

DETECÇÃO DE HPV POR PCR EM LESÕES DA CAVIDADE BUCAL — ATUALIZAÇÃO

PCR HPV DETECTION IN ORAL CAVITY LESIONS - ATUALIZATION

Pedro Alves Campos¹, Anilton Cesar Vasconcelos², Almir Sousa Martins³

Resumo: O câncer bucal representa um problema de saúde de abrangência mundial. Muitos trabalhos têm relacionado os HPVs com a incidência do câncer bucal. Os principais tipos de HPV considerados cancerígenos têm sido os HPVs 16 e 18. Os HPVs são vírus epiteliotróficos, nem todos de alto risco, mas freqüentes na mucosa bucal. Numa revisão da literatura, é apresentado o estado da arte sobre a incidência de HPV na cavidade bucal, seus tipos e presumível relação com os carcinomas da boca.

Descritores: HPV, carcinoma da boca, PCR

INTRODUÇÃO

O câncer bucal representa um problema significativo de saúde com abrangência mundial. Sua incidência corresponde a até 5% de todos os tipos de cânceres, resultando em milhares de mortes. Além da sua alta taxa de mortalidade, o câncer bucal deixa, freqüentemente, deformações bucais e maxilofaciais resultantes de tratamentos de radiação e cirurgias invasivas. Conseqüentemente, o câncer bucal gera impactos psicológicos e físicos devastadores no paciente.¹

De particular importância no desenvolvimento do câncer bucal estão os carcinógenos químicos relacionados ao tabagismo e a infecção por papilomavírus humano (HPV). Entre os vários fatores carcinogênicos, o HPV tem atraído muita atenção devido: 1) ser freqüentemente encontrado em espécimes de câncer bucal e 2) o HPV é considerado como o mais importante agente causador do câncer cervical humano.² Da mesma maneira que o câncer genital, os HPVs considerados de alto risco estão também associados a lesões tan-

to benignas como malignas da cavidade bucal, detectados em papiloma de células escamosas, condilomas, hiperplasias epiteliais focais e lesões malignas da boca.^{3,4} Entretanto, uma correlação significativa de HPVs como agentes etiológicos indutores de instabilidade genética nestas lesões e o desenvolvimento de carcinomas bucais ainda não está determinada, bem como os mecanismos moleculares envolvidos não estão esclarecidos. Estudos nesta direção são necessários e dependem do aprimoramento de ferramentas moleculares para diagnóstico e caracterização destes vírus.

REVISÃO DE LITERATURA

Campos⁵ visou desenvolver protocolos de PCR convencionais e em tempo real para a detecção e caracterização de HPVs considerados como os mais importantes na possível etiologia das lesões cancerígenas da boca. O autor procurou selecionar seqüências genômicas alvos para PCR, levando em consideração as regiões de maior homologia em cada grupo específico de HPV.

¹ Professor Titular de Patologia da PUC Minas

² Professor Adjunto Doutor de Patologia da UFMG

³ Professor Adjunto Doutor de Fisiologia da UFMG

Foram analisadas as regiões codificadoras para as proteínas E6 e E7, por serem oncogênicas⁶ e as regiões L1 e L2 de importância imunológica, por codificarem as proteínas do capsídeo.^{7,8} Foram escolhidas as seqüências genômicas dos papilomavírus de alto risco 16 e 31 do grupo A, 18 e 45 do grupo C, 30 e 56 do grupo D. Também foram consideradas as seqüências genômicas dos HPVs de médio risco 33, 35 e 58 (grupo A), 66 (grupo D) e de baixo risco 6B, 11, 44 e 55 (grupo B) e 59 (grupo C). Os resultados do alinhamento das seqüências no programa PC/Gene determinaram a escolha dos oligonucleotídeos iniciadores que foram utilizados no trabalho. Desta ampla análise, várias opções de primers e seus respectivos amplicons foram identificadas para uso diagnóstico de um ou mais tipos de HPVs. Como estratégia, foram selecionados fragmentos alvos entre 200 pb a 422 pb, segundo a sugestão de Yap & McGee⁹, para rápida detecção e otimização das quantidades de produto da PCR, o que depende diretamente do tamanho de cada amplicon. O fato das seqüências alvos selecionadas apresentarem concentrações de GC entre 33% a 47% foi importante para facilitar a amplificação por PCR. Embora alguns autores não recomendem o uso de inosina como base neutra em primers para PCR, outros recomendam o procedimento^{10,11}. Um par de primers para amplificação de quatro seqüências alvos de HPV16, HPV31, HPV35 e HPV35H, permitiu que esses primers selecionados fossem capazes de detectar os quatro tipos de vírus de alto e médio risco do grupo A, pela simples substituição de uma base em cada primer por inosina.

