

# Detecção de HPV em amostras de mucosa oral em pacientes pediátricos

## *HPV detection in oral mucosa samples in pediatric patients*

Aline R. Gama; Marcos Antonio B. Carvalho Jr.; Isabela J. Wastowski; Stela O. Rodrigues; Maria Fernanda B. Souza; Lais S. Botacin; Melissa A. G. Avelino; Lilian Carla Carneiro

Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil.

### RESUMO

**Introdução:** A detecção do papilomavírus humano (HPV) auxilia os tratamentos para pacientes que apresentam manifestações clínicas e limita as consequências futuras para os que apresentam infecções assintomáticas. **Objetivos:** Avaliar a sensibilidade da reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de HPV em diferentes amostras. **Material e métodos:** Quarenta e nove amostras de pacientes pediátricos foram obtidas por esfoliação da mucosa oral com uma escova estéril. O ácido desoxirribonucleico (DNA) dessas amostras foi utilizado para detecção de HPV por PCR convencional e PCR em tempo real (qPCR). **Resultados:** Das 49 amostras, oito eram de pacientes clinicamente diagnosticados com papilomatose laríngea; porém, tanto na PCR convencional quanto na qPCR, apenas uma amostra apresentou amplificação do fragmento esperado. **Discussão:** Esses resultados sugerem que o tipo de amostra, a metodologia empregada na coleta, a metodologia de extração empregada, a localização anatômica da lesão e os oligonucleotídeos utilizados influenciam fortemente a sensibilidade da detecção de HPV por PCR. **Conclusão:** Mais estudos são necessários para determinar as melhores técnicas de coleta e processamento das amostras a fim de que a detecção de HPV por PCR seja mais eficiente.

**Unitermos:** papiloma; reação em cadeia da polimerase; *primers* do DNA; biópsia.

### ABSTRACT

**Introduction:** The human papillomavirus (HPV) detection favors treatments for patients with clinical manifestations and limits future consequences for those with asymptomatic infections. **Objectives:** Therefore, the present study aimed to evaluate the sensitivity of polymerase chain reaction (PCR) for HPV detection from oral mucosa samples, of asymptomatic patients and patients with clinical manifestations of laryngeal papillomatosis. **Material and methods:** A total of 49 pediatric patient samples were obtained by exfoliation of the oral mucosa with a sterile brush. The deoxyribonucleic acid (DNA) samples was extracted and used for HPV detection, using GP5 and GP6 oligonucleotides, by conventional PCR and qPCR reactions. **Results:** Among the 49 samples, eight were from patients clinically diagnosed with laryngeal papillomatosis, but in both conventional PCR and qPCR technic, only one sample had presented positivity. **Discussion:** These results suggest that the sample type, the methodology used to collect, the extraction methodology used, the anatomical location of the lesion and the oligonucleotides used; all factors strongly influence the sensitivity of HPV detection by PCR methodology. **Conclusion:** Thus, more studies are needed to better determine the sample collection, and the processing techniques present more reproducibility on PCR detection.

**Key words:** papilloma; polymerase chain reaction; DNA primers; biopsy.

## RESUMEN

**Introducción:** El virus del papiloma humano (VPH) ayuda los tratamientos de pacientes que presentan manifestaciones clínicas y limita las consecuencias futuras para aquellos con infecciones asintomáticas. **Objetivos:** Evaluar la sensibilidad de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar VPH en diferentes muestras. **Material y métodos:** Cuarenta y nueve muestras de pacientes pediátricos se obtuvieron por exfoliación de la mucosa oral con un cepillo estéril. Se utilizó el ácido desoxirribonucleico (ADN) de esas muestras para detectar VPH por PCR convencional y PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). **Resultados:** Entre las 49 muestras, ocho eran de pacientes clínicamente diagnosticados con papilomatosis laríngea; sin embargo, tanto en la PCR convencional como en la qPCR, sólo una muestra presentó amplificación del fragmento esperado. **Discusión:** Eses resultados sugieren que el tipo de muestra, el método empleado en la recolección, el método de extracción, la ubicación anatómica de la lesión y los oligonucleótidos utilizados influyen fuertemente la sensibilidad de detección de VPH por PCR. **Conclusión:** Se necesita mayor investigación para determinar las mejores técnicas de recolección y procesamiento de muestras para que la detección de VPH por PCR sea más eficiente.

