeo, envelope lipídico, protuberâncias de glicoproteínas.

Fonte: (Levinson *et al.*, 1998)

1.3 - Classificação e Categoria dos Vírus

Os vírus estão separados por categoria e são classificados por critérios químicos e morfológicos, tais como, o peso e estrutura molecular dos ácidos nucleicos, tamanho, simetria e presença ou não de envelope e também por tipos de viroses que podem causar, conforme mostrado nos quadros 1 e 2 respectivamente.

Quadro 1 – Categoria e Classificação dos vírus de DNA e RNA

Família do vírus	Envelope	Simetria	Tamanho (nm)	Estrutura do DNA/RNA
Parvovírus	Não	Icosaédrica	22	SS, linear *
Papovavírus	Não	Icosaédrica	55	DS, circular supertorcido*
Adenovírus	Não	Icosaédrica	75	DS, linear*
Hepadnavírus	Sim	Icosaédrica	42	DS, circular incompleto*
Herpesvírus	Sim	Icosaédrica	100 ²	DS, linear*
Poxvírus	Sim	Complexa	250x400	DS, linear*
Picornavírus	Não	Icosaédrica	28	SS linear, não-segmentado
Calicivírus	Não	Icosaédrica	38	SS linear, não-segmentado
Reovírus	Não	Icosaédrica	75	DS linear, 10 segmentos
Flavivírus	Sim	Icosaédrica	45	SS linear, não-segmentado
Togavírus	Sim	Icosaédrica	60	SS linear, não-segmentado
Retrovírus	Sim	Icosaédrica	100	SS linear, dois segmentos
Ortomixovírus	Sim	Helicoidal	80x120	SS linear, oito segmentos
Paramixovírus	Sim	Helicoidal	150	SS linear, não segmentado
Rabdovírus	Sim	Helicoidal	75x180	SS linear, não segmentado
Filovírus	Sim	Helicoidal	80 ³	SS linear, não segmentado
Coronavírus	Sim	Helicoidal	100	SS linear, não segmentado
Arenavírus	Sim	Helicoidal	80x130	SS circular, dois segmentos
Bunyavírus	Sim	Helicoidal	100	SS circular, três segmentos
Deltavírus	Sim	Helicoidal	37	SS circular, fechado

Fonte: (Murray *et al.*, 1994)

* Vírus com ácidos nucleicos DNA.

SS: fita simples; DS: dupla fita.

Quadro 2 – classificação e tipos de viroses humanas

Classificação dos vírus	Viroses humanas
VÍRUS VISCEROTRÓPICOS	Febre amarela; Hepatite a vírus; Dengue
VÍRUS DERMONEUROTRÓPICOS	Encefalite; Hidrofobia; Poliomielite
VÍRUS PNEUMOTRÓPICOS	Gripe; Resfriado; Pneumonia atípica
VÍRUS LINFOTRÓPICOS	Caxumba; Mononucleose infecciosa; Linfo inguinal; AIDS
VÍRUS DERMOTRÓPICOS	Sarampo; Rubéola; Varíola; Varicela; Catapora
VÍRUS EPIDERMOTRÓPICOS	Molluscum contagiosum; verrugas

Fonte: (Soares, 1993)

1.4 - Formas de Infecção no Organismo Humano

Os vírus são transmitidos por contato direto, incluindo o contato sexual, injeção com líquidos contaminados, sangue ou transplante de órgãos, vias respiratórias e orofecal. A via de transmissão depende da fonte do vírus, do local tecidual de replicação e secreção viral, depende da capacidade do vírus de resistir às condições desfavoráveis do ambiente e do organismo durante o seu trajeto até o tecido-alvo (Murray *et al.*, 1994; Burnett, 1978).

Apesar da pele ser uma excelente barreira contra infecção, e contar com proteção específica para os orifícios do corpo, tais como lágrimas, muco, epitélio ciliado, ácido gástrico, bile e imunoglobulina A, os vírus penetram no organismo humano através de soluções de continuidade¹ na própria pele ou através das membranas mucoepiteliais que revestem os orifícios do corpo: olhos, vias respiratórias, boca, genitália e trato gastrointestinal, sendo que a forma mais comum de infecção viral, sem dúvida é a inalação (Murray *et al.*, 1994; Levinson *et al.*, 1998).

¹ Lesão. Ferida aberta na pele.

Assim que penetram no organismo, os vírus sofrem replicação em células que expressam receptores virais e que possuem o equipamento biossintético apropriado. O vírus pode replicar-se e permanecer em sítio primário, ou pode trilhar outros caminhos:

- Disseminar-se para outros tecidos através da corrente sangüínea;
- Disseminar-se através do sistema mononuclear-fagocítico e linfático;
- sofrer disseminação através dos neurônios.

O transporte do vírus no sangue é conhecido como viremia. As vias predominantes de transferência viral no organismo são a corrente sangüínea e o sistema linfático. O vírus também pode ter acesso a ambos após lesão tecidual, através do processo da fagocitose ou em decorrência de mecanismos de transporte ativo. Muitos vírus podem ser transportados por entre as células mucoepiteliais da orofaringe, trato gastrointestinal, vagina e ânus. Murray e colaboradores (1994), explicam que “o vírus pode estar livre no plasma ou associado à células nos linfócitos ou macrófagos. Os vírus capturados por macrófagos fagocíticos podem ser inativados, podem replicar-se ou podem ser liberados em outros tecidos através do sistema mononuclear fagocítico (exemplo: linfonodos, baço, fígado, outros tecidos)”. É à partir desse ponto, da replicação viral nos macrófagos, que pode acontecer o que se chama de viremia secundária, que é basicamente a amplificação da infecção, já que esta replicação envolve o revestimento endotelial dos vasos sangüíneos ou o fígado.

Além da corrente sangüínea, os vírus também podem chegar ao cérebro ou ao sistema nervoso central através das meninges e líquido cefalorraquidiano infectado, migração de macrófagos infectados ou por infecção dos neurônios periféricos e sensoriais (olfativos). O revestimento celular endotelial quando infectado pelo vírus contido no sangue pode sofrer uma ruptura, sair dos vasos sangüíneos, atravessar a barreira hematoencefálica e infectar o sistema nervoso central (Murray *et al.*, 1994; Levinson *et al.*, 1998; Burnett, 1978).

1.5 - Replicação Viral

Através dos processos anabólicos de uma célula hospedeira acontece a replicação viral. A partícula invasora fornece instruções específicas para construção, como se fosse um programa de síntese, onde as instruções que são em forma de ácidos nucleicos, que são utilizados para codificar sua auto-replicação. O processo de multiplicação na verdade é executado por uma célula hospedeira; a replicação jamais se dará pela simples multiplicação de uma partícula invasora (Levinson *et al.*, 1998; Alberts *et al.*, 1997).

A reprodução dos vírus é composta por uma fase replicativa inicial, onde se juntam todos os componentes que se fazem necessários para a formação de novas partículas virais. Mais tarde, estes componentes se unem em uma fase chamada de montagem ou sincronização das fases de síntese (Levinson *et al.*, 1998; Murray *et al.*, 1994).

A unidade elementar infectante do vírus é o vírion. São considerados como partículas incompletas (não maduras) os produtos intermediários do processo de síntese viral, que termina com a liberação do vírion, ou o excedente de tais produtos, que podem ocorrer em algumas fases da síntese viral (Falke, 1979).

Resumindo, existe praticamente uma ordem cronológica de acontecimentos dentro da replicação viral: primeiro acontece os eventos precoces - *ligação, penetração e desnudamento*; depois os eventos intermediários - *expressão gênica e replicação do genoma*; e por último os eventos tardios - *montagem e liberação*.

As partículas virais penetram na célula após serem envolvidas em uma vesícula pinocítica onde inicia o desnudamento. Este desnudamento do genoma viral, nada mais é do que o momento em que ocorre a remoção das proteínas do capsídeo liberando o genoma. É o baixo pH na vesícula pinocítica que favorece o desnudamento. A ruptura da vesícula ou a fusão da camada exterior do vírus com a membrana da vesícula faz com que o cerne do vírus penetre o citoplasma (Levinson *et al.*, 1998).

Logo após o desnudamento viral, ocorre os chamados eventos precoces, que é o momento em que o mRNA e as proteínas precoces (enzimas necessárias para a replicação do genoma viral) são sintetizadas. As proteínas na superfície do vírion ligam-se a proteínas receptoras específicas na superfície celular por ligações fracas não-covalentes. Esta especificidade determina o espectro de hospedeiro do vírus, porque

alguns vírus são restritos enquanto outros são muito amplos com relação a hospedeiros, as diferenças de síntese de RNA tais como fita simples, fita dupla, polaridade positiva ou negativa explicam porque o ácido nucléico purificado é infectivo e pode driblar o espectro de especificidade de hospedeiro determinado pela interação proteína viral-receptor celular. Todos os vírus são infectivos, mas nem todo RNA ou DNA viral purificado é infectivo (Levinson *et al.*, 1998; Albert *et al.*, 1997).

Na realidade, o primeiro passo na expressão gênica viral é a síntese de mRNA. É neste ponto que o vírus pode seguir diferentes caminhos, dependendo da natureza de seu ácido nucléico e do local onde ocorrerá a replicação viral intracelular.

Uma vez que o mRNA de um vírus DNA ou RNA é sintetizado, este é traduzido em proteínas virais por ribossomos da célula hospedeira, algumas das quais são as proteínas precoces necessárias para a replicação do genoma viral. A mais importante de todas as proteínas precoces, em muitos vírus de RNA, é a polimerase que sintetizará diversas cópias do material genético para as partículas da progênie do vírus. Não importa como o vírus faz o seu mRNA, quase todos os vírus produzem uma polimerase codificada pelo vírus (uma replicase) que replica o genoma, isto é, produz muitas cópias do genoma parental que por sua vez vai ser o genoma da progênie. A replicação do genoma viral segue o princípio da complementariedade, a qual requer que uma fita com uma seqüência de bases complementares seja sintetizada; esta fita então servirá como molde para a síntese do genoma viral (Murray *et al.*, 1994; Levinson *et al.*, 1998).

À medida que a replicação do genoma viral acontece (figura 2), as proteínas estruturais do capsídeo a serem usadas na progênie são sintetizadas, ou seja, agora em uma segunda etapa, o mRNA e as proteínas tardias são sintetizadas (as proteínas tardias, são proteínas estruturais e do capsídeo) e em alguns casos, os genomas virais recém-replicados podem servir como moldes para o mRNA tardio fazer as proteínas capsídicas (Levinson *et al.*, 1998).