Analisando as regiões escolhidas como alvo para PCR convencional, utilizando o programa PCGENE, Campos⁵ detectou a presença de inúmeras possibilidades de formação de estruturas

secundárias, relativamente pequenas, de 6-10 pb como alças tipo “cabeça-de-alfinete” (hair-pin-loops). Estas seqüências repetidas invertidas que possuem menor energia livre são as de menor estabilidade e com maior probabilidade de formação de estruturas secundárias. Tais estruturas podem se tornar problema de difícil detecção no processo de padronização de PCR. Breve análise da literatura demonstra que estas estruturas parecem não ser notadas nos trabalhos de HPV envolvendo PCR diagnóstico, embora atualmente outras viroses sejam alvos deste assunto.¹² As hair-pin-loops são marcantes no genoma dos papilomavírus, quando comparados com seqüências de outros organismos.

Campos⁵ procurou testar os primers designados para os diferentes grupos de HPVs selecionados, através de uma série de experimentos de PCR convencionais, visando o estabelecimento de um protocolo único para todos os primers alvos. Para a padronização geral, foram utilizados os DNAs padrões das linhagens celulares de carcinoma cervical HeLa e SiHa para HPV18 e 16, respectivamente, com vistas à melhor sensibilidade possível. Além disto, a sensibilidade de detecção dos primers foi melhorada, testando-se diferentes programas de ciclos termais.⁹ Segundo Campos⁵, pequenas modificações nas condições de PCR permitem que os primers escolhidos sejam capazes de detectar com sucesso os HPVs selecionados dos grupos A, B, C e D. A prevalência de HPV em células de mucosa bucal normal tem sido relatada com a estimativa de uma cópia de DNA genômico viral para cada mil queratinócitos, sugerindo a necessidade de PCR com maior sensibilidade.¹³

Vários pesquisadores detectaram HPV em carcinoma de célula escamosa de boca por PCR. Os principais tipos de HPVs encontrados nesses

estudos foram os HPVs 6, 11, 16 e 1814, com prevalências que variaram de 10% a 100%. Snijders et al.¹⁵ e Premoli-De-Percoco & Ramirez¹⁴ encontraram 21% e 60%, respectivamente. Campos⁵ realizou a triagem de 134 amostras de lesões de boca, sendo 67 de carcinomas de células escamosas (26 de tecido fresco e 41 de tecido embebido

em parafina) e 67 de papilomas em parafina, para os HPVs 6b, 11, 16, 18, 30, 31, 33, 35, 44, 45, 53, 55, 56, 58, 59 e 66.

A Tabela 1 publicada por Campos⁵ apresenta um resumo da detecção de HPVs por PCR em tecido fresco de lesões de boca, nos últimos cinco anos.

Tabela 1 - Resultados comparativos da ocorrência de HPVs dos grupos A, B, C e D em diferentes amostragens de lesões de boca obtidos por PCR

Autores	16	58/33	6b/11	44/55	18	59	30/53	56/66
Ostwald <i>et al.</i> (2003) N=118	35 (30%)		5 (4%)		16 (14%)			
Ha <i>et al.</i> (2002) N=18	14 (78%)							
Ringstrom <i>et al.</i> (2002) N=89	18 (20%)							
Chen <i>et al.</i> (2002) N=27	24 (86%)		4 (15%)		20 (71%) N=28			
Terai <i>et al.</i> (1999)* N=30	2 (7%)		1 (3%)		26 (87%)	7 (23%)		
Kojima <i>et al.</i> (2003)£ N=77	11 (30%)							
Campos (2005) N=26	1 (4%)	6 (23%)	8 (31%)	4 (15%)	2 (8%)		3 (12%)	

