

Detecção e genotipagem de papilomavírus humano em lesões de queratoacantoma solitário de pacientes imunocompetentes*

*Detection and genotyping of human papillomavirus in solitary keratoacanthoma lesions of immunocompetent patients**

Rodrigo Alessandro R. Vela¹
Hamilton Ometto Stolf⁴
Ana Laura Bastos da Costa⁷

Jossimara Poletini²
João Manuel Grisi Candeias⁵
Cristiane Yuri Matsuo⁸

Mariângela Esther A. Marques³
Márcia Guimarães da Silva⁶
Hélio Amante Miot⁹

Resumo: FUNDAMENTOS: O queratoacantoma é neoplasia cutânea benigna que incide preferencialmente em indivíduos de pele clara, faixa etária elevada, acometendo áreas fotoexpostas. Além da exposição à radiação ultravioleta, sua etiologia é relacionada a diversos carcinógenos, entre eles a infecção pelo papilomavírus humano (HPV). OBJETIVOS: Avaliar a prevalência do DNA do HPV, bem como seus genótipos, em lesões de queratoacantoma solitário de pacientes imunocompetentes.

MÉTODOS: Foram estudados queratoacantomas de pacientes sem evidências de imunocomprometimento, excisados entre 1996 e 2000 em hospital universitário. Realizaram-se cortes histológicos, desparafinização e extração de DNA desses fragmentos. Os espécimes positivos para DNA de HPV foram submetidos ao seqüenciamento gênico, para determinação do genótipo.

RESULTADOS: Foram estudados 58 pacientes com idade média de $64,5 \pm 13,8$ anos. A proporção entre os sexos foi semelhante, e as localizações mais comuns foram os membros superiores (50%) e a face (27,6%). Detectou-se DNA de HPV em 48 (82,7%) fragmentos de queratoacantomas, sendo os genótipos 6, 11 e 16 os prevalentes.

CONCLUSÕES: A alta prevalência do achado de DNA de HPV em lesões de queratoacantoma solitário pode sugerir a participação viral em sua oncogênese.

Palavras-chave: Análise de seqüência com séries de oligonucleotídeos; Ceratoacantoma; Papilomavírus; Reação em cadeia da polimerase

Abstract: BACKGROUND - Keratoacanthoma is a benign cutaneous neoplasm that preferentially affects fair skin individuals of older age groups and involves sun-exposed areas. Apart from ultraviolet radiation exposure, its etiology is related to several carcinogens, including human papillomavirus (HPV) infection.

OBJECTIVES: To assess the prevalence of HPV DNA and its genotypes in solitary keratoacanthoma lesions of immunocompetent patients.

Methods: Keratoacanthoma lesions of patients with no evidence of immunological involvement, excised from 1996 to 2000, at a university hospital, were assessed. Histological aspects, deparafinization and DNA extraction of these lesions were evaluated. The specimens positive for HPV DNA were submitted to gene sequencing to determine the genotype.

RESULTS: Fifty-eight patients were studied, mean age of 64.5 ± 13.8 years. Both sexes were similarly affected, and the most common sites were upper limbs (50%) and face (27.6%). HPV DNA was detected in 48 (82.7%) keratoacanthoma fragments, and the genotypes 6, 11 and 16 were the most prevalent.

CONCLUSIONS: The high prevalence of HPV DNA in solitary keratoacanthoma lesions may suggest viral participation in its oncogenesis.

Keywords: Keratoacanthoma; Papillomavirus; Polymerase chain reaction; Sequence analysis with oligonucleotide series

Recebido em 06.06.2006.

Aprovado pelo Conselho Consultivo e aceito para publicação em 06.02.2007.

* Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia e Imunologia do IBB-Unesp - São Paulo (SP), Brasil e no Departamento de Patologia da FMB-Unesp - São Paulo (SP), Brasil. Conflito de interesse declarado: Nenhum

¹ Pós-graduando em Doenças Tropicais da FMB-Unesp - São Paulo (SP), Brasil.

² Pós-graduanda em Patologia da FMB-Unesp - São Paulo (SP), Brasil.

³ Professora-assistente doutora do Departamento de Patologia da FMB-Unesp - São Paulo (SP), Brasil.