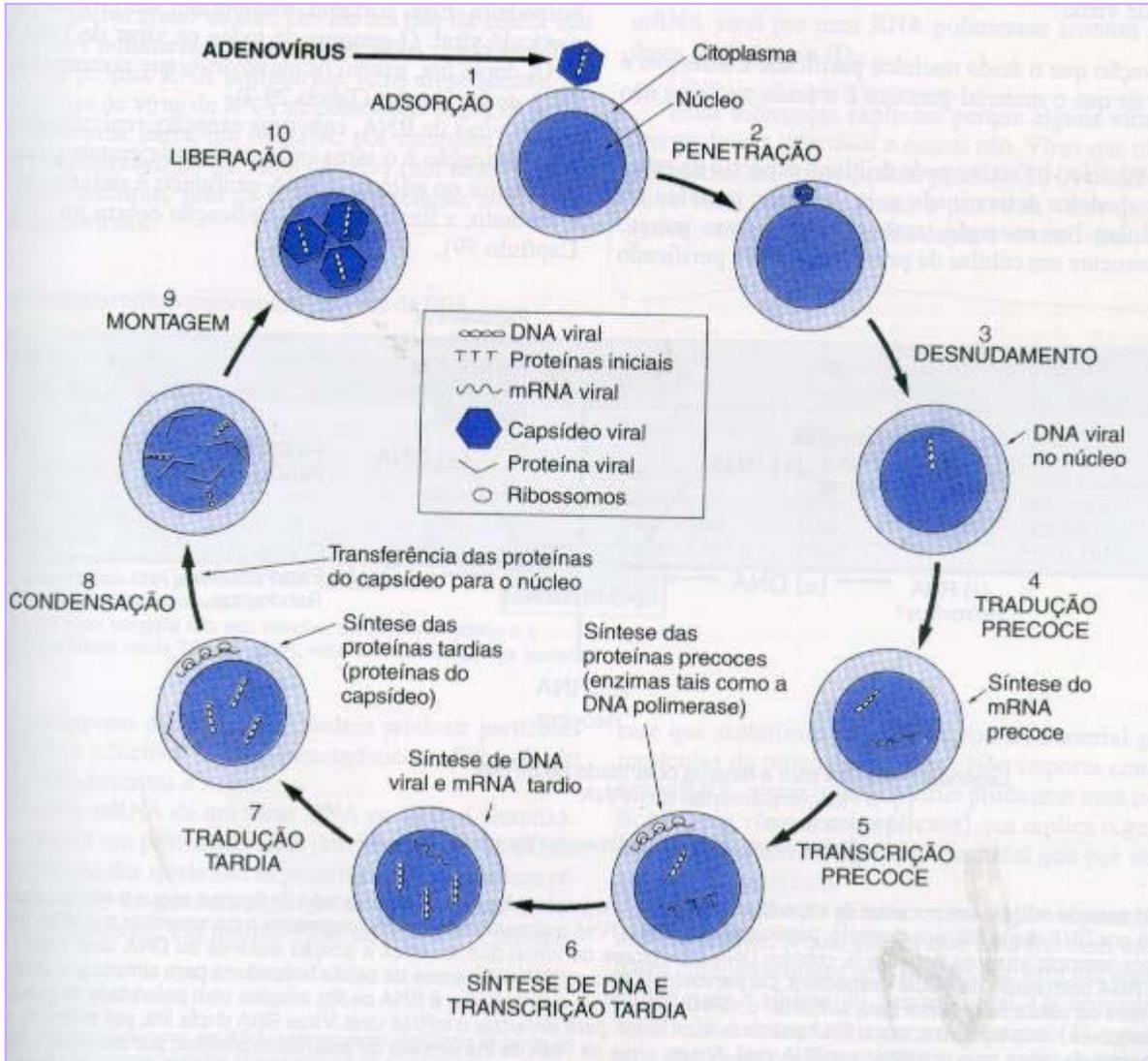


Figura 2: Esquema do ciclo replicativo viral de um Adenovírus
Fonte: (Levinson *et al.*, 1998)

O DNA viral replica no núcleo e usa a RNA polimerase DNA dependente necessitando da célula hospedeira para sintetizar seu próprio mRNA. O DNA genômico de fita simples é convertido em dupla fita pela DNA-polimerase da célula hospedeira. Uma DNA polimerase codificada pelo vírus sintetiza o DNA da progênie. Com exceção do parvovírus, todos os vírus de DNA codificam sua própria DNA polimerase que replica o genoma. Eles não usam a DNA polimerase da célula hospedeira. Os poxvírus são exceção porque replicam-se no citoplasma, onde não tem acesso a RNA polimerase da célula hospedeira. Eles, portanto, transportam sua própria polimerase na partícula viral. O genoma de todos os vírus de DNA consiste de DNA dupla fita, exceto os parvovírus, que possuem um genoma de DNA de fita simples. Com relação ao vírus de

RNA, eles replicam-se no citoplasma. A exceção é o vírus influenza, onde grande parte da replicação ocorre no núcleo, o RNA genômico é sintetizado neste local, entretanto, a finalização da replicação ocorre no citoplasma (Levinson *et al.*, 1998; Alberts *et al.*, 1997).

Após a replicação do material genético e associação com novas proteínas capsídicas os vírions são formados e liberados da célula. A chamada fase de montagem é quando as partículas da progênie são montadas pelo empacotamento do ácido nucléico viral nas proteínas do capsídeo.

As partículas virais são liberadas da célula por dois processos. Um é pela ruptura da membrana celular e pela liberação de partículas maduras; isto ocorre frequentemente, com vírus sem envelope. O outro, que ocorre em vírus com envelope, é a liberação do vírus por brotamento através da membrana celular externa. O processo de brotamento inicia quando as proteínas específicas do vírus são inseridas na membrana celular em locais específicos (Levinson *et al.*, 1998).

O nucleocapsídeo viral interage com sítios específicos na membrana mediado pela proteína de matriz. A membrana celular se evagina nesses locais e partículas com envelope brotam da membrana. O brotamento freqüente não causa dano a célula e, em certas ocasiões, a célula sobrevive enquanto produz um grande número de partículas virais (Murray *et al.*, 1994).

Existem quatro aspectos interessantes do mRNA viral e sua expressão em células eucarióticas:

Os mRNAs virais tem três atributos em comum com os mRNAs: na extremidade 5' há um "capacete" que é uma guanina metilada no nitrogênio da posição 7, que servem para dar maior estabilidade à molécula de mRNA (transcrito primário), o qual é ligado por uma ponte invertida (3' para 5') ao invés da ligação 5' para 3'; no final 3' há uma cauda de 100-200 resíduos de adenosina [poli(A)]; e o mRNA é gerado pelo processamento de um grande transcrito do genoma. Na verdade, essas três modificações foram primeiro observadas em estudos dos mRNAs virais e então aplicadas aos RNAs celulares.

Alguns vírus usam seu material genético completo, produzindo mais de um tipo de mRNA da mesma porção do DNA pela mudança da janela leitura. Isto é feito pelo início da transcrição a uma ou duas bases após o sítio de iniciação original (Falke, 1979; Murray *et al.*, 1994; Levinson *et al.*, 1998).

Em alguns vírus de DNA, há um controle temporal sob a região do genoma que é transcrito em mRNA. Durante os estágios iniciais do ciclo replicativo, antes do início da replicação do DNA, somente as regiões iniciais do genoma são transcritas e, portanto, *somente certas proteínas precoces* são produzidas, uma das proteínas precoces e uma repressora dos genes tardios; isto previne a transcrição até o momento apropriado (Levinson *et al.*, 1998).

Existem três processos diferentes que são usados para gerar um mRNA monocistrônico² que codificará uma única proteína do genoma viral policistrônico³:

- 1 - mRNA individuais são transcritos pelo início em muitos pontos de iniciação diferentes ao longo do genoma, que é o mesmo mecanismo usado pelas células eucarióticas e por herpevírus, adenovírus e vírus tumorais de RNA e DNA.
- 2 – Nos retrovírus e vírus influenza, o genoma é segmentado em múltiplos fragmentos, e cada um codifica para um único mRNA;
- 3 – N- poliovírus, RNA genômico inteiro é traduzido em um longo polipeptídeo, o qual é então clivado por uma protease, nas proteínas específicas (Murray *et al.*, 1994).

Os vírus causam doenças quando transpõem as barreiras protetoras naturais do organismo, escapam do controle imunológico e matam células de um tecido importante (por exemplo: cérebro) ou deflagram uma resposta imune e inflamatória destrutiva. A evolução de uma infecção viral pode possuir três tipos potenciais: abortiva (fracasso da infecção), lítica (morte celular) e persistente (sem morte celular), e é determinada pela natureza da interação entre vírus e hospedeiro e pela resposta do hospedeiro à infecção. A replicação do vírus pode iniciar alterações nas células, resultando em citólise ou em alterações na aparência, propriedades funcionais ou antigênicidade da célula. Os efeitos sobre a célula podem resultar do controle da síntese macromolecular assumido pelo vírus, do acúmulo de proteínas ou partículas virais ou de uma modificação ou ruptura das estruturas celulares (Murray *et al.*, 1994, Levinson *et al.*, 1998).

² Mono (hum) cístron (unidade fisiológica do DNA que corresponde à menor porção do mesmo, capaz de codificar uma cadeia polipeptídica completa).

³ Poli (vários) cístron

1.6 - Mutação Viral

As mutações podem ser causadas por substâncias químicas, radiações ou vírus. Certos vírus, como o vírus bacteriano Mu (bacteriófago mutagênico), causam uma frequência alta de mutações quando seu DNA é inserido no cromossomo bacteriano. Devido a esse fato, do DNA do vírus bacteriano poder ser inserido em muitos sítios diferentes, mutações em vários genes bacterianos podem ocorrer. Essas mutações são frameshift ou deleções (Alberts *et al.*, 1997; Murray *et al.*, 1994).

As mutações no DNA e RNA viral ocorrem, como no caso das bactérias pelo processo de substituição de bases, deleção e mudança de fases de leitura. Uma mutação é uma alteração na sequência de bases do DNA que normalmente resulta na inserção de um aminoácido diferente em uma proteína e no aparecimento de um fenótipo alterado. Essas mutações resultam de três tipos de alterações moleculares:

Substituição de bases: ocorre quando uma base é substituída por outra. Acontece no momento da replicação, devido a erros introduzidos pela DNA polimerase, ou a ação de um agente mutagênico que altera as partes de hidrogênio de uma fita que está sendo utilizada como molde, de tal forma que uma base errada é incorporada. Resulta em mutação *missense* (um códon⁴ que simplesmente causa a substituição por um aminoácido diferente) ou mutação *nonsense* (um códon de terminação que determina o final da síntese protéica prematuramente).

Frameshift: ocorre quando um ou mais pares de bases são adicionados ou deletados, o que altera a fase de leitura no ribossomo, resultando na incorporação de aminoácidos errados a partir deste ponto de mutação e na produção de uma proteína inativa.

Transposição ou sequência de inserção: tipo de mutação que ocorre quando transposição ou sequência de inserção são integradas no DNA. Os novos segmentos de DNA inseridos podem acarretar profundas mudanças nos genes localizados no ponto de inserção e nos genes adjacentes (Murray *et al.*, 1994; Alberts *et al.*, 1997).

⁴ Cada conjunto de 3 nucleotídeos que se fazem identificar por suas bases nitrogenadas purínicas ou pirimidínicas, no RNAm. Cada códon do RNAm deve ser complementado, depois, por um anticódon de um RNAt, na ocasião da síntese protéica – fenômeno do código genético.

As mutações condicionais⁵ letais são extremamente valiosas na determinação da função dos genes virais. Funcionam normalmente sob condições permissivas, mas falham ao replicar ou ao expressar um gene mutante sob condições restritivas. Os mutantes condicionais letais, sensíveis à temperatura expressam seu fenótipo a baixas temperaturas (permissiva) mas, em altas temperaturas (restritivas), o produto do gene mutante é inativo. O mutante sensível à temperatura do vírus do sarcoma Rous pode, em temperaturas permissivas de 37 °C, transformar células normais em células malignas. Quando as células transformadas crescem em temperaturas restritivas de 41 °C, o fenótipo reverte à aparência e comportamento normais. O fenótipo maligno é restaurado quando a temperatura permissiva é restaurada (Alberts *et al.*, 1997; Murray *et al.*, 1994).