(*) amostras normais de adultos

(£) amostras normais de crianças de 3-5 anos

A análise por PCR convencional de todas as amostras (parafina e tecido fresco) detectou o total de 23% (31/134) de positividade para a presença de DNA de papilomavírus humano, sendo 34% (23/67) em carcinomas e 19,4% (13/67) em papilomas. Em estudos recentes em carcinoma bucal de tecido fresco¹⁶, encontraram positividade de 43,2% (51/118) para HPVs 6, 11, 16 e 18. Campos⁵ encontrou 61,53% (16/26) de positividade em amostras de carcinoma de tecido fresco. Os achados acima demonstram uma grande variabilidade na detecção de DNA viral por

PCR em lesões da cavidade bucal. Avaliações de amostras de mucosa bucal normal realizadas por Terai et al.¹³, com PCR in situ em 47 esfregaços de queratinócitos de boca de indivíduos adultos normais, demonstraram 7% (2/30) de positividade para HPV16. Kojima et al.¹⁷ demonstraram a ocorrência de 14% (11/77) de HPVs na cavidade bucal normal de crianças japonesas com idades de 3 a 5 anos. É consenso geral que a prevalência de HPV na mucosa bucal normal ou no estado patológico é ainda controversa, dependendo da população e do método de detecção empregado¹⁸. Entretanto os

achados até o momento sugerem que a cavidade bucal é reservatório de HPVs, desde a infância, e que posteriormente doenças associadas com o papilomavírus humano, tais como carcinomas e outras lesões possam se desenvolver. Portanto, há necessidade de desenvolvimento e aprimoramento de técnicas sensíveis e específicas para diagnóstico, no intuito de buscar futuros métodos de profilaxia e tratamento.

Campos⁵ desenvolveu um método alternativo, relativamente rápido, de extração de DNA de tecido em parafina que difere dos demais métodos que envolvem longa incubação em xilol. Ha et al.¹⁹, utilizando PCR quantitativo em tempo real, pesquisaram amostras de arquivos de carcinoma em parafina e detectaram HPV16 em 2,9% (1/34). A maioria das pesquisas de prevalência do HPV59 enfoca em lesões cervicais e considera este HPV como confinado nas populações das Américas Central e do Sul²⁰, com relato recente de 2% em trabalho realizado na África do Sul²¹. O relato da incidência deste HPV em lesões de boca é bastante raro.²²

CONCLUSÃO

Lorincz et al.²³ classificaram os HPVs dos tipos 6, 11 e 44 como de baixo risco, sendo os tipos 6 e 11 responsáveis pelas infecções benignas do trato anogenital. O condiloma acuminado é atribuído a esses dois tipos de HPVs em 93% dos casos. O tumor de Buschke-Lowenstein, um carcinoma bem diferenciado de células escamosas que acomete a região urogenital, é também atribuído aos HPVs 6 e 11. Tudo indica que os HPVs 6 e 11 estão associados ao HPV13 em infecções do trato oro-respiratório. Campos em 2005⁵ obteve amplificação positiva de HPV 6b/11 em 2/67 (2,98%) amostras de papilomas obtidas de tecido

embebido em parafina, não sendo evidenciada nenhuma amostra positiva de carcinoma de parafina, enquanto que a partir das amostras de carcinomas de tecido fresco foram detectadas 8/26 (30,76%) amostras positivas. Estes dados comparados com o de outros autores (Tabela 1) mostram que há uma presença comum destes HPVs na maioria dos estudos com diferenças no número de ocorrências, o que pode ser atribuído à variabilidade populacional das amostras ou talvez por diferenças na sensibilidade de cada PCR utilizado.