⁴ Professor-assistente doutor do Departamento de Dermatologia da FMB-Unesp - São Paulo (SP), Brasil.

⁵ Professor-assistente doutor do Departamento de Microbiologia e Imunologia do IBB-Unesp - São Paulo (SP), Brasil.

⁶ Professora-assistente doutora do Departamento de Patologia da FMB-Unesp - São Paulo (SP), Brasil.

⁷ Graduanda em medicina da FMB-Unesp - São Paulo (SP), Brasil.

⁸ Graduanda em medicina da FMB-Unesp - São Paulo (SP), Brasil.

⁹ Professor-assistente doutor do Departamento de Dermatologia da FMB-Unesp - São Paulo (SP), Brasil.

INTRODUÇÃO

Queratoacantoma (QA) é neoplasia cutânea benigna, pouco freqüente, que se caracteriza por uma fase de crescimento rápido seguida de involução espontânea. Seu quadro histopatológico assemelha-se ao do carcinoma espinocelular (Figura 1). Acomete principalmente indivíduos de pele clara, faixa etária elevada, com predileção por áreas corporais fotoexpostas, como face e membros superiores.¹

Pode haver várias apresentações clinicomorfológicas ou formas sindrômicas de QA, embora a forma solitária seja a mais freqüente.^{2,3}

Estudos de análise da expressão de citoqueratinas sugerem a origem do QA nos folículos pilosos com diferenciação semelhante à do carcinoma espinocelular.⁴ A exata etiologia dos QA, porém, não foi estabelecida, sendo a exposição solar crônica o principal fator incriminado, além de co-fatores como imunossupressão, tabagismo, trauma, cicatrização, radiodermite, lúpus eritematoso discóide, contato com carcinógenos (alcatrão), entre outros citados.^{4,5}

Alguns trabalhos da literatura identificaram DNA de papilomavírus humano (HPV) em diversos

tumores epiteliais como o carcinoma espinocelular, doença de Bowen, queratose seborréica e QA.⁵ Além disso, em algumas síndromes cutâneas (lúpus eritematoso verrucoso, síndrome de Muir-Torre) ou situações de imunossupressão iatrogênica (transplantes de órgãos sólidos) que cursam com superinfecção por HPV, também são observados maiores índices de tumores cutâneos não-melanoma, entre eles, o QA.^{5,9}

Este estudo avalia a prevalência e genotipagem de HPV em lesões de QA solitário em adultos imunocompetentes.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Estudo transversal compreendendo lesões cutâneas com diagnóstico histopatológico de QA solitário em pacientes adultos imunocompetentes, excisadas no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), no período de janeiro de 1996 a dezembro de 2000 para determinação da prevalência da detecção do DNA de HPV e posterior genotipagem.