Alguns mutantes por deleção tem a prioridade incomum de serem partículas interferentes defectivas. São defectivas porque podem replicar-se, a menos que a função deletada seja substituída por um vírus auxiliar. Esses mutantes também alteram no crescimento dos vírus normais se eles infectarem primeiro e esgotarem as funções celulares necessárias. Estas partículas defectivas podem ter uma função na recuperação de infecções virais, pois podem intervir com a produção da progênie do vírus, limitando a difusão dos vírus para as outras células (Levinson *et al.*, 1998; Alberts *et al.*, 1997).

Existem dois tipos de mutantes considerados de maior interesse científico: as mutações variantes antigênicas, como aquelas que ocorrem freqüentemente com o vírus influenza, que apresentam alterações nas proteínas de superfície e, portanto, não podem mais ser inibidos pelos anticorpos pré-existentes no hospedeiro, proporcionando que a variante cause doença, enquanto que a linhagem original não o faz. O outro tipo são os mutantes resistentes a drogas, que são insensíveis às drogas antivirais porque o alvo da droga, que é uma enzima antiviral, foi modificada (Levinson *et al.*, 1998; Murray *et al.*, 1994).

⁵ A palavra “condicional” indica que a mutação é expressa apenas em determinadas condições. As mutações condicionais letais mais importantes são sensíveis à temperatura e podem resultar em vacinas úteis.

1.7- Recombinação Viral

Recombinação é um termo utilizado para descrever uma troca de material genético entre cromossomos, que resulta num rearranjo de genes diferentes do original. Na recombinação viral, quando dois vírus geneticamente distintos infectam uma célula podem ocorrer três tipos de fenômenos: recombinação, complementação ou mistura fenotípica (Murray *et al.*, 1994; Levinson *et al.*, 1998; Alberts *et al.*, 1997).

A recombinação é a troca de genes entre dois cromossomos baseada no entrecruzamento dentro de regiões com significativa homologia de sequência de bases. A recombinação pode ser facilmente demonstrada para vírus que possuem DNA de dupla fita com material genético e tem sido usada para determinar seu mapa genético. Entretanto, recombinação por vírus de RNA ocorre em baixa frequência. Rearranjo é o termo usado quando vírus com genoma segmentado, como o vírus influenza, troca segmentos, resultando em trocas gênicas mais frequentes do que a recombinação. O rearranjo dos segmentos de RNA do vírus influenza está envolvido nas principais mudanças antigênicas dos vírus responsáveis pelas epidemias recorrentes de influenza. Com Relação ao DNA, uma propriedade importante é sua capacidade de sofrer rearranjos, que pode variar uma combinação particular de genes presentes em um genoma individual, no momento exato e o nível de expressão destes genes. São reconhecidas duas classes de recombinação genética, a recombinação geral, que é a troca genética que ocorre entre qualquer par de seqüências homólogas de DNA e a recombinação sítio-específica que é a troca que ocorre entre pequenas seqüências de nucleotídeos específicos (Alberts *et al.*, 1997; Murray *et al.*, 1994; Levinson *et al.*, 1998).

No caso da complementação pode ocorrer quando um ou ambos vírus que infectam a célula apresentam uma mutação que resulta em uma proteína não-funcional. O vírus que não sofreu mutação “complementa” o vírus mutado produzindo uma proteína funcional que serve para ambos. A complementação é um método importante pelo qual um vírus auxiliar permite a replicação de vírus defectivos. Um exemplo de complementação clinicamente importante é o vírus da hepatite B que fornece seu antígeno de superfície ao vírus dele que é defectivo na sua habilidade de produzir sua própria proteína de capsídeo. Este fenômeno é a base para o teste de complementação, que pode ser utilizado para determinar como os genes estão presentes no genoma viral. O teste é feito para determinar se um vírus mutante pode complementar outro vírus

mutante. Se for possível, as duas mutações estão presentes em genes separados, porque produzem proteínas complementares diferentes. Se não for possível, as duas mutações estão no mesmo gene e ambas proteínas são funcionais. Realizando vários desses testes com diferentes mutações, é possível determinar os domínios funcionais dos grupos de complementação que correspondem aos genes. Controles apropriados são necessários para evidenciar os efeitos da recombinação (Murray *et al.*, 1994).

A mistura fenotípica é quando o genoma de um vírus pode ser recoberto com as proteínas da superfície de outro vírus. Este vírus, fenotípicamente misturado, pode infectar células como determinado pela proteína de revestimento do segundo vírus. Entretanto, a progênie desta infecção terá proteína de revestimento do tipo do primeiro vírus que é codificada somente pelo material genético do primeiro vírus. Podemos citar como exemplo de mistura fenotípica os pseudotipos, o qual consiste do nucleocapsídeo de um vírus e do envelope do outro. Pseudotipos compostos do nucleocapsídeo do vírus da estomatite vesicular, que é um rbdovírus e do envelope do vírus da imunodeficiência humana – HIV, que é um retrovírus estão sendo usados para estudar a resposta imune ao HIV (Murray *et al.*, 1994).

2.0 - O PAPILOMA VÍRUS HUMANO - HPV

2.1 - Histórico

Papiloma vírus humano (HPV) é um vírus que pertence à categoria papovavírus, família papovaviridae. É conhecido e descrito há milênios por gregos e romanos como sendo verrugas genitais. Em 1879 chegou-se a relacionar o HPV com a sífilis ou gonorréia já que acreditava-se numa etiologia comum para as doenças sexualmente transmissíveis “veneno venéreo” (Meisels *et al.*, 1981; Pires & Gouvêa, 2001).

Ainda no século XIX, acreditava-se que as lesões provocadas pelo HPV eram causadas por irritação do epitélio por descargas genitais, sujeira e outros agentes, e esta idéia foi aceita até o início do século XX (Oriol 1971; Pires & Gouvêa, 2001). Nesta mesma época chegaram a relacionar as verrugas genitais com as não-genitais, o que foi chamada de “teoria unitária” devido às evidências histológicas de que normalmente pacientes com verrugas genitais, também apresentavam verrugas não genitais. Fizeram experimentos com extratos de verrugas penianas, onde as mesmas foram inoculadas na pele de outras áreas do corpo, e ocasionaram o desenvolvimento nos sítios inoculados de verrugas planas ou comuns. Foram estes experimentos que estabeleceram uma etiologia virótica para as verrugas, mas sem contestar a “teoria unitária” e sem levar em consideração a alta frequência da transmissão sexual das verrugas genitais, diferentemente dos outros tipos de verrugas.

À partir de 1949 a etiologia virótica das verrugas não genitais foi comprovada por vários autores através da identificação de partículas viróticas esféricas intranucleares nas camadas mais superficiais de epiderme, com auxílio da microscopia eletrônica. As informações eram conflitantes, sendo de etiologia virótica incerta até que em 1970, Oriol & Almeida, identificaram partículas viróticas esféricas intranucleares, semelhantes às da verruga vulgar em 13 dentre 25 verrugas genitais examinadas (Pires & Gouvêa, 2001).

Concluiu-se em 1954, através de estudos epidemiológicos, que as verrugas eram doença venérea de etiologia virótica, independente das verrugas não genitais. Isso foi possível devido a observação de que em um período de quatro a seis semanas após os soldados veteranos voltarem da guerra da Coréia e Japão suas mulheres teriam

aparecido infectadas com as mesmas verrugas penianas que estes apresentavam. (Oriel, 1971; Pires & Gouvêa, 2001).

Em 1978, conseguiu-se definir a presença de partículas morfologicamente idênticas ao HPV em células infectadas, à partir do estudo de esfregaços e cortes histológicos de lesões condilomatosas, mas a presença do HPV só ocorreu em 1980 através da identificação de antígenos pela técnica peroxidase-antiperoxidase.

Meisels e colaboradores (1981), ao correlacionarem os achados citopatológicos, colposcópicos e histopatológicos de lesões condilomatosas da cérvix e vagina de pacientes com diagnóstico citopatológico prévio de lesão condilomatosa, obtiveram uma discrepância entre os achados. Foi neste ponto que se descreveu a lesão da infecção subclínica pelo HPV, clinicamente menos evidente que o condiloma acuminado, portanto, pouco visível a olho nu e colposcopicamente discreta, mas que citologicamente exibia as mesmas características da lesão da infecção clínica (Pires & Gouvêa, 2001).

A identificação do HPV através de métodos de imuno-histoquímica e microscopia eletrônica não elucidou a origem da coilocitose (vacuolização perinuclear acompanhada de hipercromasia e aumento do volume nuclear), somente demonstrou relação entre os dois (Pires & Gouvêa, 2001).

Atualmente se sabe, que o HPV é um vírus com mais de 70 tipos identificados, alguns responsáveis por verrugas vulgares, outros por verrugas anogenitais e ainda papilomas da nasofaringe (Murray *et al.*, 1994; Pires & Gouvêa, 2001).

Sabe-se que a infecção por HPV é capaz de causar infecções líticas, crônicas, latentes e transformadoras, dependendo da célula hospedeira. Pode causar doenças como o câncer de colo de útero, câncer de pênis, câncer de pele, papiloma escamoso do esôfago além de ser uma porta aberta para infecção pelo vírus HIV.

2.2 - Características Biológicas do HPV

A característica mais específica do HPV é que o genoma viral é preservado como DNA episossomal, que não é integrado ao genoma hospedeiro, na maioria dos tumores benignos de HPV. A capacidade episossomal torna o HPV um vetor de terapia genética, um vetor que já foi testado em camundongos e pode ser experimentado em humanos. A infecção subclínica por papilomavírus é o tipo de HPV que aparenta ser menos prejudicial, porém o que apresenta o pior prognóstico (Pires & Gouvêa, 2001).

Verrugas planas invisíveis macroscopicamente freqüentemente podem se tornar neoplásicas, costumam surgir na mucosa genital ou na superfície da pele e nos casos de tumores malignos de HPV, constantemente detecta-se que o DNA viral está integrado (Carvalho *et al.*, 2000).

Uma verruga ou tumoração benigna, é a manifestação patológica da infecção por HPV. Essas manifestações às vezes progridem para uma condição maligna, portanto, o HPV é um bom modelo para o estudo da progressão de tumores. Os vírions do HPV infectam as células epidérmicas germinais na camada celular basal. Essas células não permitem a replicação do HPV. À medida que as células germinais se dividem e se deslocam para a superfície, elas disseminam o vírus a todas as células irmãs. Essas células se transformam e proliferam de forma displásica. Essa camada celular fica mais grossa e cada célula passa a ficar vacuolizada, tomando uma aparência clássica de verruga, porém, a aparência de uma verruga deve-se à proliferação de células, e não à destruição de células (Neto, 1999).

À medida que as células infectadas passam por um processo de diferenciação e ceratinização, elas permitem a replicação viral. Os vírions infectivos são agrupados e liberados por essas células. Os vírions podem reinfectar as células adjacentes, razão pela qual as verrugas serem contagiosas e aparecerem agrupadas. Se várias células basais diferentes, próximas umas das outras, são infectadas, suas colônias em sobreposição adquirirão a aparência de uma verruga em forma de couve-flor (Neto, 1999).