**Palabras clave:** papiloma; reacción en cadena de la polimerasa; cartilla de ADN; biopsia.

## INTRODUÇÃO

Caracterizado como um vírus ácido desoxirribonucleico (DNA), o papilomavírus humano (HPV) pode causar o desenvolvimento de diferentes tipos de lesões que afetam a pele e as membranas mucosas. Cerca de 13 tipos de HPV, entre os mais de 150 já descritos, estão associados à ocorrência de várias neoplasias, destacando-se aquelas que acometem regiões ginecológicas e cervicais<sup>(1)</sup>.

A papilomatose laríngea também é uma das apresentações da infecção por HPV, que se manifesta tanto na infância quanto na idade adulta, sendo mais prevalente no primeiro grupo. Sua incidência é estimada em 4,3 casos por 100 mil crianças nos Estados Unidos<sup>(2)</sup>. A doença pode se apresentar em várias formas, sendo classificada em agressiva (necessidade de 10 ou mais procedimentos cirúrgicos, três ou mais dentro de um ano, ou extensão distal para a subglote) e não agressiva (necessidade de menos de 10 procedimentos, com menos de três sendo executados dentro de um ano, e sem envolvimento distal)<sup>(3)</sup>.

As manifestações mais comuns são aquelas com lesões verrucosas ou papilomatosas de crescimento progressivo, que podem levar ao risco iminente de obstrução das vias aéreas. Elas geralmente são causadas pelos tipos 6 e 11 do HPV. Em alguns pacientes, pode ocorrer remissão espontânea das lesões. Em outros casos, as lesões podem sofrer transformação maligna (1%-4%)<sup>(4)</sup>.

A via de transmissão do HPV ainda não é completamente compreendida, mas as transmissões sexual e não sexual são reconhecidas, inclusive a forma vertical, especialmente durante o parto. A contaminação ocorre até em filhos de mães sem história prévia ou atual de papilomas genitais<sup>(5)</sup>.

Embora as implicações clínicas da infecção por HPV em crianças sejam conhecidas, há poucos estudos epidemiológicos sobre a prevalência do tipo viral na população pediátrica. Tais estudos são extremamente relevantes, uma vez que há alta incidência de HPV na população sexualmente ativa e, conseqüentemente, forte possibilidade de uma transmissão vertical estimada em 50%-83,3% de mães infectadas. Embora haja um grande número de crianças infectadas, somente cerca de 2% delas desenvolve papilomatose laríngea ou outra implicação clínica, levando ao entendimento de que há uma enorme quantidade de pacientes pediátricos assintomáticos<sup>(6)</sup>.

Dada a relação crescente entre HPV e a população pediátrica, a detecção desse vírus amplia a efetividade dos tratamentos para pacientes com manifestações clínicas e limita as conseqüências futuras para aqueles com infecções assintomáticas, aumentando tanto a sobrevida quanto a qualidade de vida desses pacientes<sup>(7)</sup>. Desse modo, é importante estabelecer metodologias acessíveis e confiáveis de coleta e rastreamento de HPV. Nesse cenário, se destaca a reação em cadeia da polimerase (PCR), considerada a técnica mais sensível de detecção do DNA viral e, portanto, um excelente método de identificação do HPV em tecidos humanos<sup>(8)</sup>.

Embora a PCR seja uma técnica altamente eficiente de detecção do HPV, o sucesso desse procedimento depende do local da lesão, da presença ou ausência de queratinização e do método usado para coletar a amostra. Um dos métodos mais comumente utilizados é a biópsia, pois esse material possibilita a recuperação de células presentes na camada basal, onde o HPV em geral está na sua forma latente. Entretanto, executar a biópsia depende da presença de um médico e instrumentos cirúrgicos próprios, o que torna esse método relativamente caro e inacessível a algumas

unidades de saúde. Nessa situação, o uso de escovas de coleta e suabes torna a retirada de células das mucosas mais acessível e é uma boa alternativa para obter a concentração de DNA sem procedimentos invasivos<sup>(8,9)</sup>.