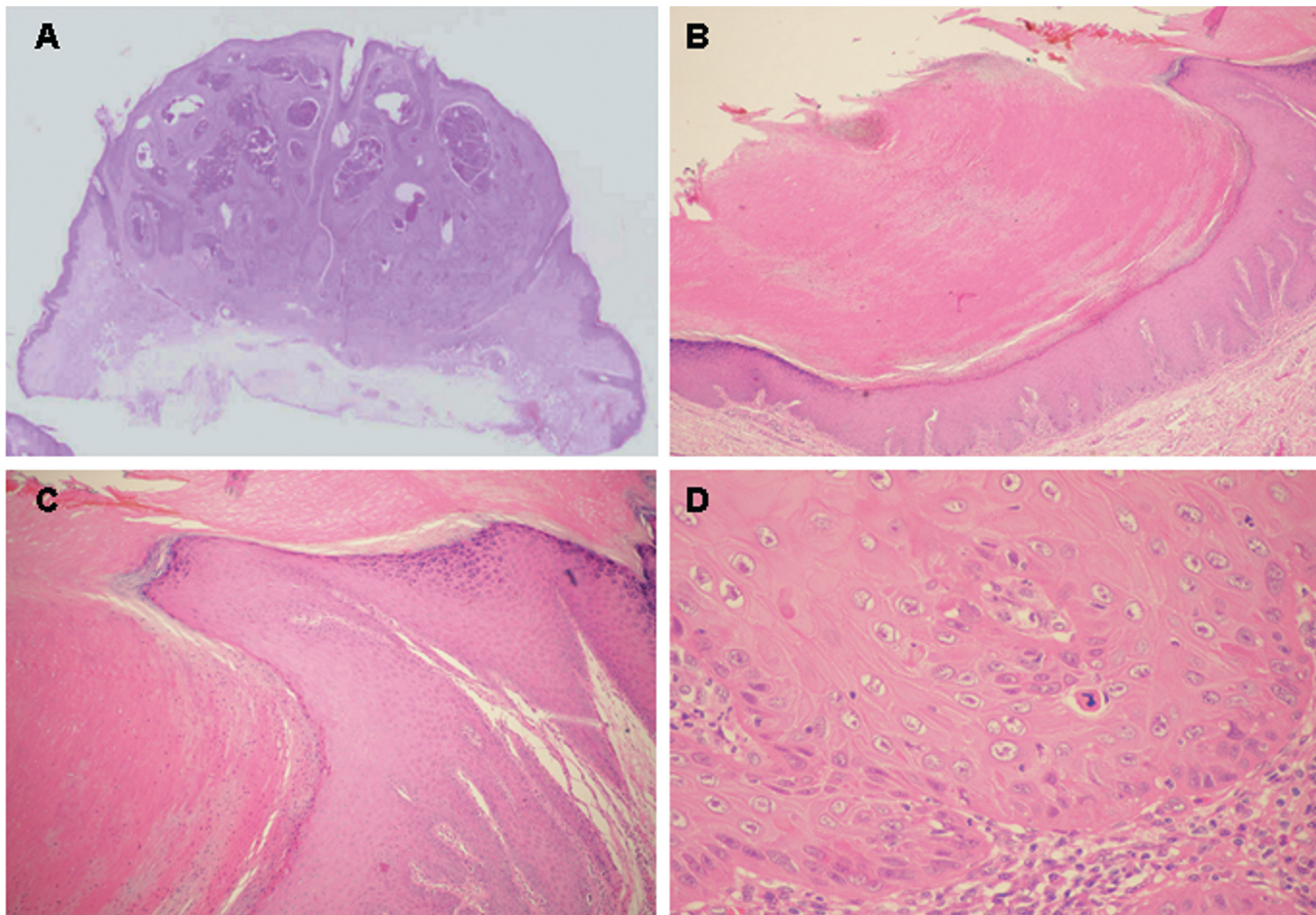


FIGURA 1: Fotomicrografias de cortes histológicos de queratoacantoma em diferentes fases evolutivas. A) Fase proliferativa, HE 10x. B) Fase involutiva (retificação da base da lesão), HE 100x. C) detalhe da figura anterior mostrando colarete epidérmico e hipergranulose, HE 200x. D) Blocos de queratinócitos atípicos, desmossomos, figuras de mitose e células disqueratóticas com núcleos picnóticos, HE 400x

Partindo dos registros do Serviço de Anatomia Patológica, foram consultadas, nos prontuários hospitalares e por entrevistas telefônicas, as demais informações epidemiológicas de importância, como a presença de imunossupressão ou de co-morbidades.

Os blocos de parafina representativos da porção central das lesões foram recuperados e, de cada bloco, três fragmentos foram cortados com espessura de 5µm e submetidos à desparafinização¹⁰ e extração do DNA com solução de brometo de cetiltrimetilamônio (BCTA).

Extração do DNA com solução BCTA

As amostras foram incubadas a 37°C por 12h para a digestão do material, e a proteinase K (400µg/mL) inativada por aquecimento a 96°C durante sete minutos. Em seguida foram adicionados 100µl de solução de NaCl 5M e 100µl da solução BCTA/NaCl pré-aquecida a 65°C, com posterior incubação por 10 minutos em igual temperatura. Após esse período, foram acrescentados 750µl de clorofórmio-álcool isoamílico 24:1 e centrifugado por cinco minutos (12.000rpm) à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para novo tubo, e adicionados 450µl de etanol absoluto a -20°C com posterior incubação por 10 minutos em igual temperatura. A seguir, o material foi novamente centrifugado por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante descartado, e acrescentados 450µl de etanol 70% à temperatura ambiente. Após nova centrifugação por 15 minutos a 4°C, as amostras foram colocadas em dessecador com sistema a vácuo (concentrador 5301, Eppendorf) por 30 minutos e ressuspensas em 50µl de tampão TRIS/EDTA (TE).