2.3 - Epidemiologia e formas de infecção pelo HPV

Atualmente, a infecção genital pelo papilomavírus humano (HPV) é a doença sexualmente transmissível (DST) viral mais freqüente na população sexualmente ativa (Carvalho *et al.*, 2000).

O HPV resiste à inativação e pode ser transmitido sexualmente, e raramente até através de fomites⁶. A eliminação assintomática do vírus pode promover a sua transmissão. As infecções por HPV são transmitidas por contato direto e adquiridas através de pequenas soluções de continuidade da pele ou mucosa. Pode ocorrer inoculação durante a relação sexual, durante passagem do recém-nascido por um canal do parto infectado ou em consequência da mastigação de verrugas, o que normalmente, é um hábito infantil (Murray *et al.*, 1994; Levinson *et al.*, 1998).

As verrugas comuns, plantares e planas são mais comuns em crianças e adultos jovens. A menor incidência observada em adultos pode resultar da imunidade adquirida. Ocorrem papilomas laríngeos em crianças de baixa idade e adultos de meia-idade (Carvalho *et al.*, 2000).

Os papilomas orais e solitários constituem os tumores epiteliais mais benignos da cavidade oral, são pediculados, com uma haste fibrovascular, e sua superfície geralmente possui aspecto papilar rugoso. Podem ocorrer em indivíduos de qualquer grupo etário; em geral, são solitários e raramente sofrem recidiva após excisão cirúrgica. Os papilomas laríngeos estão comumente associados aos HPV-6 e HPV-11 e constituem os tumores epiteliais mais comuns da laringe. Entretanto, a papilomatose laríngea é geralmente considerada uma condição potencialmente fatal em crianças, devido ao risco de obstrução das vias aéreas pelos papilomas. Em certas ocasiões, os papilomas podem estender-se pela traquéia e atingir os brônquios (Murray *et al.*, 1994; Carvalho *et al.*, 2000).

⁶ Objetos de qualquer natureza e substâncias ou materiais não alimentícios que servem para promover contágio de uma doença infecto-contagiosa. Compreende desde diminutas partículas de saliva “gotículas Flugge” ou material das vias aéreas expelidas pelo doente ao falar, tossir, expirar, até roupas íntimas, toalhas de banho de uso comum contaminados pelo contato dos infectados.

2.4 - Estrutura, Replicação e Genoma Viral

O vírus papiloma humano possui um genoma de DNA de cadeia dupla combinado com histonas⁷, formando um complexo semelhante a um cromossoma, contido num capsídeo externo de proteína virótica. Esse capsídeo é formado por 72 subunidades (capsômeros), com arranjo icosaédrico, sendo por este motivo, de aparência esférica à microscopia eletrônica (Pires & Gouvêa, 2001).

O capsídeo icosaédrico dos HPV mede 50 a 55 nm de diâmetro e consiste em duas proteínas estruturais, que formam os 72 capsômeros. O genoma do HPV é circular e constituído de 7.800 a 8.000 pares de bases (Pires & Gouvêa, 2001).

O HPV é constituído por dois tipos de proteína estrutural: L1 (proteína maior), que é gênero-específica, sendo sua presença correlacionada à presença de HPV intacto nos tecidos, que serve como medidor indireto de infectividade e L2 (proteína menor), que é altamente tipo-específica (Lorincz *et al.*, 1992).

O genoma do vírus é constituído por dois segmentos principais, sendo cada um desses segmentos constituídos por uma série de regiões ou ORFs (“opening reading frames”) que codificam as proteínas virais. O segmento E (“early”) que representa 45% do genoma, é constituído por oito ORFs e codifica proteínas relacionadas com replicação e controle do genoma. O segmento L (“late”) que representa 40% do genoma é responsável por codificar as proteínas estruturais do capsídeo do vírus. Entre os segmentos L e E existe um outro segmento que representa 15% do genoma, que contém elementos regulatórios (Lorincz *et al.*, 1992).

O DNA do HPV codifica sete ou oito genes precoces (E1 a E8), dependendo do vírus, e dois genes tardios ou estruturais (L1 e L2), e também uma origem de transcrição e replicação, todos localizados em um filamento positivo, conforme mostra figura 3 (Lorincz *et al.*, 1992).

⁷ (histos) tecidos; (ona) aumentativo. O DNA eucariótico é replicado não como um DNA nu, mas como uma cromatina, onde o DNA é complexado a proteínas firmemente ligadas, denominadas histonas, que formam estruturas em forma de disco em torno das quais o DNA é enrolado, criando o nucleossomo.

Human Papillomavirus Genome

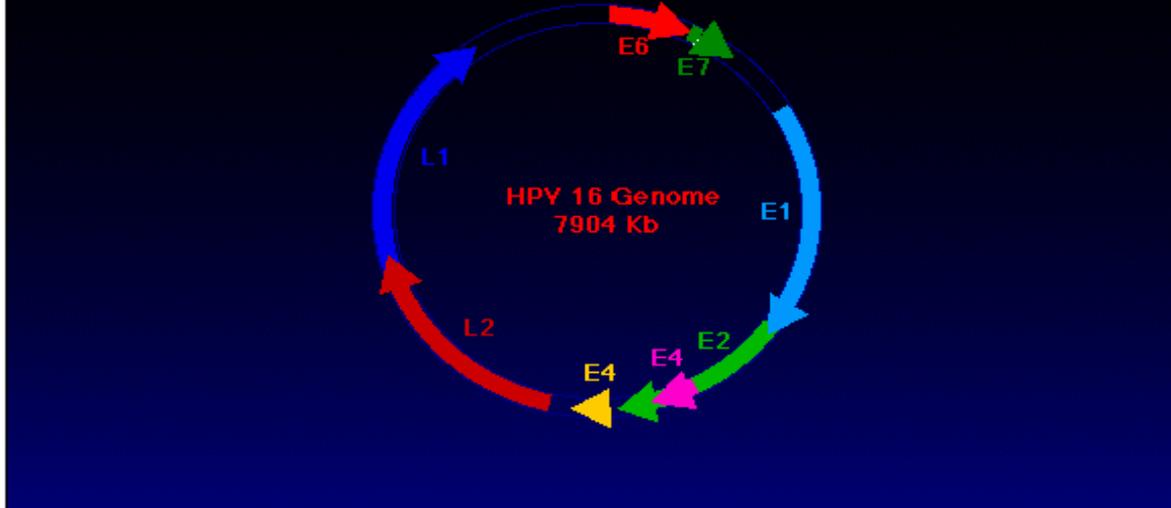


Figura 3 : genoma do papiloma vírus humano. E1 a E7 e L1 e L2 correspondem aos genes precoces e genes tardios, respectivamente.

Fonte: Link Internet (UCT Department of Medical Microbiology University of Cape Town)

A replicação do HPV, como visto nos vírus em geral, depende do equipamento transcricional da célula hospedeira. O vírus permanece latente na forma de plasmídeo na camada basal de células, porém replica-se nas células epiteliais em diferenciação da pele ou mucosa. Os fatores nucleares específicos expressos nas diferentes camadas e tipos de pele e mucosa controlam a transcrição dos genes virais e a replicação dos genomas (Murray *et al.*, 1994; Pires & Gouvêa, 2001).

Em função do fato do vírus depender inteiramente do maquinário biológico da célula do hospedeiro para se replicar, ocorre replicação epissomal junto com o DNA da célula basal mitoticamente ativa. A replicação viral depende do estágio de diferenciação das células epiteliais, onde é persistente na camada basal e ativa nos ceratinócitos⁸ diferenciados, ou seja, a replicação dos vírus correlaciona-se com a expressão de queratinas específicas (Carvalho *et al.*, 2000; Murray *et al.*, 1994).

Com a migração da célula para a superfície, cessa a multiplicação celular mas não a do HPV, sendo produzidas milhares de cópias por célula. Os genes tardios (“late”) são expressos nas células escamosas maduras, e é nelas que se dá a formação de partículas virais completas (HPV-DNA e proteínas do capsídeo). É isso que forma o vacúolo do coilócito (produção e saída do vírus com destruição do citoesqueleto) (Pires & Gouvêa, 2001).

Na fase inicial, conhecida com fase de inoculação, o vírus penetra no novo hospedeiro através de microtraumatismos. Os vírions então progridem até a camada basal, atravessando a membrana citoplasmática. O genoma viral é transportado para o núcleo, onde é traduzido e transcrito. Duas classes de proteínas são codificadas: proteínas transformadoras, que induzem funções na célula hospedeira, e proteínas reguladoras, que controlam a expressão dos genes virais (Carvalho *et al.*, 2000).

Na segunda fase, acontece o período de incubação. O período de incubação do condiloma acuminado varia de 2-3 semanas a 8 meses e parece estar relacionado com a competência imunológica individual. Questiona-se se o grau de infectividade estaria relacionado ao tempo de duração ou ao tipo de lesão – carga viral, ou seja o tipo do HPV (Carvalho *et al.*, 2000).

A terceira fase, é conhecida como fase precoce, onde três meses após o surgimento das primeiras lesões, tem início uma resposta imune adquirida que pode conter a infecção (regressão) ou ser insuficiente para eliminá-la, que é a fase de expressão ativa (Carvalho *et al.*, 2000).

Na maioria dos carcinomas, o HPV-DNA de alto risco está integrado no genoma celular. Esta integração ocorre em sítios frágeis do genoma celular de forma randômica, mas consistentemente resulta na desrupção da região E1/E2, com resultante diminuição da transcrição de E2. Uma vez que o produto deste gene reprime a expressão dos oncogenes E6 e E7, passa a haver superprodução dos mesmos. Como a integração

⁸ Células que podem produzir queratina.

interrompe o genoma viral, a produção de partículas virais completa não ocorre (Howard & Burnett, 1990).

O produto do gene E6 destrói o produto do anti-oncogene p53 e também inibe a expressão aumentada do gene p53 que é supressor de tumores e que ocorre usualmente após agressão celular. Desta forma, afirma-se que, a infecção por HPV pode promover divisão celular descontrolada e o desenvolvimento de mutações somáticas herdáveis, ou seja, a degeneração da proteína p53 resulta no bloqueio das respostas celulares aos danos sofridos pelo DNA (figura 4), permitindo assim a acumulação de alterações genéticas e a criação de um genótipo maligno (Howard & Burnett,1990).