Os HPVs 18 e 45 do grupo C são considerados de alto risco, sendo o 18 apontado como o de maior associação com a carcinogênese bucal, juntamente com o HPV16 do grupo A.^{16,17,19,24,25} A associação de HPV18 e carcinogênese sugerida por Ostwald et al.¹⁶ é posta em dúvidas pelos resultados de alta ocorrência demonstrado por Terai et al.¹³ em tecido bucal normal.

Os HPVs 30 e 56 foram classificados como sendo de alto risco por Lorincz et al.²³ e de médio risco por Bergeron et al.²⁶ O HPV56 é tido como infectando predominantemente a região anogenital, enquanto o HPV30, isolado raramente de lesões do trato genital, é mais frequentemente correlacionado com o carcinoma de laringe.²⁷ Campos⁵ desenhou primers semelhantes para mais de um tipo de HPV dentro desse grupo D, isto é, com dois pares de primers foi possível trabalhar com quatro tipos de HPVs. Para os HPVs 30 e 53, sem distinção, detectando positividade em 22% (9/41) de amostras de carcinoma em parafina, em 1,5% (1/67) de amostra de papiloma de tecido incluído em parafina e em 11,5% (3/26) das amostras de carcinoma de tecido fresco. Os estudos destes HPVs são ainda insatisfatórios, mesmo que estejam correlacionados com câncer da cavidade bucal.

ABSTRACT

Oral cancer represents a health problem of worldwide distribution. Several articles have related HPVs to oral cancer incidence. The main types of HPV that have been considered to be cancerigenous have been HPV 16 and 18. The HPVs are epitheliotrophic virus; not all of them offer high risk, but are frequent in oral mucosa. In a literature review, we present the state of the art about HPV incidence in oral cavity, their types, and presumable relation with oral carcinomas.

DESCRIPTORS

HPV, oral carcinoma, PCR

REFERÊNCIAS

1. Park NH & Kang MK. Genetic instability and oral cancer. *Elet J Bioth* 2000;3:66-71.
2. Zur Hausen H. Viruses in human tumors - reminiscences and perspectives. *Adv Cancer Res* 1996;68:1-22.
3. Paz IB, Cook N, Odom-Maryon T, Xie Y, Wilczynski SP. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. An association of HPV 16 with squamous cell carcinoma of Waldeyer's tonsillar ring. *Cancer* 1997;79:595-604.
4. Wen S, Tsuji T, Li X, Mizugaki Y, Hayatsu Y, Shinozaki F. Detection and analysis of human papillomavirus 16 and 18 homologous DNA sequences in oral lesions. *Anticancer Res* 1997;17:307-12.
5. Campos PA. Prevalência do vírus do papiloma humano – HPV em amostras de neoplasias epiteliais de revestimento da cavidade bucal: detecção pela reação em cadeia da polimerase e pelo real time PCR. Tese (Doutorado). Patologia. Faculdade de Medicina da UFMG 2005. Belo Horizonte, Minas Gerais.

6. Pinheiro NA, Villa LL. Low frequency of p53 mutations in cervical carcinomas among Brazilian women. HPV and p53 in cervical carcinomas Braz *J Med Biol Res* 2001;34: 727-33.

7. Baker TS, Newcomb WW, Olson NH, Cowser LM, Olson C. & Brown JC. Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensionnal image reconstruction. *Biophys J* 1991;60:1445-56.

8. Trus BL, Roden B, Greenstone HL, Vrhel M, Schiller JT & Booy FP. Novel structural features of bovine papillomavirus capsid revealed by a three-dimensional reconstruction to 9Å resolution. *Nat Struct Biol* 1997;4:413-42.

9. Yap EP, McGee JO. Short PCR product yields improved by lower denaturation temperatures. *Nucl A Res* 1992;19(7):1713.

10. Batzer MA, Carlton JE, Deininger PL. Enhanced evolutionary PCR using oligonucleotides with inosine at the 3'-terminus. *Nucleic Acids Res* 1991;19(18):5081.

11. Kilpatrick DR, Nottay B, Yang CF, Yang SJ, Silva E, Penaranda S et al. Sorotype-specific identification of polioviruses by PCR using primers containing Mixed-base or deoxyinosine residues at positions of codon degeneracy. *J Clin Microbiol* 1998;36(2):352-7.