## OBJETIVOS

---

Esse estudo teve como objetivo avaliar a sensibilidade da PCR para a detecção de HPV em amostras de mucosa oral de pacientes pediátricos e pacientes com papilomatose laríngea.

## MATERIAL E MÉTODOS

---

### Pacientes

Foi realizado um estudo molecular com 49 amostras obtidas de crianças, de até 12 anos, em tratamento e acompanhamento no ambulatório de otorrinolaringologia da Universidade Federal de Goiás (UFG), Hospital das Clínicas, Goiânia, Goiás, Brasil. Dois grupos de indivíduos foram avaliados: pacientes com papilomatose laríngea clinicamente diagnosticada e pacientes com outras condições clínicas não associadas à infecção por HPV.

O critério de inclusão no estudo foi: ter até 12 anos de idade no momento da coleta. Os critérios de exclusão foram: pacientes imunizados contra HPV, pacientes acima de 12 anos de idade no momento da coleta. O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da UFG, sob o número de protocolo 016/2017. O termo de consentimento informado foi obtido por todos os responsáveis dos pacientes estudados.

### Coleta e processamento de amostras

Para a detecção molecular de HPV, as amostras foram coletadas pela esfoliação da mucosa bucal, com o uso de uma escova estéril. Em um dos pacientes, a amostra foi coletada diretamente pela esfoliação da lesão. Depois da coleta, as amostras foram armazenadas a aproximadamente 4°C por no máximo três dias até o processamento.

### Detecção molecular

O DNA das amostras das escovas foi extraído usando o *kit* de extração de DNA PureLink Genomic (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA), seguindo recomendações do fabricante. Após a extração, o DNA foi armazenado a aproximadamente -20°C até o processamento.

A detecção da sequência do HPV foi realizada por PCR convencional e PCR quantitativa (qPCR) usando os *primers* GP5+ (5'-TTTGTACTGTGGTAGATACYAC-3') e GP6+ (5'-GAAAAATAAACTGTA AATCATATTC-3'), amplificando um fragmento de 150 pb do gene altamente conservado L1 HPV<sup>(10)</sup>. As reações de PCR convencional foram realizadas em um termociclador (MJ Research, Inc., Quebec, Canadá), de acordo com metodologia padronizada por Venceslau *et al.* (2014)<sup>(11)</sup>, com algumas modificações. A reação continha 1 µl de desoxirribonucleotídeos fosfatados (DNTP) (20 µM); 0,4 µl de Taq DNA Polimerase HotStart (5 U); 5 µl de MgCl (50 mM); 2 µl de cada *primer* (10 mM); 10 µl de cada amostra e água Milli-Q (Millipore) para completar um volume final de 50 µl. As condições dessa PCR foram: desnaturação inicial por um minuto a 95°C, seguida de 30 ciclos de desnaturação por 30 segundos a 95°C, anelamento por 30 segundos a 48°C e extensão por três minutos a 72°C e uma extensão final por dois minutos a 72°C. Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com Blue Green Loading Dye (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil) e fotografados em um fotodocumentador.

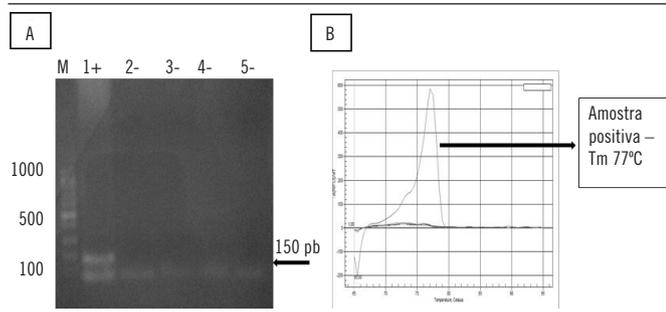
As reações de qPCR foram realizadas em um termociclador iQ5 (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, EUA), usando 4 µl de Hot FirePol (5 X); 0,4 µl de cada *primer* (10 pMol); 1 µl de cada amostra (4 ng/µl) e água Milli-Q para completar um volume final de 20 µl. As condições para essa qPCR foram: uma ativação inicial por 12 minutos a 95°C, seguida de 40 ciclos de desnaturação por 15 segundos a 95°C, anelamento por 30 segundos a 60°C e extensão por 30 segundos a 72°C. Ao final dos ciclos, as amostras foram submetidas à análise de dissociação a 65°C-95°C. Após a conclusão da reação, os arquivos gerados foram visualizados no programa do equipamento. Amostras com temperaturas de fusão (T<sub>m</sub>) próximas a 80°C foram consideradas positivas<sup>(12)</sup>.