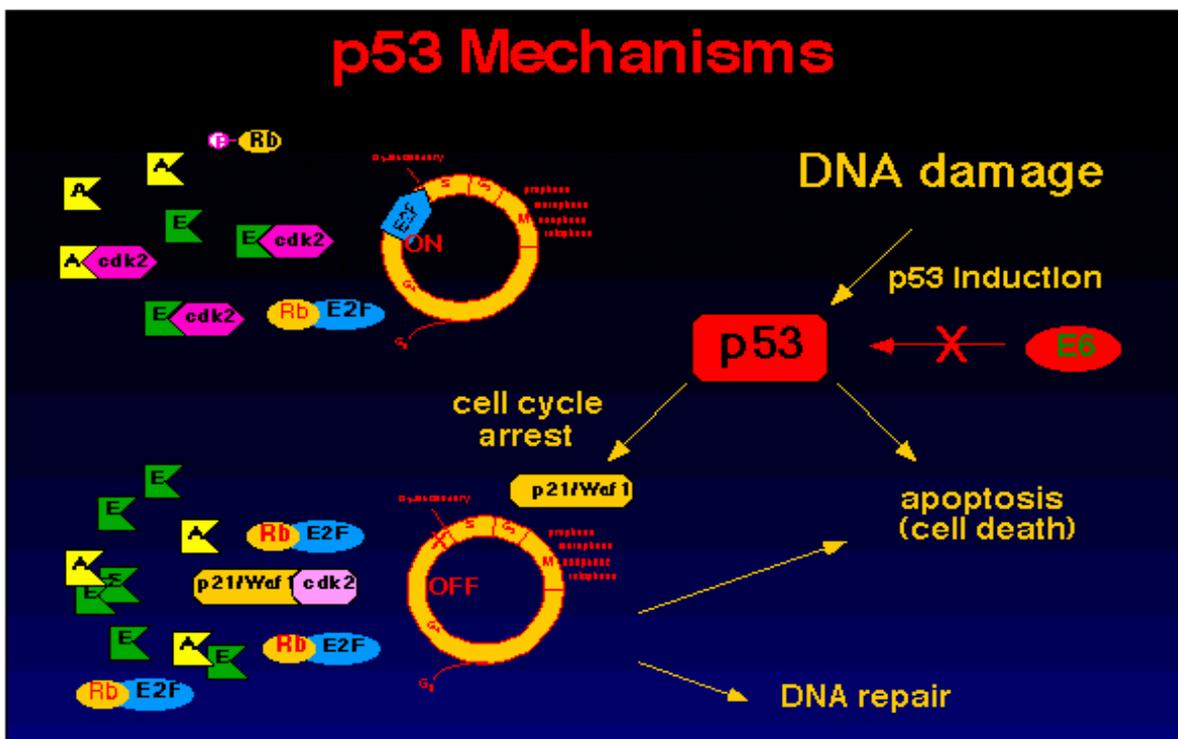


Figura 4 : mecanismo do gene p53 em uma célula hospedeira. A proteína E6 liga-se à proteína p53.

Fonte: Link Internet (UCT Department of Medical Microbiology University of Cape Town)

Igualmente, o produto da proteína E7 do HPV combina-se com o produto do gene retinoblastoma (Rb) supressor de tumores (figura 5) e pode causar depressão ainda maior nas defesas contra o desenvolvimento de malignidade. O produto do gene E7 se liga ao produto do gene supressor de tumor Rb, e interage com ciclinas e outras proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular (Silverberg, 1997).

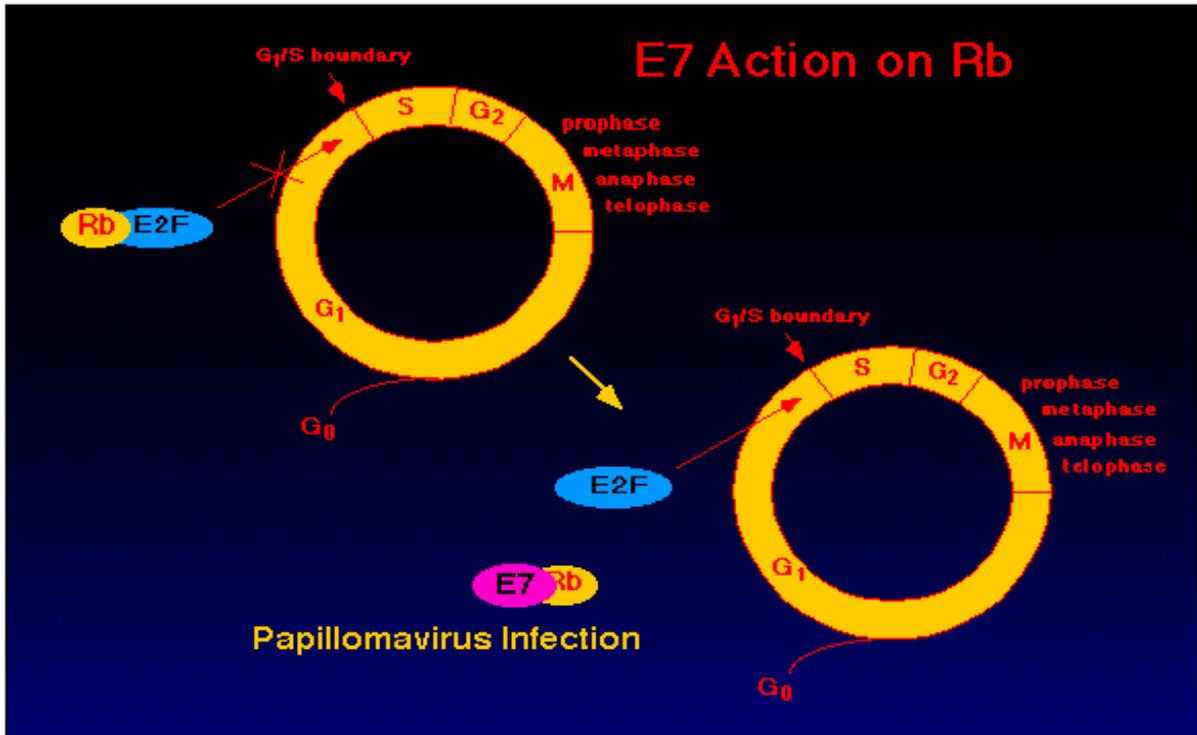


Figura 5: Proteína E7 do HPV interagindo com o gene retinoblastoma

Fonte: Link Internet (UCT Department of Medical Microbiology University of Cape Town)

2.5 - Classificação e Tipos de HPV

A classificação dos HPVs baseia-se em sua relação do DNA, ou seja, já que estes vírus não podem crescer facilmente em cultura de tecido. Com base na homologia de seqüência exibida por diferentes HPV, foram identificados pelo menos 70 tipos com genótipos diferenciados, onde cada genótipo é considerado único se a hibridização de fase líquida de seu DNA digerido demonstra ter um nível de homologia menor que 50% com outros genótipos de HPV (Coordenação Nacional de DST, 1999; Halbe, 2000).

Sua classificação está distribuída em grupos cutâneos, que infecta a pele e grupos mucosos que infectam as regiões urogenitais e bucorespiratórias. Um subgrupo dos HPVs cutâneos é responsável pelas verrugas encontradas nas extremidades de pessoas saudáveis, um número maior de tipos conhecidos de HPV constitui um subgrupo que somente pode ser isolado da pele de pessoas com comprometimento imunológico. Os HPVs mucosotrópicos geralmente são encontrados exclusivamente nos locais urogenitais ou bucorespiratórios (Murray *et al.*, 1994).

Na argumentação taxonômica pretende-se com os agrupamentos mostrar que a principal base para eles é análise filogenética das seqüências de codificação L1.

Distribuídos em grupos, o grupo F, compreende os diversos tipos de HPVs que não podem ser classificados satisfatoriamente na estrutura filogenética até o momento. As sequências cutâneas foram colocadas em grupos conforme suas propriedades fenotípicas (Bernard *et al.*, 1994).

Recentes estudos discutem as extensões às quais as relações filogenéticas coincidem de alguma forma com as observações clínicas fenotípicas (Villiers, 1994).

O grupo A consiste dos tipos de papiloma vírus 16, 31, 33, 35, 35h, 52, 58 e 67, um subconjunto de vírus anogenitais de “alto risco e risco intermediário” conforme classificado por Lorincz e colaboradores (1994). Os estudos e pesquisas de Lorincz utilizaram testes de 15 tipos de HPV anogenitais. Os dados obtidos foram utilizados para se determinar o potencial carcinogênico de cada um dos 15 tipos de HPV estudados. O HPV-16, o único tipo de “alto risco” neste grupo, é predominantemente associado com o câncer invasivo. A hibridização positiva para o DNA HPV-16 ocorreu em 47% de todos os cânceres invasivos, 47% das lesões de alto grau (CIN II ou III) e 16% das lesões de baixo grau (CIN I ou condiloma). Risco intermediário de espécies de HPV 31, 33, 35, 35H, 52 e 58, são os mais prevalentes nas lesões da auto grau intraepitelial, e, diferentemente do HPV-16, são menos predominantes em cânceres invasivos. Vários estudos japoneses indicam que a predominância dos tipos HPV-52 e HPV-58 em carcinomas cervicais invasivos é maior do que o reportado nos estudos americanos (Villers, 1994).

Os vírus do grupo A infectam predominantemente os tecidos cervicais e outros locais anogenitais: a vulva, a vagina, o pênis, o períneo e o ânus. Além destes locais, o HPV-16 tem sido mais freqüentemente detectado em carcinomas da cavidade oral, laringe, e menos freqüentemente em lesões da pele (Lorincz *et al.*, 1994).

Seqüências genômicas completas são disponíveis em todos os membros do grupo A, exceto o HPV-67, que foi seqüenciado apenas sobre a região de L1. Das seqüências deste grupo, o HPV-35 e HPV-35h são variante e HPV-33 e HPV-58 são tipos próximos – seqüências que qualificam tipos distintos pelo critério de dez por cento de similaridade no nível nucleotídeo, mas entre as quais a maioria das diferenças são despercebidas, causando uma visão de nenhuma diferença no nível de aminoácidos (Lorincz *et al.*, 1994).

Os HPVs detectados até o momento estão classificados em subtipos de baixo e alto risco, que estão associados a condiloma acuminado e carcinoma invasor, respectivamente, conforme mostrado resumidamente no quadro 3.

Quadro 3 – Classificação e tipos de HPV

Tipos de HPV	Local de Patologia	Tipos de Lesão
1,4	Palma da mão e planta do pé	Verrugas palmares/plantares
2	Extremidades superiores/inferiores	Verrugas comuns
3,10	Mãos e rosto	Verrugas planares
7	Mão	Verrugas de Butcher
5,8,9,12,14,15,17, 19-29,36-38	Testa, braços e tronco	Verrugas e câncer de pele em pacientes com comprometimento imunológico e epidermodisplasia verruciforme
19-29,36-38		
6,11	Urogenital, anal ororrespiratório	Condilomas acuminados
16,18,30,31,33,35, 39,41-45,51-59,61	Urogenital, anal e ororrespiratório	Displasia e câncer invasivo
62,64,68		
13,32	Cavidade bucal	Hiperplasia
30,40	Laringe	Câncer

Fonte: (Carvalho *et al.*, 2000)

Os subtipos de HPVs de baixo risco são os 6, 11, 42, 43 e 44, e o subtipo de médio e alto risco são os 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58,59 e 68.

2.6 - Métodos de Detecção do HPV

A infecção do HPV se desenvolve de modo silencioso. Um estudo do National Institute of Allergy and Infected Diseases (NIAD), nos Estados Unidos, demonstrou que cerca de metade das pessoas infectadas não apresentam nenhum sintoma e, por isso, não procuram tratamento e continuam espalhando o vírus por meio dos contatos sexuais (Viana & Martins, 1998).