12. Ogston P, Raj K, Beard P. Productive replication of adeno-associated virus can occur in human papillomavirus type 16 (HPV16) episome-containing keratinocytes and is augmented by the HPV16 E2 protein. *J Virol* 2000;74(8):3494-504.

13. Terai M, Hashimoto K, Yoda, K, Sata T. High prevalence of papillomaviruses in the normal oral cavity of adults. *Oral Microbiol Immunol* 1999;14:201-5.

14. Premoli-De-Percoco G, Ramirez JL. High risk human papillomavirus in oral squamous carcinoma: evidence of risk factors in a Venezuelan rural population. Preliminary report. *J. Oral Pathol Med* 2001;30 (6):355-61.

15. Snijders PJF, Meijer CJL, Walboomers JMM. Degenerate primers based on highly conserved regions of amino acid sequence in papillomaviruses can be used in a generalized polymerase chain reaction to detect productive human papillomavirus infection. *J Gen Virol* 1991;72:2781-6.
16. Ostwald C, Rutsatz K, Schweder J, Schmidt W, Gundlach K. Barten, M. Human papillomavirus 6/11, 16 and 18 in oral carcinomas and benign oral lesions. *Med Microbiol Immunol* 2003;192(3):145-8.
17. Kojima A, Maeda H, Kurahashi N, Sakagami G, Kubo K, Yoshimoto H, Kameyana Y. Human papillomavirus in the normal oral cavity of children in Japan. *Oral Oncol* 2003;39(8):821-8.
18. Miller CS, White DK. Human papillomavirus expression in oral mucosa, premalignant conditions, and squamous cell carcinoma: a retrospective review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Path Oral Radiol and End* 1996;82:57-68.
19. Ha PK, Pai si, Westra wH, Giglison ML, Tong BC, Sidransky D, Califano JA. Real Time quantitative PCR Demonstrates Low prevalence of Human Papillomavirus Type 16 in Premalignant and Malignant lesions of oral cavity. *Clinic Cancer Res* 2002;8:1203-9.
20. Bosch FX, Manos MN, Munoz N et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Nortl Cancer Inst* 1995;87:796-805.
21. Kay P, Soeters R, Nevins J, Denny L, Dehaeck CM, Williamson AL. High prevalence of HPV16 in South African women with cancer of the cervix and cervical intraepithelial neoplasia. *J Med Virol* 2003;71(2):265-73.
22. Ha PK, Califano JA. The role of human papillomavirus in oral carcinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15(4):188-96.
23. Lorincz RR, Jenson AB, Greenberg MD, Lancaster WD. Kurman, R.J. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* 1992;79:328-37.
24. Ringstrom E, Peters E, Hasegaw M., Posner M, Liu M, Kelsey KT. Human papillomavirus type 16 and squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 2002;8(10):3187-92.
25. Chen PC, Kuo C, Pan CC, Chou MY. Risk of oral cancer associated with human papillomavirus infection, betel quid chewing, and cigarette smoking en Taiwan- an integrated molecular and epidemiological study of 58 cases. *J Oral Pathol Med* 2002;31:317-22.
26. Bergeron C, Barrasso R, Beaudeno S, Flamant P, Croissan O, & orth. Human papillomaviruses associated with cervical intraepithelial neoplasias. Great diversity and distinct distribution in low and high-grade lesions. *Am J Surg Patho* 1992;16:641-9.
27. Kahn T, Schwarz E, zur Hausen H. Molecular cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus (HPV 30) from a laryngeal carcinoma. *Int J Cancer* 1996;37:61-5.

Recebido em: 21/08/2007

Aceito em: 20/10/2007

Correspondência:
 Pedro Alves Campos
 Laboratório de Morfologia Microscópica (ICBS)
 - PUC Minas
 Av. D. José Gaspar, 500 – Prédio 23
 30535-901 – Belo Horizonte – MG
 Telefone: (031) 3319-41.60
 E-mail:pafar@uol.com.br