Amplificação do ácido nucléico pela técnica de reação de cadeia de polimerase (PCR)

O master mix composto por volume final de 50µL foi preparado com 1XPCR Buffer 10x (Invitrogen); 0,4mM de dNTP mix; 2U de Taq DNA Polimerase (Platinum, Invitrogen); 0,5µM de cada primer GP5+ e GP6+, água Milli-Q autoclavada qsp para 46µL e 4 µL da amostra de DNA.¹¹

A incubação foi realizada em termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany) empregando-se os parâmetros de 95°C, por cinco minutos; 45 ciclos compostos de 95°C por 30 segundos; 51°C por 45 segundos; 72°C por um minuto e finalmente 72°C por sete minutos. Em todas as reações realizadas foi utilizado controle negativo e controle positivo de células HeLa contendo HPV 18.

Todas as amostras foram testadas para amplificação do gene constitucional da β-globina, presente no genoma de todas as células nucleadas humanas. A positividade da detecção do gene da β-globina representa, indiretamente, a possibilidade de recuperação de material genético na amostra, selecionando, dessa

forma, os espécimes submetidos à execução da pesquisa de DNA de HPV.

A eficiência das amplificações foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 1,5% (Gibco BRL) preparada em tampão Tris-Ácido Bórico-EDTA e corada com Brometo de Etídio (Gibco BRL).

Tipagem de HPV

Após a amplificação, os produtos de PCR foram purificados com o Kit Wizard[®]SV Gel and PCR Cleanup System (Promega[®]). As reações de seqüenciamento foram realizadas utilizando-se o DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences[®]), nas concentrações de 2,0µL do Sequencing reagent premix; 1,0µL (1pmol/µL) de cada primer; H₂O q.s.p. para 10,0µL e DNA de 1,0 a 7,0µL dependendo de sua concentração. A posterior precipitação do DNA seguiu-se de acordo com o recomendado pelo fabricante do DYEnamic, e as reações de seqüenciamento foram realizadas em seqüenciador automático ABI Prism[®] 377 (Applied Biosystems).

As seqüências obtidas foram comparadas com as existentes no *genebank*¹² através de um *Blast*, sendo que para a tipagem foi adotada uma identidade maior ou igual a 85%, quando comparadas com as seqüências depositadas. Os dois primers de cada seqüência foram alinhados entre si e comparados com seqüências depositadas no *genebank* utilizando-se o programa Mega 3.1.

O fluxograma dos trabalhos pode ser visto na figura 2.

Análise das variáveis

As proporções entre os grupos foram comparadas usando o teste do Qui-quadrado (Yates) e os dados contínuos pelo teste t-Student. Os dados foram tabulados em MS Excel 2003TM e analisados usando-se o *software* Bioestat 2.0.¹³ O nível de significância adotado foi de 5%.