A única forma visível deste vírus são as verrugas que aparecem nas regiões genitais dos homens e mulheres, no entanto, como o vírus pode se manifestar de três formas: clínica, subclínica e latente, somente os tipos mais suaves de HPV desenvolvem sintomas, sendo que, aqueles que atuam de maneira mais secreta, são os que podem produzir problemas mais sérios (Oliveira, 1994).

2.6.1 - Papanicolau, colposcopia e peniscopia

O método mais simples de detecção de infecção genital por HPV é a observação das verrugas genitais a olho nu. Entretanto, estima-se que apenas 5% das pessoas infectadas apresentam condilomas típicos, outros 10% das pessoas infectadas somente são identificadas através de exame clínico, utilizando uma técnica que expõe lesões de cor aceto-branco. Essa técnica consiste em cobrir com gaze saturada com uma solução de 5% de ácido acético a área genital durante 3 a 5 minutos, e depois examinar a área sob magnificação, no caso o colposcópico, com aumento de 9 a 16x. Esse exame, no caso das mulheres é feito por um ginecologista e é o chamado colposcopia. No caso dos homens é feito por um urologista e é chamado peniscopia, devendo ser realizado normalmente após resultado de exame papanicolau da parceira sexual com indicativo de virose inespecífica (Silverberg, 1997; Pires & Gouvêa 2001; Carvalho *et al.*, 2000).

A aplicação de ácido acético resulta num nítido contraste entre o tecido normal e o tecido anormal; o tecido anormal toma uma tonalidade esbranquiçada, bem demarcada. As verrugas planas de cor branco-acético compõem mais de um terço dos casos de infecções penianas detectáveis por HPV, as quais, ao contrário dos condilomatos facilmente visíveis, contém tipos de HPV de alto risco. Essa simples técnica de consultório pode detectar lesões invisíveis que abrigam tipos oncogênicos de HPV (Silverberg, 1997; Pires & Gouvêa, 2001).

Após a colposcopia, comprovada a presença do HPV, deve-se partir para outras técnicas de detecção onde será determinado o tipo de HPV infectante. Considera-se que a coilocitose⁹ observada no exame histológico dessas lesões é patognomônica¹⁰ da infecção por vírus HPV. Os coilócitos estão presentes nas infecções por HPV onde as partículas virais se encontram em processo de agrupamento, e normalmente encontram-se em lesões clinicamente aparente (Silverberg, 1997).

O azul de toluidina, é um corante vital que se fixa em regiões ricas em DNA, também pode ser utilizado com o objetivo de aumentar a sensibilidade do método. As lesões típicas ou suspeitas devem ser biopsiadas e submetidas a exame microscópico. Podem ser empregadas técnicas de biologia molecular que aumentam a especificidade do diagnóstico e permitem tipagem do HPV (Carvalho *et al.*, 2000).

2.6.2 - Técnica de Imunohistoquímica

A imunohistoquímica pode detectar o revestimento protéico das partículas virais que se encontram nessas lesões, ao contrário das displasias de alto grau e os carcinomas invasivos que precisam de coilócitos. O DNA de HPV pode estar presente nessas lesões, mas a atividade de transcriptase talvez não resulte na produção de vírions, que são detectáveis através de microscopia de luz ou imunohistoquímica (Carvalho *et al.*, 2000).

O método ideal de detecção do HPV deve se basear na presença de DNA de HPV, já que o vírus não precisa estar intacto para induzir a doença. A detecção molecular inicial de DNA de HPV foi efetuada através do uso de técnicas de hibridização de ácido nucléico, como a hibridização Southern (ou blotting). Esse foi o método original de primeira escolha para a detecção de DNA de HPV, devido à seu elevado grau de especificidade e sensibilidade. Esse método permite uma diferenciação precisa dos diferentes tipos de HPV (Helberg , 1994).

⁹ Alteração celular causada por vírus. A coilocitose observada na infecção por HPV indicativa de infecção ativa, apresenta-se como grandes cavidades que tomam quase totalmente o citoplasma da célula afetada. O coilócito verdadeiro tem três características: atipia nuclear, extenso halo peri-nuclear e espessamento das bordas deste vacúolo.

¹⁰ Sinal característico específico para determinada doença.

2.6.3 - Técnica Southern blotting

A técnica “Southern blotting” é a mais sensível e específica, considerada o “padrão ouro”. Em experimentos científicos, fragmentos celulares individuais são gerados por uma técnica de restrição através de digestão enzimática, separados em gel por eletroforese e transferidos a um filtro inerte. De acordo com os tamanhos dos fragmentos, tipos específicos de HPV são reconhecidos após hibridização com sonda radioativa ou biotinizada. Nesta técnica, o DNA total é imobilizado em um suporte inerte por aplicação direta. Pode-se quantificar o DNA acuradamente e múltiplas amostras podem ser examinadas usando-se dispositivo de múltipla filtragem. A principal desvantagem é que se analisa o DNA total, e não fragmentos digeridos por restrição por endonucleases – não há como distinguir hibridizações cruzadas com outros ácidos nucléicos presentes na amostra (Helberg, 1994).

2.6.4 - Técnica de Hibridização “in situ”

Através de uma técnica modificada, conhecida como hibridização in situ, é possível se identificar DNA de HPV nas células, com a garantia de que o HPV detectado não é um contaminante extracelular que se encontra na superfície epitelial. É uma técnica executada em fragmentos de tecidos, e permite um alto grau de localização espacial, nesse método sondas virais são acopladas a biotina ou digoxigenina em vez de um radioisótopo como fósforo radioativo. A molécula de biotina é então detectada por uma série de reações citoquímicas que resultam na ligação de um complexo enzimático (avidina-peroxidase). A enzima pode ser visualizada devido a sua habilidade em converter um substrato incolor em um pigmento insolúvel marrom no sítio da formação do híbrido. É realizada em material já biopsiado em bloco de parafina e detecta a presença de vírus na lesão retirada, sendo utilizado, portanto como método de escolha para confirmação da histologia. Entretanto, a sensibilidade do exame é sacrificada com essa técnica porque o DNA do vírus está presente apenas em pequenas quantidades em cada célula, ao invés de encontrar-se isolado e concentrado como no caso do Southern blotting (Helberg, 1994).

2.6.5 - Técnica de Captura híbrida

Captura híbrida é uma técnica que detecta uma seqüência viral em meio a até dez células, podendo ser utilizada para identificar a presença de um vírus na lesão, ou, caso a lesão já tenha sido extirpada, verificar se persistem vírus na mucosa (Pires & Gouvêa, 2001).

O sistema de captura híbrida é um teste que usa como sonda ou explorador seqüências de RNA que são hibridizáveis com alvos DNA provenientes da desnaturação (separação das duas cadeias) do DNA viral. Todo o genoma do vírus é alvo rotineiro de escolha, e exploradores RNA de cadeia única são utilizados para hibridizar eficazmente todos os 8.000 nucleotídeos do genoma HPV-DNA. A sensibilidade do teste deriva de vários fatores. Os híbridos RNA-DNA são mais estáveis do que os híbridos DNA-DNA, e o uso de exploradores RNA de cadeia única evita reações colaterais indesejáveis, como reanelamento (Pires & Gouvêa, 2001).

Fonte adicional de sensibilidade é o uso de anticorpos RNA-DNA, que são conjugados com múltiplas moléculas de fosfatase alcalina. Este conjugados reconhecem porções curtas do híbrido RNA-DNA de maneira específica e independente de seqüência, de modo que milhares de conjugados podem revestir um único híbrido RNA-DNA. Cada enzima fosfatase alcalina imobilizada reage com numerosas moléculas do substrato dioxetano quimioluminescente por minuto, produzindo um fluxo estável de fótons que são contados em um tubo fotomultiplicador de um luminômetro (Carvalho *et al.*, 2000).

A intensidade de luz emitida é proporcional à quantidade de DNA-alvo no espécime, e geralmente é expressa como uma proporção do sinal em relação ao controle positivo (Helberg., 1994).

2.6.6 - Técnica Reação em Cadeia de Polimerase

Polimerase Chaining Reaction (PCR) é a aplicação da mais recente técnica biológica molecular com diagnóstico de precisão para o HPV. Com essa técnica, segmentos de DNA podem ser amplificados até um milhão de vezes em questão de horas, transformando minúsculas quantidades de DNA de HPV em quantidades que podem ser facilmente detectáveis. Além da sua maior simplicidade em comparação ao

“Southern blotting”, a PCR tem o benefício de uma sensibilidade sem paralelo na detecção do HPV com quase a mesma especificidade. É uma técnica desenhada para detectar um único tipo específico de HPV ou até 25 tipos diferentes em uma reação, o que pode acelerar em muito as buscas de HPV (Helberg , 1994).

3.0 - Relação Existente entre o HPV e as doenças

Com base nos postulados de Koch¹¹, há relação etiológica entre um agente infeccioso e uma doença específica quando certos critérios são preenchidos e o HPV não é capaz de satisfazer todos os postulados de Koch porque não pode se multiplicar em cultura. A maior parte das evidências de que o HPV é um agente etiológico do câncer humano envolve a detecção de HPV em tumores. Outras evidências que sustentam a idéia da oncogenicidade do HPV provém de experimentos moleculares e celulares que mostram as capacidades de transformação do vírus (Pires & Gouvêa, 2001).

Estudos de transformação demonstraram que a inserção de um genoma completo de HPV-16 induzia transformação maligna em fibroblastos de roedores. Dessa mesma forma, a transfecção de DNA de HPV 16 ou 18, em células epiteliais humanos do colo uterino e em ceratinócitos de prepúcio neonatal, conferiu imortalização, o contrário não ocorreu com o DNA de HPV 6 de baixo risco (Murray *et al.*, 1994).

A transfecção de DNA de HPV em enxertos teciduais humanos transformou de forma confiável alguns tecidos (colo uterino, 100%; prepúcio, 100%; cordas vocais, 88%; uretra, 73%), mas outros tecidos não foram tão sensíveis ao HPV (esôfago, 37%; bexiga, 0%; pele abdominal, 0%) (Carvalho *et al.*, 2000).

ORFs, molduras abertas de leitura, E6 e E7 foram necessárias para a transformação de células humanas, mas apenas quando colhidas de HPVs de tipo 16 e 18; E6 e E7 de HPV 6 e 11 foram pouco ou nada transformadores (Silverberg, 1997).

Os tipos de HPV 6 e 11 são encontrados em condilomas benignos. Essas lesões são normalmente autolimitantes, exceto nos raros casos de conversão para tumores malignos (carcinomas verrucosos). HPV 16, 18 e 31 são freqüentemente encontrados em neoplasias intra-epiteliais cervicais e cânceres invasivos¹². Entre estes, o tipo 18

¹¹ Bacteriologista alemão Roberto Koch – estudo dos bacilos da tuberculose (bacilos de Koch 1843-1910).

¹² Fase em que o câncer invade outras camadas celulares do órgão e ganha a capacidade de se disseminar para outras parte do corpo.

parece ser o que mais se relaciona as lesões de alto grau e está associado a uma maior rapidez de transição ao carcinoma (Howard *et al.*, 1990; Halbe, 2000).

3.1 - HPV e o câncer de colo uterino

O diagnóstico das formas clínicas de infecção pelo HPV é simples. Os condilomas acuminados (o termo *kondylos* deriva do grego e quer dizer excrescência carnosa, tumor) dos órgãos genitais externos são bem conhecidos e transmitidos sexualmente (Pires & Gouvêa, 2001).

