

Segunda-feira, 4 de dezembro de 2006.
Profa. Sônia.

HPVs – Papillomavirus humanos

Esses vírus foram reconhecidos como causas de cânceres humanos, especialmente de câncer de cérvix-uterina.

Introdução

- Anualmente → mais de 10 milhões de novos casos de câncer.
- 15% dos cânceres em gerais → são causados por agentes infecciosos.
- Desses 15% → 30% são causados por HPV.
- Outros agentes são: 60% → HBV, HCV e *Helicobacter pylori* (causa câncer de estômago).
- Infecções por HPV incidem amplamente e ocorrem por todo o mundo.
- HPV infectam pele e mucosas → formação de tumores benignos e malignos (homens e mulheres).

Os vírus são espécie-específicos: não há transmissão de um animal para outro e os vírus que infectam homens não são adquiridos de outros animais.

Características gerais dos HPVs

- Família: Papillomaviridae
- Gêneros humanos:
 - Alphapapillomavirus
 - Betapapillomavirus
 - Gamapapillomavirus
- Não há técnicas adequadas para cultivo desses vírus, ou seja, dificilmente crescem in vitro. Por isso sua classificação não é baseada em Antígenos (como no caso da dengue) e sim a partir das seqüências de nucleotídeos do genoma.
- HPV: pequenos, 7900 pb, DNA df, circ., sem envelope.
- Os capsômeros possuem as proteínas:
 - L1 (late): principal proteína do capsídeo utilizada para produção de vacina.
 - L2= proteína secundária.

O vírus

- Nem sempre causam tumores e podem gerar infecções persistentes em pele e mucosas.
- HPVs → com mais de 100 genótipos.
- Mais de 40 infectam o trato anogenital.
- A classificação do HPV em tipos (ou genótipos) é realizada pela comparação da seqüência de nucleotídeos das regiões específicas do genoma.
- Novo genótipo de HPV → precisa ser pelo menos 10% diferente em L-1. Ou seja, um HPV tem que ter no máximo 90% de semelhança com outro vírus HPV para ser considerado um novo genótipo.
- Genoma
 - Epissoma no núcleo (células sem alterações morfológicas).
 - Integrado ao genoma da célula hospedeira (algumas lesões de baixo grau e maioria de alto grau – câncer).
 - HPV é difícil de cultivar e seu genoma contém três potentes (???)

Modo de transmissão

- Necessita-se de microtraumas, mais freqüentemente em pele ou mucosas. O vírus não penetra em pele ou mucosa íntegras. Isso porque precisam alcançar as células basolaterais do epitélio.
- Verrugas (papiloma benignos) cutâneas → microtraumas
 - Pessoa x pessoa
 - Pessoa x superfícies
 - Facilidade: Aumento das partículas virais na verruga plantar.
- Verrugas plantares → caminhar descalço.
- Coçadura → auto-inoculação.
- Oral → morder verrugas.
- Lesões anogenitais → sexualmente.

- Lesões anogenitais → Microtraumas.
- Papilomatose respiratória → infecção perinatal.
 - Geralmente durante o parto.
 - As lesões podem ser grandes e obstruir o trato respiratório causando óbito, principalmente em crianças.

Genoma viral

Existem variações entre os cerca de 82 tipos de papillomavirus, mas nem todos causam infecções produtivas.

Apenas uma fita codifica genes importantes.

Existe uma região promotora (LCR) que promove ativação de outros genes para promover suas expressões e produzir as proteínas que eles codificam, mas ela em si não codifica proteínas.

São 10 genes: 2 não são representados porque não se conhecem suas funções (E3 e E8).

E (de inicial, precoce ou early): na realidade existem oito genes precoces, representados apenas 6 porque como foi dito não se conhecem as funções de E3 e E8.

L (tardios): L1 e L2 do do capsídeo viral.

Chama-se atenção de dois na parte superior da figura:

E6 e E7 que possuem uma atividade mais intensa e são chamados de oncogenes do vírus, ou seja, vão facilitar a transformação celular (levar à malignidade). Eles são controlados pelo E2 que fica bem distante. Durante a fase de malignidade esse gene E2 é quebrado e assim, os outros dois ficam livres para atuar.

Funções das proteínas precoces e tardias do HPV

E1: replicação do DNA, manutenção do plasmídeo e controle da transcrição.

E2: auxílio na replicação e controle da transcrição. Atua na expressão de E5.

E3: função desconhecida.

E4: associação à citoqueratina, levando ao seu colapso.

E5: atividade transformante, aumenta o sinal de transdução para fatores de crescimento celular.

E6: atividade transformante: se associa à p53, reduzindo seus níveis.

E7: Atividade transformante: se associa à pRB, liberando fator de transcrição.

Saber L1 e E6 e E7... continuar no slide

Ciclo de replicação viral

Não estão esclarecidos os receptores para esses vírus, acreditando-se ser o heparan sulfato.