## RESULTADOS

---

Entre as 49 amostras, 41 foram de pacientes assintomáticos e oito amostras foram de pacientes com diagnóstico clínico de papilomatose laríngea. O DNA do HPV foi detectado em só uma amostra em oito que foram extraídas de pacientes sabidamente com lesão. Essa detecção foi realizada tanto por PCR convencional quanto por qPCR. A amostra positiva foi a única entre as outras que foi coletada por esfoliação da própria lesão causada por papilomatose laríngea, sugerindo assim que a presença da lesão e o procedimento de coleta são cruciais para a detecção do DNA do HPV por PCR. A **Figura 1A** mostra a eletroforese em gel de agarose, onde podemos observar a presença de um fragmento de 150 pb correspondente à amplificação esperada.

A reação qPCR, executada com as mesmas amostras que a PCR convencional, gerou uma curva de dissociação, apresentando uma amostra positiva única com  $T_m$  igual a  $77^\circ\text{C}$ , correspondente à  $T_m$  específica dessa amplificação (**Figura 1B**).



**FIGURA 1** – A) eletroforese em gel de agarose; B) curva de dissociação do HPV obtida por amplificação da região de L1 flanqueada pelos primers GP 5+ e GP 6+

M: marcador de peso molecular; 1: amostra positiva; 2 a 5: amostras negativas; HPV: papilomavírus humano.

## DISCUSSÃO

O método empregado na coleta do material para a detecção de DNA do HPV por PCR é decisivo na efetividade desse procedimento. Esse fato foi observado em nosso estudo, já que só foi possível detectar o DNA do HPV na amostra coletada diretamente da lesão. Castro e Filho<sup>(13)</sup> observam que mesmo usando técnicas sensíveis como a PCR, a taxa de detecção pode variar de 0% a 100%. Eles mencionam que a ampla diferença entre os resultados pode ser atribuída a erros no momento da coleta e ressaltam a grande dificuldade em detectar HPV em amostras de suabes e biópsia.

Diferentes taxas de detecção de DNA de HPV por PCR são observadas em estudos recentes. Essa diferença sugere uma variação na habilidade de amplificar fragmentos de DNA de diferentes tamanhos e tipos específicos de HPV, além de poder estar ligada aos tipos de materiais utilizados (esfregão, material congelado ou incluído em parafinado), a localização anatômica do ferimento, questões populacionais e desenho dos oligonucleotídeos<sup>(11)</sup>.

Tristão *et al.* (2012)<sup>(14)</sup> realizaram a detecção de HPV por PCR convencional em 125 amostras de raspados de mucosa oral coletadas com o uso de uma escovinha Campos de Paz, e o DNA viral foi encontrado em somente 29 amostras (23,2%). Segundo

os autores, as amostras foram extraídas de homens e mulheres escolhidos aleatoriamente.

Em outro estudo, os pesquisadores acharam uma porcentagem de amostras positivas semelhante à mencionada, mas para extração de DNA, eles não usaram suabes ou escovas, mas tumores em blocos de parafina, coletados de pacientes com diagnóstico histológico de carcinomas de células escamosas da cavidade bucal e da orofaringe. Dos 82 tumores extraídos, 21 (25,6%) tinham DNA de HPV<sup>(15)</sup>. Esse resultado sugere que a taxa de DNA viral obtido da coleta de células com escovas ou suabes está muito próxima daquela obtida por exame direto das amostras de biópsia<sup>(9)</sup>.

A obtenção de uma única amostra positiva em nosso trabalho ainda pode se justificar pelo uso de um *kit* comercial de extração de DNA viral. Abrão *et al.* (2005)<sup>(9)</sup> fizeram uma comparação entre extração de DNA de células da mucosa bucal, usando NaCl e *kit* comercial de extração, e observaram que o DNA obtido por extração com o *kit* tinha melhor qualidade, mas concentração mais baixa, e maiores volumes foram necessários para reações de PCR realizadas. De acordo com os autores, o *kit* comercial de extração apresenta custo mais alto, menor rendimento e tempo mais longo de execução que a extração com NaCl. O uso de extração de DNA das células de mucosas, usando NaCl, pode ser uma opção para aumentar a concentração de DNA obtido nas amostras deste estudo, possibilitando assim a detecção viral de DNA.