O aspecto macroscópico dos condilomas é de neoformações sésseis, papilares, múltiplas, cobertas por epitélio queratótico. Localizam-se nas área úmidas, particularmente naquelas expostas ao atrito durante o coito (Carvalho *et al.*, 2000).

O condiloma acuminado é mais freqüentemente encontrado na forma de excrescência papilar única ou múltipla. Algumas variedades tem longas projeções digiformes com alças capilares. Clínica e colposcopicamente se assemelham àquelas do câncer invasivo, exceto pelo seu tamanho e distribuição regular (Muto, 1998).

Após aplicação de ácido acético, a maioria das verrugas embranquece, e seus vasos tornam-se menos proeminentes. O teste de Schiller é particularmente útil na diferenciação de verrugas acuminadas e câncer (Carvalho *et al.*, 2000).

A atração da solução de lugol pelas verrugas acuminadas é muitas vezes parcial e focal, enquanto o câncer exofítico¹³ é uniformemente iodo-negativo. As verrugas exofíticas podem crescer em qualquer lugar do epitélio maduro da zona de transformação ou na junção escamocolunar (JEC). Além disso podem coexistir com lesões planas dentro da zona de transformação ou mesmo crescer dentro delas. Verrugas acuminadas estão invariavelmente associadas a infecção por HPV 6 e 11 (Carvalho *et al.*, 2000).

¹³ Câncer que se projeta para fora.

A infecção subclínica é a forma mais freqüente de infecção pelo HPV no colo uterino e diagnosticada apenas com o uso do colposcópico após aplicação de ácido acético a 5%. No trato genital inferior pode estar associada à neoplasia intra-epitelial, e histologicamente podem ser encontradas em presença de neoplasia intra-epitelial com evidências de infecção por HPV superpostas e presença contemporânea, em áreas separadas mas contíguas, de neoplasia intra-epitelial cervical (NIC) e de infecção pelo HPV (Silverberg, 1997).

A mulher pode se infectar com os tipos de HPV de baixo risco, esses tipos muitas vezes são remissivos, podendo desaparecer espontaneamente após alguns meses. Outro destino, apesar de raro, é a transformação direta para neoplasia sem passar pela fase produtiva ou latente. Os organismos que desenvolvem infecção recidivante que não melhoram espontaneamente podem ter doença persistente por longo período ou, no caso dos infectados pelos grupos de alto risco, progressão para NIC (neoplasia intra-epitelial escamosa) de alto grau e câncer.

Quando uma lesão progride de baixo para alto grau, ocorre alteração na relação infecção-hospedeiro, e o vírus da forma episomal (circular) passa para linear e se incorpora ao DNA da célula epitelial. Nesse processo estão envolvidas as proteínas E1 e E2 ORF, que se separam, permitindo o aumento das proteínas E6 e E7, levando à transformação neoplásica (inibindo o antioncogene p53) mantendo o vírus em seu estado linear incorporado (Silverberg, 1997).

Enquanto ocorrem essas mudanças em nível molecular, no nível morfológico também há alterações. A principal delas, e que parece ser marcador altamente preditivo de transformação neoplásica, é a aneuploidia, geralmente acompanhada de aumento na atividade mitótica das células (Murray *et al.*, 1994).

Resumindo, o HPV parece ser a causa central do câncer cervical. Fatores hormonais parecem interagir com o HPV na progressão de infecção autocontrolada para neoplásica. O que parece ser relevante, e tem sido investigado com muito cuidado são fatores como idade precoce e talvez alguma outra circunstância na época da gravidez ou uso de contraceptivo oral. Já a imunossupressão constitui fator de risco super importante muitas vezes isoladamente (Carvalho *et al.*, 2000).

Quanto mais precoce a exposição ao HPV, maior o risco de desenvolver lesão. Também a ordem em que a infecção ocorre pode ser importante. Assim, HPV de baixo risco poderia conferir imunidade para infecções subsequentes por HPV de alto risco.

O tipo, carga viral e a detecção persistente do HPV são compreendidos como marcadores importantes para o risco de progressão para câncer invasivo. Lesões por HPV 16 possuem risco significativamente aumentado para progressão quando comparadas com infecções por HPV de baixo risco, 6 e 11. Quando a doença precursora de alto grau (NIC II/III) ocorre com HPV de alto risco, isso acontece em curto período de tempo (dentro de um ou dois anos). A taxa de regressão em pacientes com esfregaços repetidamente anormais é menos comum (Carvalho *et al.*, 2000; Viana & Martins, 1998).

3.2 - HPV e o câncer de pênis

As lesões causadas pelo HPV, no homem, podem afetar o trato geniturinário desde a genitália externa até o trato urinário superior e a região perianal. Entretanto, concentra-se mais freqüentemente no pênis. Geralmente sua localização é no prepúcio interno, corpo, glândula e escroto (Carvalho *et al.*, 2000; Pires & Gouvêa).

A uretra é um reservatório natural para o HPV. A infecção uretral ocorre mais freqüentemente nos 2 cm distais, incluindo a fossa navicular. Pode apresentar-se clinicamente como mácula ou verruga que se exterioriza pelo meato. Estudos de citologia uretral e biologia molecular em homens cujas parceiras apresentam NIC ou infecção pelo HPV revelam prevalência de 9% a 21% (Carvalho *et al.*, 2000)

Vários estudos apontam uma associação de câncer de pênis com o HPV, em especial o tipo 16, em 30% a 50% dos casos. O câncer de pênis é uma neoplasia rara em nações desenvolvidas, correspondendo a cerca de 0,4% dos tumores do homem em países da Europa e da América do Norte. Nos países em desenvolvimento, essa incidência chega ao surpreendente índice de 12% (Uganda). No Brasil, as cifras estimadas variam de 1% a 4% nas regiões Sul e Sudeste e de 5% a 16% no Norte e Nordeste (Carvalho *et al.*, 2000).

3.3 - HPV e o câncer de pele

Os HPVs podem desativar as defesas naturais contra certos tipos de câncer de pele causados por radiação ultravioleta (UV) (Carvalho *et al.*, 2000; Pires & Gouvêa).

Recentemente, Alan Storey e sua equipe, do Laboratório de Tumor de Pele do Fundo Imperial de Pesquisa de Câncer, em Londres, Reino Unido, descobriram que o HPV age para prevenir a apoptose, que é um mecanismo de morte celular programada.

Um tipo de suicídio celular usado pelas células quando estas ficam sem reparo (Pires & Gouvêa, 2001).

Uma proteína conhecida como Bak normalmente atua como um alarme no mecanismo protetor de células normais. Quando uma célula da pele fica muito danificada para continuar trabalhando adequadamente, geralmente devido à radiação UVB, a proteína Bak alerta a célula enviando comandos para prosseguir com a morte celular programada – apoptose. Matando a si mesma, a célula previne quaisquer alterações danosas futuras que, depois, podem fazer com que ela se torne cancerosa (Carvalho *et al.*, 2000; Pires & Gouvêa).

Uma proteína produzida pelo HPV causa destruição da proteína Bak em células da pele, fazendo com que não consigam morrer para evitar que se tornem um câncer. Este mecanismo acaba por explicar como o HPV promove sua própria sobrevivência em células infectadas (Carvalho *et al.*, 2000; Pires & Gouvêa).

Em pacientes transplantados de órgãos cujo sistema imunológico está comprometido e estão sob alto risco de desenvolver um tipo de câncer chamado de carcinoma de células escamosas (SCC), o HPV está presente em mais 80% dos casos (Pires & Gouvêa, 2001).

3.4 - Papiloma escamoso de esôfago

A presença de múltiplos papilomas encontrados principalmente em esôfago proximal, falam a favor de infecção pelo HPV, enquanto que lesões isoladas, encontradas classicamente em esôfago distal, tendem a ter relação com a presença de refluxo gastro-esofágico (Lombardi *et al.*, 1980; Quintadamo & Benson, 1988).

O papiloma de células escamosas do esôfago, normalmente é um achado incidental, tendo em vista que a evolução clínica ser quase sempre silenciosa (Quintadamo & Benson, 1988).

No quadro clínico pode existir sintomas inespecíficos, como dor epigástrica e distúrbios gastrointestinais ácido pépticos como presença de refluxo gastro-esofágico e doença ulcerosa (Lombardi *et al.*, 1980; Quintadamo & Benson, 1988).

Entretanto, todos estes, apesar de apresentar correlação com a patogenia do papiloma, quando controlados ou tratados não trazem nenhum benefício quanto a regressão histológica do papiloma. O curso clínico dos papilomas esofágicos associados

ao HPV, tende a ser mais agressivo que o papiloma que está relacionado ao refluxo gastro-esofágico (Politoske, 1992).

Alguns autores afirmam que os papilomas são muitas vezes passíveis de se desenvolverem em vista da ingestão de agentes carcinogênicos, toxinas de meio ambiente, e irritantes químicos para a mucosa do esôfago (Duranceau, 1988; Nakamura *et al.*, 1974).

O desenvolvimento de lesões malignas é um fenômeno multifatorial, que além de contar com a presença do papilomavírus tem se relacionado ainda com uma interação complexa de carcinógenos (álcool, fumo, nitrosaminas e aflatoxinas) todos estes agindo em conjunto. Uma nova visão dos possíveis mecanismos de transformação maligna, induzida pelo HPV, tem advogado o fato de existir gens relacionados ao HPV, por exemplo E6 e E7 capazes de realizar essa transformação através de uma interação com alguns gens que tem função de suprimir o desenvolvimento tumoral, como a proteína p53 e o gen Rb. A perda deste equilíbrio funcional de supressão, leva a uma incontável proliferação celular de células infectadas, induzindo ativamente a uma formação neoplásica, quando associada aos fatores carcinogênicos já previamente aumentados (Toet *et al.*, 1985).

3.5 - Mecanismos de interação HPV X HIV

Células Cultivadas em laboratórios comprovaram que a contaminação pelo vírus HPV pode acelerar a progressão ou até mesmo facilitar a infecção por HIV (Pires & Gouvêa, 2001; Carvalho *et al.*, 2000).

Células infectadas com HPV liberam fatores de crescimento e proteínas estimuladoras do sistema imunológico que tenham a capacidade de despertar novamente a infecção com HIV latente nas células do sistema imunológico (Pires & Gouvêa, 2001; Carvalho *et al.*, 2000).

Em resposta aos fatores de crescimento induzidos pelo HPV, as células infectadas pelo HIV começam a produzir novas cópias do vírus (Pires & Gouvêa, 2001; 2001; Carvalho *et al.*, 2000).

Como a infecção genital pelo papilomavírus é uma doença de transmissão sexual (DST), interage de alguma maneira com as demais afecções que apresentam a mesma via de transmissão. Tal interação ocorre na forma clínica condilomatosa da infecção pelo

HPV, ou ainda na forma subclínica em que as lesões são identificadas pela colposcopia (Pires & Gouvêa, 2001; Carvalho *et al.*, 2000).

A presença de infecções associadas, por exemplo, a candidíase, não apenas dificulta o diagnóstico do HPV por propiciar lesões falso-acetobranças, como interfere no tratamento. As infecções genitais associadas devem sempre ser tratadas previamente ao HPV. Entre os pontos de inter-relação, a oncogênese é o tema mais pesquisado. Neste ponto, algumas infecções podem funcionar como coadjuvante no papel oncogênico do HPV, sobressaindo-se a inter-relação HPV-HIV. Contata-se maior prevalência dos HPVs oncogênicos entre pacientes que apresentam alguma DST associada (Pires & Gouvêa, 2001).