Eles provavelmente entram na célula por uma endocitose (também não esclarecido) e, uma vez dentro desta, liberam o DNA que vai para o núcleo. Ou seja, sua replicação ocorre no núcleo com características específicas e complicadas.

Replica-se a fita de DNA viral e transcreve-se RNAm para algumas proteínas importantes.

Normalmente a infecção ocorre na parte mais superficial da célula, nas camadas basais.

Durante a divisão celular, o DNA circular como epissomas fica dentro do núcleo mas não se integra ao DNA da célula. Em condições adequadas passam para as células da camada superficial e formam os virions que serão liberados na parte superficial do epitélio: pode-se localizar o vírus a partir de Microscopia Eletrônica ou por técnicas sensíveis que detectam o genoma viral.

Difícil cultivo.

Necessidade de genes de células indiferenciadas.

Ligação a grande número de tipos celulares.

A ligação se faz pela proteína L1 do capsídeo viral.

Não há evidência de infecção lítica (não causa lise, e a infecção é persistente).

Liberção de partículas... continuar no slide

HPV

Imagem descreve essas etapas.

Microtrauma para entrada da partícula viral: seja na mucosa genital ou em outras localizações. O vírus localiza-se na camada basal e durante um tempo mostra-se presente do núcleo da célula. Inicialmente não promove alterações visíveis, mas com o tempo essas células podem apresentar alterações morfológicas e intracelulares. O vírus ascende nas camadas até que chega no momento em que pode produzir uma anomalia, momento em que as partículas virais podem ser eliminadas.

Estágios das lesões escamosas intraepiteliais

HSIL: de alto grau.

LSIL: de baixo grau.

Em geral a evolução é lenta e parte de lesões de displasias baixas, moderadas até lesões severas (pré-cancer). A seguir, forma-se o carcinoma in situ quando as células já sofreram modificações severas. Chega um momento que esse carcinoma pode invadir e alcançar linfonodos (metástase).

Imagem mostrando a evolução

Evolução de acordo com a faixa etária. Normalmente o contato com esses vírus é adquirido pelo sexo feminino após o início da atividade sexual. 15 anos é o mais provável. Até os 20 e poucos anos é detectado o vírus em altas concentrações (PCR e hibridização in situ). Essas técnicas mostram também que o vírus diminui e se estabiliza em títulos mais baixos (infecção persistente). Em uma pequena porcentagem existe a evolução para o pré-cancer que normalmente ocorre em maior proporção ao redor dos 30 anos. Também já há possibilidade de uma modificação mais séria, que conduziria ao carcinoma.

Mecanismo proteína E6

A p53 é inativada pela proteína E6. Em geral essa p53 está em baixos níveis numa célula normal, controlando e evitando uma transformação celular. Quando existe dano ao DNA ela aumenta em quantidade, evitando a formação de tumores. Entretanto, a proteína E6 se liga à p53 e faz com que ela não atue mais. Lembre-se que existe a E6 de alto risco e a de baixo risco. E6 de alto risco está presente no HPV16 que responde por mais de 50% dos casos de câncer e também no HPV18. HPV16 e HPV18 são também os mais freqüentes.

Mecanismo proteína E7

A E7 se liga à proteína do retinoblastoma e forma um complexo que inativa a função dessa proteína. Com isso facilita o aumento dos fatores de crescimento celular, aumenta transcrição de vírus, etc.

HPV

Imagem.

Porque em todas as pessoas não existe evolução para câncer?

Reconheceu-se que a imunidade celular é extremamente importante para controlar a infecção. Indivíduos sem resposta celular, mais facilmente evoluem para câncer (constatação). Na entrada do vírus, se houver anticorpo para L1, ele pode se ligar ao vírus e impedir a conexão do vírus à células hospedeiras (mecanismo da vacina).

A resposta celular pode impedir o câncer, mas pode não eliminar o vírus.

Fatores de risco

- **Tipo de vírus:** de alto risco e de baixo risco. Estes últimos geralmente não levam a câncer.
- **Carga viral:** quando a carga viral é alta, o risco parece que é maior. Alguns trabalhos não conseguem mostrar isso: alguns indivíduos com carga viral alta não evoluíram para câncer e os com carga baixa evoluíram.

Não referentes ao vírus:

- Quanto mais cedo iniciada a atividade sexual, maior o risco.
- Número de parceiros: quando maior, maior o risco.
- Presença de substâncias mutagênicas: como o tabagismo.
- Outras infecções genitais: bactérias ou vírus (herpes simples) que causam infecções genitais ou da pele que facilitam a penetração do vírus.
- Hormônios: hormônios contraceptivos aumentam o risco (alguns trabalhos demonstram isso). O período pós-menopausa trás alterações que podem ser fatores de risco.
- Indivíduos com imunossupressão: transplantados e imunodeprimidos.
- Predisposição genética: não muito bem comprovada.

Síndromes clínicas

- Infecções do trato genital:
- As síndromes de menor risco constituem o condiloma (tumor em mucosa) acuminado o qual o mais reconhecido é o genital.
- Papiloma (tumor na pele).
- As verrugas plantares costumam ser dolorosas.