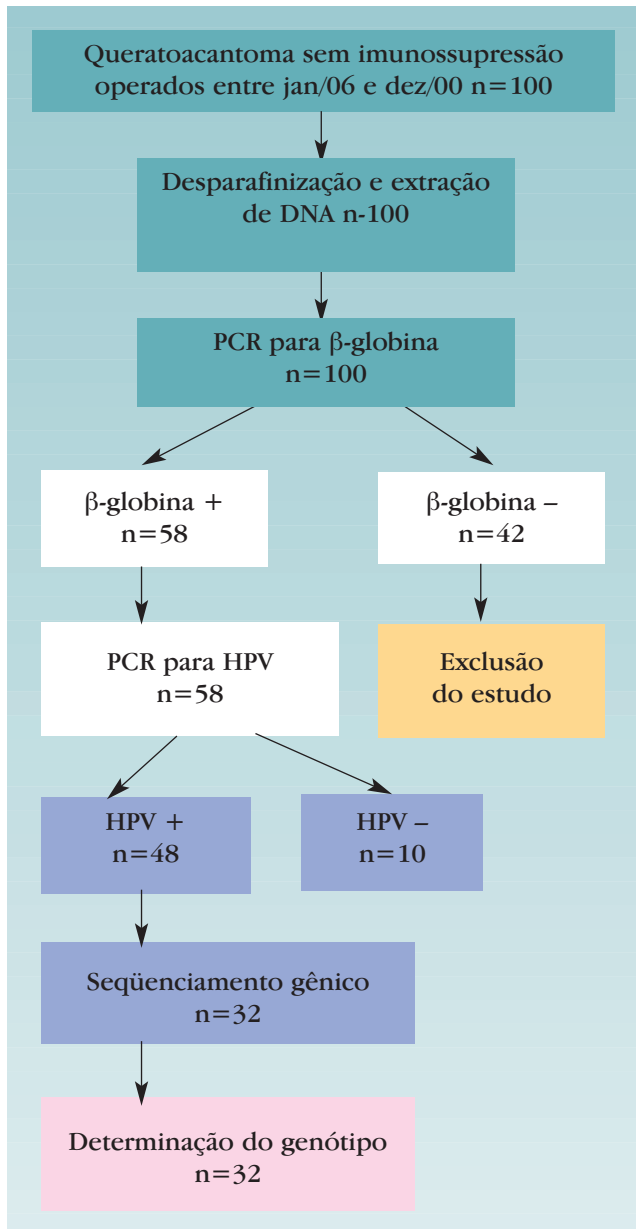
RESULTADOS

Inicialmente, 100 lesões de QA, de pacientes imunocompetentes, excisadas no período de janeiro de 1996 a dezembro de 2000 foram incluídas no trabalho. Entretanto, a positividade do gene da β-globina ocorreu em 58 lesões, que resultou na amostra considerada para o estudo (Figura 2). Não houve negros ou orientais entre os pacientes, e os principais dados epidemiológicos da amostra estudada estão listados na tabela 1.

Não houve correlação entre a positividade da β-globina e o ano de excisão do QA ou o tempo de parafinização do bloco (p>0,1 t-Student).

Não foi detectada diferença quanto à prevalência de QA em relação ao sexo, e os pacientes acome-

FIGURA 2: Fluxograma do estudo



tidos representavam faixas etárias acima dos 50 anos, na época da cirurgia.

Os membros superiores ($p < 0,05$) configuraram a localização mais freqüente, sendo observada alta prevalência de tabagismo entre os pacientes.

O PCR para DNA de HPV foi realizado em 58 amostras positivas, e em 32 (82,7%) delas as seqüências apresentadas tiveram identidade igual ou superior a 85% quando comparadas com as seqüências depositadas e foram consideradas positivas para o estudo. Desse total de 32 amostras, os genótipos prevalentes foram 6, 16 e 11, e os menos freqüentes foram os tipos não genitais (Gráfico 1). Não houve, porém, associação significativa entre tabagismo e a detecção de DNA de HPV ($p > 0,1$).

TABELA 1: Características epidemiológicas dos 58 pacientes de queratoacantoma incluídos no estudo

Características epidemiológicas	N	%	p
Sexo			
Masculino	28	48,3	$>0,1$
Feminino	30	51,7	
Topografia			
Membros superiores	29	50	$<0,05$
Face	16	27,6	
Membros inferiores	09	15,5	
Tronco	04	6,9	
Tabagismo			
Sim	38	65,5	$<0,05$
Não	20	34,5	
Idade em anos (média \pm dp)			
			64,5 \pm 13,8

DISCUSSÃO

O estudo constatou alta prevalência de DNA de HPV em lesões de QA solitário em imunocompetentes, apresentando genótipos predominantes em lesões genitais e extragenitais.

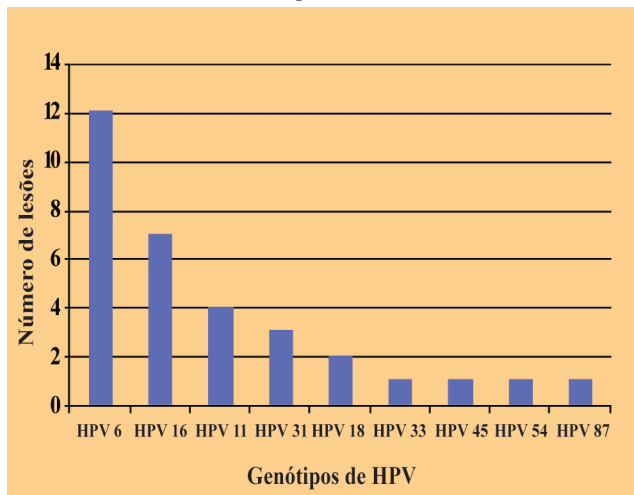
O papel oncogênico do HPV é bem estabelecido em doenças genitais, como o condiloma acumulado gigante, carcinoma de colo de útero, carcinoma de pênis e vulva,⁷ porém sua participação na oncogênese do QA é ainda pouco conhecida. No carcinoma de colo de útero, o tabagismo participa como co-fator na oncogênese viral.^{5,14,15} No presente estudo foi demonstrada alta prevalência de tabagismo entre os portadores de QA, porém, não houve associação significativa entre o hábito de fumar e a detecção de DNA do HPV.