Os condilomas acuminados e as formas subclínicas de infecção pelo HPV estão entre as doenças anogenitais mais comuns em pacientes HIV positivo. Tem transmissão sexual e são causados pelos HPVs tipo 6, 11, 16, 18, 31, 33 e 35 (Carvalho *et al.*, 2000).

O HIV causa alteração da imunidade celular, representando um importante fator de risco para a infecção pelo HPV e para o desenvolvimento de lesões da região anogenital, além de modificar a história natural da infecção por HPV preexistente (Carvalho *et al.*, 2000).

Essas lesões são mais agressivas e difíceis de erradicar em pacientes HIV positivo, embora os tipos de HPV sejam os mesmos da população soronegativa. Apresentam no entanto, evolução mais rápida, tanto nas suas formas exofíticas como nas alterações precursoras de câncer do trato genital inferior (neoplasias intra-epiteliais cervical, vulvar, vaginal, peniana, perianal e anal), sendo as lesões vulvares e perianais as mais comuns em indivíduos infectados pelo HIV (Pires & Gouvêa, 2001; 2001; Carvalho *et al.*, 2000).

Riscos de indivíduos com HIV desenvolver câncer do colo uterino encontra relação direta com o grau de imunodeficiência causada pelo HIV no momento da infecção pelo HPV. Já está comprovado que as lesões intra-epiteliais não estão diretamente associadas ao HIV por si só, mas ao grau de imunossupressão que ele desencadeia (Pires & Gouvêa, 2001).

A contagem de células CD4 também influencia a associação entre as duas viroses, visto que doentes com valores inferiores a 200/mm apresentam maior incidência de infecção pelo HPV (Carvalho *et al.*, 2000).

4.0- Dos Avanços da Ciência

No Brasil, o Instituto Ludwing de Pesquisas sobre o câncer, em São Paulo, vem investindo desde 1999 em produtos profiláticos contra os males causados pelo HPV, no caso uma vacina que já foi testada em bovinos, mas que só estará apta a ser experimentada em humanos por volta de 2002. O Ministério da Saúde, através do Instituto Nacional do Câncer, desde 1998 lançou campanha para que métodos de detecção de HPV fossem incorporados à rotina médica de consultas ginecológicas e urológicas. Pesquisadores dos Estados Unidos, Alemanha e Austrália também vem estudando vacinas, que também já foram testadas em cães e bovinos, mas o objetivo maior de todos é desenvolver uma vacina que seja eficaz, principalmente, contra o HPV-16, que acaba sendo o responsável por mais de 50% dos casos de câncer de colo uterino, no mundo (Muto,1998).

Apesar do diagnóstico do condiloma acuminado ser freqüentemente óbvio, a escolha do melhor tratamento pode ser difícil. Deverá sempre ser analisada a extensão e duração da virose, antes que se inicie qualquer tratamento. Já existe no mercado, aprovado pela Food and Drug Administration (administração e abastecimento/fornecimento de drogas) – FDA, agência que regula a comercialização de remédios nos EUA, o medicamento interferon alfa-3 intralesão, para tratamento de verrugas genitais extensas e recorrentes. Como não há ainda disponibilidade de vacinas ou agentes antimicrobianos eficazes contra o HPV, o alfa interferon natural, que é uma substância de múltiplas espécies, derivada de leucócitos humanos tem sido o tratamento disponível mais utilizado (Carvalho *et al.*, 2000)

O interferon é uma substância natural que desempenha um papel no mecanismo de defesa imunológica, em resposta a infecções viróticas. O interferon alfa natural age ligando-se a receptores na membrana celular específicos para ele e altera o metabolismo celular, pois enquanto ligado à membrana celular possui atividade antivirótica, antiproliferativa, antitumoral e imunomodulatória, sem contudo, saber-se qual é exatamente o mecanismo envolvido na erradicação de verrugas genitais. O que existe é a hipótese, de que as injeções de interferon ajudam a direcionar a droga para o vírus alvo e a estimular resposta no hospedeiro (Carvalho *et al.*, 2000, Murray *et al.*, 1994).

Portadores de HPV com uma única ou várias verrugas genitais freqüentemente são fáceis de tratar com aplicações repetidas semanalmente de podofilina, ácido

bicloracético, ácido tricloracético ou crioterapia com nitrogênio líquido. Pacientes com quadro recorrente ou com envolvimento mais extensivo podem precisar de terapias de segunda linha, entre as quais se encontram a cirurgia excisional, a cirurgia a laser CO₂¹⁴ e a administração de alfa interferon (Carvalho *et al.*, 2000, Murray *et al.*, 1994).

Um workshop organizado pela Internacional Agency for Research on Cancer – (IARC) - (Agência Internacional para Pesquisa do Câncer) e a Fundação Marcel Mérieux, em Veyrier du Lac, perto de Annecy (França), em dezembro de 1994, reuniu 40 cientistas de 9 países diferentes, que decidiram, em vista dos números alarmante de doenças relacionadas ao HPV, a IARC dedicaria grandes esforços à pesquisa dos agentes causadores, implementando estudos epidemiológicos de papilomavírus humano e câncer de colo uterino em 24 países. Os resultados apresentados nessa reunião enfatizaram os trabalhos experimentais com as vacinas contra o papilomavírus humano conduzido em bois, cães e coelhos, os quais mostraram que as vacinas profiláticas (para a prevenção da infecção por HPV) e terapêuticas (para regressão de lesões induzidas pelo vírus) são eficazes no combate contra tumores associados ao papilomavírus presente nesses animais, e é este incentivo da IARC que tem estimulado no desenvolvimento de vacinas similares para uso humano (Carvalho *et al.*, 2000, Murray *et al.*, 1994).

Apesar de saber que o desenvolvimento de vacinas profiláticas seguras e eficazes ainda precisa de avanços em várias áreas da pesquisa sobre o HPV, estima-se que em 3 a 4 anos a vacina estará disponível comercialmente e a imunização em massa dentro de no máximo 10 anos (Carvalho *et al.*, 2000, Murray *et al.*, 1994).

¹⁴ Os mais empregados em Medicina são os de anidrido carbônico (CO₂), neodímio YAG e o argônio. Seu comprimento de onda é de 10,6 micra, sendo altamente absorvido por tecidos ricos em água.

5.0- Bibliografia

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RASS, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D.
Biologia Molecular da Célula. 1997. 3ª edição. 1997. Porto Alegre. Editora
ARTMED
- AMABIS, M. J., MARTHO, R.G., MIZUGUCHI, Y., *Biologia*. 1ª edição. São Paulo.
1974. Editora Moderna Ltda
- BERNARD H. U., *Evolução do Papiloma Vírus*. Berlin. 1994. Editora Springer-Verlag
- BURNETT, G.W. *Microbiologia Oral e Doenças Infecciosas*. 1978. Rio de Janeiro.
Editora Guanabara Koogan
- COUCEIRO, J.N.S.S. Departamento de Virologia, Instituto de Microbiologia Prof.
Paulo Góes, UFRJ. URL <http://www.virusonline.virtuallave.net>
- CARVALHO, J. J. M. et al. Coordenador - *1º Consenso Brasileiro de HPV*. 1ª edição.
2000. São Paulo. Editora BG Cultural
- COORDENAÇÃO NACIONAL DE DST/AIDS 1999 – *Manual de Controle das DST*
3ª edição.
- DURACEAU A.; *Epidemiologia Trends and Etiologia Factors of Esophageal*
Carcinoma. In: Delame N, Wilkins E, Wong I, Editora International Trends in
General Thoracic Surgery. St. Louis: Mosby. 1988.
- FALKE, D. *Virologia*. 1979. 2ª edição. São Paulo. Editora Springer Ltda.
- HALBE, H.W. 2000. *Tratado de Ginecologia*. 3ª edição, volumes 1 e 2. Editora Roca.
São Paulo

- HELBERG et al. *Positive Cervical Smear With Subsequent Normal Colposcopy and Histology – frequency*
- HOWARD, J. W.; Wentz, AC.; BURNETT, L.S. 1990. Novask,
Tratado de Ginecologia. Ed. Guanabara. Rio de Janeiro
- LEVINSON, Warren; JAWETZ, Ernest et al. *Microbiologia Médica e Imunologia*.
1998. 4ª edição. Porto Alegre. Editora ARTMED
- LOMBARD J.; TANG D.; MYHRE O.; *Squamous Cell Papiloma of the Esophagus: Case Report and Review of the Literature*. J. Int. Surg. 1980
- LORINCZ A.T.; HILDESHEIM A.; HERRERO R. et al *Human Papilomavírus Infection of the Cervix: Relative Risk Associations of 15 Common Anogenital Types*. Obstet Ginecol. 1992.
- MEISEL A, FORTIN R, ROY M.; *Condilomatous Lesions of the Cervix. II Cytologic, Colposcopic and Histopatologic Study*. Acta Cytol 1981.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL K. S.; KOBAYASHI, G. S; PFALLER, M..A.
Microbiologia Médica. 3ª edição. Rio de Janeiro. 1994. Editora Guanabara koogan
- MUTO, E.; *Revista de Divulgação Científica da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência*. Vol. 23. N. 137 ABR/1998. Editora SBPC
- NAKAMURA T.; MATSUYAMA M.; KISHIMOTO H.; *Tumors of the Esophagus and Duodenum Induced in Mice by Oral Administration of N-ethy/-N-nitro-N-nitrosoguanidine*. I Natl Cancer Inst. 1974
- NETO, J. B. L.; URL <http://pro.celula.com.br/atlas/malignidade>. 1999
- OLIVEIRA, Ledy do H. Santos. *Virologia Humana*. 1ª edição. Editora Cultura Médica. 1994. Rio de Janeiro

- ORIEL, J.D. *Natural History of Genital Warts*. Br J Vener Dis. 1971.
- PIRES, AR. & GOUVÊA, AL.F. 2001. *O Papiloma Vírus Humano* (HPV) URL <http://www.anticorpos.com.br>
- POLITOSKE E. J.; *Squamous Cell Papiloma of the Esophagus: Associated With the Human Papilomavírus*. Gastroenterology. 1992
- QUINTADAMO M.; BENSON J.; *Squamous Cell Papiloma of the Esophagus: Case Report and Review of the Literature*. Am J Gastroenterol. 1998
- SOARES, J. L., *Dicionário Etimológico e Circunstanciado de Biologia*. 1993. Editora Scipione
- SILVERBERG, L. F., 1997. *Principles and Practice of Surgical Pathology and Cytopathology*. 3ª edição. Churchill Livingstone.
- TOET A.; DEKKERW, W.; BLOK, P. *Squamous Cell Papiloma of the Esophagus: Report of four cases*. Gastro Intest Endosc. 1985
- VIANA, L. C.; GEBER. S. ; MARTINS, M. 1998. *Ginecologia*. Editora Médica e Científica Ltda. Rio de Janeiro
- VILLIERS D., *Tipos de Papiloma Vírus em Patologia Humana: Uma Reciclagem e Atualização*. Berlin. 1994. Editora Springer-Verlag