Métodos diagnóstico

- **Exame físico:** reconhecimento das lesões.
- **Citologia:** teste de Papanicolau pensando-se nas lesões genitais.
- **Biópsia:** normalmente retira-se um fragmento de tecido de 5mm que é mandado para o laboratório.
- **Colposcopia.**
- **PCR:** extremamente sensível, detecta o DNA viral.
- **Hibridização in situ/Dot blot/Southern blot**
- **Captura híbrida:** junto com PCR são as mais sensíveis.

Slides...

- **Citologia**

Presença dos coilocitos: células evidenciadas na camada mais superficial (daí o papanicolau). São patognômicos para infecção de HPV (não quer dizer câncer). Nem sempre as pessoas infectadas tem essas células. Mas quando elas estão presentes indicam presença do vírus.

Exibem uma vesícula intracelular com halo que envolve o núcleo. Essa área fica bem mais clara do que o restante do citoplasma. Parece que essa vesícula expreme o citoplasma contra a membrana.

- **Colposcopia**

O colposcópio é como se fosse um microscópio que aumenta a imagem 10 a 40X e permite que o ginecologista veja o que não consegue enxergar a olho nu. Assim, permite analisar algo que o médico considera suspeito. Utiliza-se o espelho.

- **Biópsia**

Permite observação também dos coilocitos.

- **Hibridização in situ**

Utiliza-se um substrato+ corante + sonda genética para os tipos de HPV (as sondas mais frequentes são para os tipos mais frequentes e de maior risco). Detectam o HPV em um tecido. É importante para detectar se o tipo de vírus é malignizante e tranquilizar o paciente, por exemplo.

- **Imunocitoquímica**

Parecida com a hibridização, mas ao invés de uma sonda genética utiliza-se um anticorpo.

- **PCR**

Amplificação do DNA presente na amostra.

Sensibilidade é muito boa.

Importante porque permite a tipagem do vírus: 16, 14, 11 porque detecta seqüências de nucleotídeos presentes no genoma.

- **Captura híbrida**

Depois do PCR é a técnica mais sensível.

Importante porque detecta a presença do DNA viral com bastante sensibilidade.

Digere-se o DNA do vírus que a seguir é ligado a um RNA com o que qual se hibridiza. Existe um anticorpo para o híbrido que pode depois ser detectado com uma técnica parecida com a técnica de ELISA.

Tratamento

Não existe nenhuma droga antiviral até porque nem se conseguiu crescimento do vírus para testes.

- **Verrugas comuns:**

Crioterapia.

Agentes cáusticos.

- **Papiloma laringe:**

Laser.

- **Verruga genital:**

Crioterapia.

Podofilina.

Laser.

Eletrocauterização.

- **Lesões limitadas à ectocérvice:**

Crioterapia

Laser

Eletrocauterização

- **Carcinoma invasivo**

Cirurgia

Tratamento

- Nenhum é superior, depende de cada caso.
- **Verrugas comuns:** geralmente não precisam de tratamento a não ser por razões estéticas. Evoluem para cura em 1 a 2 anos (50%).
Crioterapia – citólise térmica.
Agentes cáusticos (ácido ???)
- **Verrugas genitais:**
Crioterapia
Podofilina – método químico.
Laser
Eletrocauterização – descargas elétricas. Requer cuidado quando a lesão é intravaginal e/ou vulvar quando não é feita.
- **Carcinoma invasivo**

Prevenção

- **Higiene:** para transmissão iatrogênica.
- **Preservativo:** para transmissão sexual. É um método limitado e nem sempre dá proteção suficiente porque podem haver lesões fora da área coberta pelo preservativo.
- **Vacina:**
Existem duas vacinas: uma em fase final e outra em junho já foi liberada para uso nos EUA.
Esta vacina já liberada é extremamente cara: deve-se dar três doses IM no período de 6 meses. Cada dose deve custar em média 600 dólares.
Como o problema mais sério da infecção pelo HPV é o câncer, ela deveria ser dada principalmente ao sexo feminino, na fase de pré-puberdade quando não há infecção. Posteriormente, poderia ser estendida ao sexo masculino.
Não resolve o problema porque é uma vacina bastante cara e assim não vai impedir a disseminação.

Essas vacinas são baseadas em uma partícula semelhante ao vírus (VLP-L1): ela é vazia e só possui capsídeo. Só possui L1: a idéia é produzir uma resposta de anticorpos específicos contra essa proteína L1 que fornece ligação às células hospedeiras.

Se a vacina é intramuscular como vai proteger a mucosa genital?

Ocorre transudação (microfiltração dos vasos sanguíneos) que permite que os anticorpos passem para a mucosa genital. Poderia impedir a infecção inicial na genitália.
Talvez isso não seja suficiente e sejam necessárias outras vacinas que incluam outras subunidades do vírus para melhorar a eficácia.

Como o vírus é espécie específico os testes da vacina não podem ser feitos em animais ou in vitro e isso aumenta a dificuldade.