## CONCLUSÃO

O presente estudo mostra que o uso da PCR convencional e da qPCR para a detecção de HPV em amostras de pacientes pediátricos assintomáticos, com papilomatose laringea avaliada clinicamente, teve baixa sensibilidade. O tipo de amostra coletada ou ainda o *kit* de extração de DNA usado tem potencial para interferir nos resultados obtidos. Estudos adicionais são necessários para determinar uma técnica de coleta e extração de DNA que torne a detecção por PCR mais eficiente.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos.

## REFERÊNCIAS

1. Instituto Nacional de Câncer (Inca). Programa nacional de controle do câncer de colo uterino. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer; 2016.
2. Derkay CS. Recurrent respiratory papillomatosis. *Laryngoscope*. 2001; 111(1): 57-69.

3. Doyle DJ, Henderson LA, Lejeune FE, Miller RH. Changes in human papillomavirus typing of recurrent respiratory papillomatosis progressing to malignant neoplasm. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1994; 120(11): 1273-76.
4. El Achkar VNR, Duarte A, Carlos R, et al. Histopathological features of juvenile-onset laryngeal papillomatosis related to severity. *Head Neck.* 2019; 41(5): 1412-17.
5. Syrjanen S. Current concepts on human papillomavirus infections in children. *Apmis.* 2010; 118(6-7): 494-509.
6. Merckx M, Arbyn M, Meys J, Weyers S, Temmerman M, Broeck DV. Transmission of carcinogenic human papillomavirus types from mother to child: a meta-analysis of published studies. *Eur J Cancer Prev.* 2013; 22(3): 277-85.
7. Giuliano AR, Nedjai B, Lorincz AT, et al. Methylation of HPV 16 and EPB41L3 in oral gargles: associations with oropharyngeal cancer detection and tumor characteristics. *Int J Cancer.* 2019; 146(4): 1018-30.
8. Marques MPC, Bussoloti Filho I, Rossi LM, Andreoli MA, Cruz NO. Comparative study between biopsy and brushing sampling methods for detection of human papillomavirus in oral and oropharyngeal cavity lesions. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2015; 81(6): 598-603.
9. Abrão MG, Billerbeck AEC, Nishi MY, Marui S, Mendonça BB. Padronização da técnica de extração de DNA de células de mucosa oral com NaCl: aplicação no estudo do gene PROP1. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2005; 49(6): 978-82.
10. Jacobs MV, Husman AMR, van den Brule AJ, Snijders PJ, Meijer CJ, Walboomers JM. Group-specific differentiation between high- and low-risk human papillomavirus genotypes by general primer-mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes. *J Clin Microbiol.* 1995; 33(4): 901-5.
11. Venceslau EM, Bezerra MM, Lopes ACM, et al. HPV detection using primers MY09/MY11 and GP5+/GP6+ in patients with cytologic and/or colposcopic changes. *J Bras Patol Med Lab.* 2014; 50(4): 280-5.
12. Cubie HA, Seagar AL, McGoogan E, et al. Rapid real time PCR to distinguish between high risk human papillomavirus types 16 and 18. *Mol Pathol.* 2001; 54(1): 24-9.
13. Castro TPPG, Bussoli Filho I. Prevalence of human papillomavirus (HPV) in oral cavity and oropharynx. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2006; 72(2): 272-81.
14. Tristão W, Ribeiro RMP, Oliveira CA, Betiol JC, Bettini JSR. Estudo epidemiológico do HPV na mucosa oral por meio de PCR. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2012; 78(4): 66-70.
15. Petito G, Carneiro MAS, Santos SHR, et al. Human papillomavirus in oral cavity and oropharynx carcinomas in the central region of Brazil. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2017; 83(1): 38-44.

#### AUTOR CORRESPONDENTE

---

Aline Rodrigues Gama  0000-0003-2167-3872  
e-mail: alinerodriguesgama15@gmail.com



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.