Todos os pacientes apresentavam pele clara, sendo que a fotodistribuição das lesões fortalece a hipótese da radiação ultravioleta como principal fator oncogênico no QA. Apesar de a oncogênese poder ser iniciada e promovida pela irradiação solar, a presença do HPV sugere ação coadjuvante da integração viral ao DNA das células do folículo piloso.^{16, 17}

Outra sugestão da participação do HPV na oncogênese do QA é a observação concomitante da maior prevalência de QA e das manifestações clínicas da infecção por HPV em imunocomprometidos, especialmente transplantados de órgãos sólidos, em especial, os transplantados renais.¹⁸

O achado predominante de genótipos de baixo risco oncogênico, além da grande variabilidade de genótipos detectados, corresponde a elementos que precisam ser elucidados e comprovados por estudos

GRÁFICO 1: Frequência dos genótipos de HPV avaliados em 32 lesões de queratoacantoma



HPV: papilomavírus humano

moleculares e modelos animais de oncogênese. No entanto, o baixo risco oncogênico, por não significar ausência de risco, fortalece a possibilidade de o HPV se comportar como co-fator para a gênese do QA, como ocorre no carcinoma verrucoso, que se associa aos genótipos 6 e 11.^{16, 18}

Este estudo de detecção de DNA do HPV, realizado nas lesões de QA em indivíduos imunocompetentes, não utilizou controle de pele normal adjacente, o que poderia reforçar a hipótese da oncogênese viral, caso se verificasse menor prevalência de DNA de HPV na pele normal peritumoral. A principal razão disso foi a escolha de material fixado e embebido em parafina, com suas bordas (de pele normal) manipuladas cirurgicamente, passíveis de contaminação pelo material

genético do tumor, não fornecendo dados confiáveis da presença de DNA do HPV nessas margens.

Um estudo que comparou a presença de DNA do HPV na pele normal de pacientes não portadores de QA, com lesões de QA de outros pacientes, foi capaz de identificar esse tipo de material genético inclusive na pele sã dos que não desenvolveram a neoplasia, demonstrando que a presença de DNA de HPV não é exclusividade da pele tumoral e reforçando a necessidade de maior elucidação no papel oncogênico viral em QA, a partir de estudos controlados.⁹

Estudos que envolvam a extração de DNA de fragmentos biológicos pré-processados (blocos parafinizados) representam certa dificuldade inerente ao processo de fixação. Por outro lado, os bancos de material biológico parafinado arquivados nos serviços de patologia permanecem como uma das mais profícuas fontes de conhecimento em que se baseia a pesquisa médica.

No presente trabalho, a taxa de recuperação de DNA não dependeu do tempo de estocagem das amostras, sugerindo que o processo de fixação em parafina pode interferir diretamente na conservação do material genético, necessitando maior estudo. Em outros trabalhos que empregaram essa metodologia, a extração de DNA não ultrapassou 20%.^{16,19} Esses achados indicam a necessidade de estudos futuros comparativos, utilizando material não fixado, para melhor esclarecimento do real papel da infecção pelo HPV na oncogênese do QA.^{20, 21}

CONCLUSÃO

A alta prevalência de DNA de HPV encontrada nas lesões de QA solitário pode sugerir o envolvimento viral em sua oncogênese. □

