

## **INFECÇÃO PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) E FREQUÊNCIA DE GENES HLA EM UMA POPULAÇÃO FEMININA DE UMA MESORREGIÃO DO SUDESTE PARANAENSE.**

Karina Zanão (PIBIC/CNPq), Sueli Donizete Borelli (Orientador), e-mail: sueliborelli@gmail.com.

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Maringá, Paraná.

**Área: Imunologia; Subárea: Imunogenética**

**Palavras-chave:** câncer cervical, Papilomavírus Humano, HLA.

### **Resumo**

O câncer de colo de útero é um problema de saúde mundial, constituindo o quarto tipo de câncer mais frequente na população feminina. O Papilomavírus Humano (HPV) está presente em aproximadamente 99% dos casos de câncer cervical. O sistema imunológico possui papel fundamental na eliminação da infecção. Os linfócitos T atuam na defesa do corpo humano contra microorganismos intracelulares. Os genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) codificam proteínas responsáveis pela apresentação de antígenos associados às células aos linfócitos T. No ser humano, as moléculas MHC são conhecidas como Antígeno Leucocitário Humano, o sistema (HLA). Neste estudo, analisamos frequência dos genes codificadores dos antígenos leucocitários humanos (HLA) de classe I e a infecção pelo papilomavírus humano (HPV) em uma população feminina de uma mesorregião do Sudeste Paranaense. Muitos estudos associam as moléculas HLA como fatores de proteção ou suscetibilidade a determinadas doenças. Observamos no presente estudo uma possível associação dos grupos alélicos HLA-A\*03 e B\*07 com a infecção por HPV de alto risco e proteção ao desenvolvimento de câncer na presença do grupo alélico HLA-A\*23.

### **Introdução**

O câncer de colo uterino constitui um problema de saúde mundial, tratando-se do quarto tipo de câncer mais frequente na população feminina e a quarta causa de mortes de mulheres no Brasil (INCA, 2016). Associado ao câncer de colo de útero, o Papilomavírus Humano (HPV) é o fator de risco de maior importância, presente em 99% dos casos (WALBOOMERS et al., 1999). Atualmente, são conhecidos mais de 150 sorotipos do vírus HPV, nomeados de acordo com a sua descoberta e classificados em baixo e alto risco carcinogênico (DE VILLIERS, 1997). A resposta do hospedeiro a infecções

virais depende da atuação do sistema imunológico do indivíduo infectado. Os linfócitos T estão presentes na defesa do corpo humano contra microorganismos intracelulares, porém os receptores de antígenos presentes nas células T, reconhecem apenas os antígenos que lhes são apresentados por determinadas células (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012). Os genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) codificam proteínas responsáveis por apresentar os antígenos associados às células aos linfócitos T. No ser humano, as moléculas do MHC são chamadas de Antígeno Leucocitário Humano (HLA) e são subdivididas em classe I, II e III (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

Diversos estudos demonstram a associação dos genes HLA com várias doenças (GIAROLA et al., 2012). No contexto das infecções virais observa-se que a infecção pelo Papilomavírus Humano segue um curso benigno e se resolve espontaneamente em grande parte dos casos, entretanto a infecção persistente por certos sorotipos do vírus está associada ao desenvolvimento de cânceres (DE VILLIERS, 1997). Diante dessa evidência este estudo terá como objetivo avaliar a frequência dos genes HLA de classe I e a infecção pelo HPV em uma população feminina de uma mesorregião do Sudeste Paranaense.

## Materiais e métodos

### *Obtenção das amostras*

Para a realização desse estudo, 95 mulheres foram atendidas e encaminhadas ao serviço de colposcopia do ambulatório da 6ª Regional de Saúde do Paraná, localizada no município de União da Vitória, entre abril de 2013 e julho de 2014.

Foram coletadas amostras de região cérvico-vaginal para detecção do HPV e amostras de sangue total para tipificação HLA. Após a coleta, todas as amostras foram armazenadas à -20°C até o momento da extração do DNA.

### *Detecção do vírus HPV*

Para detecção do HPV, foi realizada a extração do DNA e posteriormente amplificação por técnica de PCR simples com *primers* específicos para o vírus. A genotipagem do HPV foi realizada pela técnica de Polimorfismo de Tamanho dos Fragmentos de Restrição (RFLP). A visualização do produto amplificado foi possível pela corrida eletroforética em gel de agarose 1.0% (m/v) corado com brometo de etídio. O produto da PCR das amostras que se apresentaram positivas para infecção por HPV foram submetidos à digestão pela enzima de restrição HpyCH4V e, posteriormente, à eletroforese em gel de poli-acrilamida (8%).

### *Extração do DNA genômico para tipagem HLA e genotipagem HLA classe I*

O DNA genômico foi extraído de células presentes no sangue total utilizando o kit BioPur (Biometrix Diagnóstica, Curitiba, PR, Brasil), seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram amplificadas por PCR e hibridizadas com os oligonucleotídeos de sequência específica (SSO - Sequence Specific Oligonucleotides probes), usando a tecnologia Luminex (One Lambda, Canoga Park, CA, EUA). Resumidamente, a reação constituiu-se de hibridação por sondas loco HLA específicos na superfície de microesferas fluorescentes. A leitura e interpretação dos resultados foram realizados em citômetro de fluxo (One Lambda®) de acordo com as instruções do fabricante. Os dados gerados pela leitura do aparelho foram analisados no programa HLA Fusion v.3.0 para determinação da genotipagem HLA.

### *Análise estatística*

Para o cálculo das frequências alélicas, bem como do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi utilizado o programa Arlequin v3.1. Os valores de p, OR e IC foram calculados pelo programa online OpenEpi usando uma tabela de contingência 2 X 2. Para valores de p significativos foi feita correção de Bonferroni. Como teste de hipótese foram utilizados o Teste  $\chi^2$  com correção de Yates ou o teste Exato de Fisher, os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando o valor de p foi menor que 0,05.

### **Resultados e Discussão**

O levantamento bibliográfico dos últimos cinco anos sobre o tema abordado demonstrou a importância de estudar a possível associação de alelos HLA em pacientes HPV positivos. De 129 estudos encontrados sobre o tema no Medline, do ano de 2012 a 2017, seis são de autoria brasileira e foram realizados em populações das regiões sul, sudeste e centro-oeste brasileiro. Das 95 mulheres do presente estudo, a presença de infecção por HPV foi encontrada em 59 (62,1%) das participantes. Destas, 46 (78%) pacientes estavam infectadas por pelo menos um genótipo de alto risco carcinogênico. Para análise de associação das variantes HLA com a progressão das lesões cervicais, as 59 pacientes que apresentaram a infecção foram subdivididas em dois grupos: grupo controle, constituído apenas por pacientes que não apresentaram nenhum tipo de alteração citológica (n= 13), e o grupo CA, composto por pacientes que apresentaram lesões cervicais graves características de pré-câncer e câncer, ASC-H, HSIL, ISCC e CC (n= 46). Os grupos encontraram-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Observamos que o grupo alélico HLA-A\*23 estava associado negativamente com o desenvolvimento de câncer, caracterizando-se como um fator de proteção. Os grupos alélicos HLA-A\*03 e -B\*07 estavam associados positivamente com a infecção por HPV de alto risco, caracterizando-se como fatores de risco.

Devido ao alto polimorfismo dos genes HLA, foi realizada a correção de Bonferroni para reduzir as chances de erro tipo I resultante de múltiplas comparações.

Após as correções, os resultados não se mantiveram estatisticamente significantes, possivelmente devido a pequena quantidade de mulheres envolvidas no estudo.

## Conclusões

Demonstramos neste estudo uma possível associação dos grupos alélicos HLA-A\*03 e B\*07 com a infecção por HPV de alto risco e proteção ao desenvolvimento de câncer na presença do grupo alélico HLA-A\*23. Novos estudos, envolvendo um número maior de pacientes, serão necessários para fundamentar esta associação grupo alélico-doença.

## Agradecimentos

Agradecemos ao CNPq pelo auxílio financeiro para realização deste estudo. Agradecemos também aos colaboradores do Laboratório de Citologia Clínica e do Laboratório de Imunogenética da Universidade Estadual de Maringá.

## Referências

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. **Imunologia celular e molecular**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012

Brasil, Estimativa 2016 – Colo de útero, in: **INCA**, 2016.

De Villers em: Papillomavirus and HPV typing. **Clin Dermatol.**, v.15, p.199-206, 1997.

Giarola LB, Santos RR, Bedendo J, Silva Júnior WV, Borelli SD HLA molecules and nasal carriage of Staphylococcus aureus isolated from dialysis and kidney transplant patients at a hospital in southern Brazil. **BMC Res Notes**. v. 5, p.90-6, 2012.

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **J Pathol.** , v.189, n.1, p.12-9, 1999.