REFERÊNCIAS

1. Schwartz RA. Keratoacanthoma. *J Am Acad Dermatol*. 1994;30:1-19.
2. Schwartz RA. Keratoacanthoma: a clinico-pathologic enigma. *Dermatol Surg*. 2004;30:326-33.
3. Seifert A, Nasemann T. Das Keratoakanthom und seine klinischen Varianten. *Hautarzt*. 1989;40:189-202.
4. Schwartz RA. The keratoacanthoma: a review. *J Surg Oncol*. 1979;12:305-17.
5. Miot HA, Miot LDB, Costa ALB, Matsuo CY, Stolf HO, Marques MEA. Association between solitary keratoacanthoma and cigarette smoking: a case-control study. *Dermatol Online J*. 2006;12:2.
6. Lu S, Syrjanen SL, Havu VK, Syrjanen S. Known HPV types have no association with keratoacanthomas. *Arch Dermatol Res*. 1996;288:129-32.
7. Syrjanen KJ. Immunohistochemistry in assessment of molecular pathogenesis of cervical carcinogenesis. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2005;26:5-19.
8. Snijders J, van der Brule A, Schrijnemakers H, Snow G, Meijer CJ, Walboomers JM. The use of general *primers* in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of Human Papillomavirus genotypes. *J Gen Virol*. 1990;71:173-81.
9. Hsi ED, Svoboda-Newman SM, Stern RA, Nickoloff BJ, Frank TS. Detection of human papillomavirus DNA in keratoacanthomas by polymerase chain reaction. *Am J Dermatopathol*. 1997;19:10-5.
10. McKay SP, Gregoire L, Lonardo F, Reidy P, Mathog RH, Lancaster WD. Human papillomavirus (HPV) transcripts in malignant inverted papilloma are from integrated HPV DNA. *Laryngoscope*. 2005;115:1428-31.
11. De Roda Husman AM, Walboomers JMM, Van Den Brule AJC, Meijer CJLM, Snijders PJF. The use of general *primers* GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol*. 1995;76:1057-62.
12. NCBI Homepage [homepage]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information. [cited 2006 Mar 24]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
13. Ayres M, Ayres Jr M, Ayres DL, dos Santos AS. Bioestat: 2.0 aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá MCT – CNPq; 2000.
14. Franco EL, Schlecht NF, Saslow D. The epidemiology of cervical cancer. *Cancer J*. 2003;9:348-59.
15. Castellsague X, Munoz N. Chapter 3: cofactors in human papillomavirus carcinogenesis--role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003;31:20-8.
16. Stockfleth E, Meinke B, Arndt R, Christophers E, Meyer T. Identification of DNA sequences of both genital and cutaneous HPV types in a small number of keratoacanthomas of nonimmunosuppressed patients. *Dermatology*. 1999;198:122-5.
17. Trowell HE, Dyall-Smith ML, Dyall-Smith DJ. Human papillomavirus associated with keratoacanthomas in Australian patients. *Arch Dermatol*. 1990;126:1654.
18. Forslund O, DeAngelis PM, Beigi M, Schjolberg AR, Clausen OP. Identification of human papillomavirus in keratoacanthomas. *J Cutan Pathol*. 2003;30:423-9.
19. Viviano E, Sorce M, Mantegna M. Solitary keratoacanthomas in immunocompetent patients: no detection of papillomavirus DNA by polymerase chain reaction. *New Microbiol*. 2001;24:295-7.
20. Hopfl RM, Schir MM, Fritsch PO. Keratoacanthomas: human papillomavirus associated? *Arch Dermatol*. 1992;128:563-4.
21. Magee KL, Rapini RP, Duvic M, Adler-Storthz K. Human papillomavirus associated with keratoacanthoma. *Arch Dermatol*. 1989;125:1587-9.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Hélio Amante Miot

Departamento de Dermatologia e Radioterapia da FMB-Unesp.

Campus Universitário de Rubião Jr.

18618 000 Botucatu – São Paulo – Brasil

Fone/FAX: (14) 3882-4922

E-mail: beliomiot@fmb.unesp.br

Como citar este artigo: Riemma RAR, Poletini J, Marques MEA, Stolf HO, Candeias JMG, Silva MG, Costa ALB, Matsuo CY, Miot HA. Detecção e genotipagem de papilomavírus humano em lesões de queratoacantoma solitário de pacientes imunocompetentes. *An Bras Dermatol*. 2007;82(1):35-40.