

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

THAIZ FERNANDES

**COMPARAÇÃO DOS TESTES *LINEAR ARRAY HPV GENOTYPING*<sup>®</sup> E *COBAS HPV TEST*<sup>®</sup> PARA DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) DE ALTO RISCO ONCOGÊNICO EM MULHERES EM IDADE REPRODUTIVA**

CURITIBA

2018

THAIZ FERNANDES

**COMPARAÇÃO DOS TESTES *LINEAR ARRAY HPV GENOTYPING*<sup>®</sup> E *COBAS HPV TEST*<sup>®</sup> PARA DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) DE ALTO RISCO ONCOGÊNICO EM MULHERES EM IDADE REPRODUTIVA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Camila Marconi.

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas.  
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Fernandes, Thaiz

Comparação dos testes *Linear Array HPV Genotyping®* e *Cobas HPV Test®* para detecção e genotipagem do papilomavírus humano (HPV) de alto risco oncogênico em mulheres em idade reprodutiva. / Thaiz Fernandes. – Curitiba, 2018.

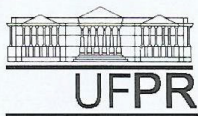
74 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Camila Marconi

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Virus do papiloma 2. Testes de DNA para Papilomavírus Humano 3. Diagnóstico I. Título II. Marconi, Camila III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 616.0194



Ministério da Educação  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**  
**SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
Departamento de Patologia Básica  
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

**“COMPARAÇÃO DOS TESTES *LINEAR ARRAY*<sup>®</sup> *HPV GENOTYPING E COBAS*<sup>®</sup> *HPV TEST* PARA DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DO PAPILOMAVIRUS HUMANO (HPV) EM MULHERES IMUNOCOMPETENTES”**

por

**Thaiz Fernandes**

**Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos professores:**

**Profa. Dra. Camila Marconi – Presidente**

**Profa. Dra. Márcia Guimarães da Silva**

**Profa. Dra. Keite Nogueira**

**Curitiba, 28 de fevereiro de 2018.**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA BÁSICA  
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Parasitologia e Patologia

## DECLARAÇÃO

Declaro para devidos fins que a dissertação de mestrado da aluna Thaiz Fernandes, portadora do CPF 088.726.689-48, do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Parasitologia e Patologia, é intitulada COMPARAÇÃO DOS TESTES LINEAR ARRAY HPV GENOTYPING® E COBAS HPV TEST® PARA DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) DE ALTO RISCO ONCOGÊNICO EM MULHERES EM IDADE REPRODUTIVA”, em substituição ao título anterior “COMPARAÇÃO DOS TESTES LINEAR ARRAY HPV GENOTYPING® E COBAS HPV TEST® PARA DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM MULHERES IMUNOCOMPETENTES”. Declaro ainda que tal substituição foi realizada para melhor adequação ao trabalho, segundo avaliação da banca examinadora.

Curitiba, 23 de março de 2018.

*Camila Marconi*

---

**Profa. Dra. Camila Marconi**  
*Presidente da Banca Examinadora*  
*Departamento de Patologia Básica*  
*Universidade Federal do Paraná*

*Aos meus pais, Adauto e Maria Judith.*

Palavras nunca serão suficientes para expressar o amor que sinto por vocês. Sempre me apoiando e estando presentes. Se estou aqui hoje é por causa de vocês.

*Aos meus irmãos, Antonio Marcos e Cristiano.*

Pelos conselhos, pelo exemplo e por sempre quererem meu bem.

*Aos meus familiares e amigos.*

Angela, Dayane, Gislaine, Lucinete e todos que estão no meu coração.

*As minhas crianças.*

Arthur, Laura e Miguel.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus.

Aos meus pais e minha família, por todo o amor, educação, apoio e companheirismo. Obrigada por sempre estarem presentes e por muitas vezes compreenderem a minha ausência.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Camila Marconi, um exemplo de pessoa e profissional. Obrigada por me orientar nesse trabalho, além de acreditar e confiar em mim.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Aos funcionários, amigos e colegas do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia da Universidade Federal do Paraná.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Guimarães da Silva, por ter aberto as portas do Laboratório de Imunopatologia da Relação Materno Infantil da Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP para mim.

Aos meus amigos e colegas do Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP. Especialmente a Carolina, Juliano, Gabriel, Larissa, Nathália, Aline e a Bruna, obrigada pelos ensinamentos e por me ajudarem na coleta e nas análises das amostras.

À Carolina Sanitá Tafner Ferreira, por ter me recebido e me acolhido tão bem nas minhas idas a Botucatu/SP.

Aos funcionários do Laboratório de Patologia do Hospital do Câncer de Barretos, Barretos/SP.

Aos funcionários das Unidades Básicas de Saúde (UBS) em Botucatu/SP.

Aos funcionários do Serviço e Orientação de Prevenção do Câncer (SOPC) em Bauru/SP.

A todas as mulheres que aceitaram a participar desse estudo. Meus sinceros agradecimentos.

E por fim, a todas as pessoas que me ajudaram diretamente ou indiretamente na realização desse estudo.



*“Só há duas maneiras de viver a vida: a primeira é vivê-la como se os milagres não existissem. A segunda é vivê-la como se tudo fosse milagre”.*

Albert Einstein

## RESUMO

Atualmente são descritos cerca de 40 genótipos de Papilomavírus humano (HPV) que podem infectar a região anogenital. Tais vírus podem ser divididos em genótipos de alto risco, provável alto risco e baixo risco de acordo com o seu potencial de deflagrar o desenvolvimento de lesões intraepiteliais de alto grau e carcinomas invasivos no colo uterino. Com isso, torna-se fundamental a detecção e genotipagem do HPV para determinar quais mulheres estão em risco em desenvolver lesões HPV-induzidas. O *Linear Array HPV Genotyping*<sup>®</sup> (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA) é a técnica mais utilizada nas pesquisas científicas para detecção e genotipagem do HPV. Entretanto, na rotina diagnóstica a técnica mais utilizada para essa finalidade é o *Cobas HPV Test*<sup>®</sup> (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA). Assim, o objetivo desse estudo foi comparar as técnicas *Linear Array*<sup>®</sup> e *Cobas*<sup>®</sup> quanto a positividade de HPV de alto risco oncogênico em mulheres em idade reprodutiva. Trata-se de um estudo transversal que incluiu 162 amostras cervicais de mulheres que procuraram as Unidades Básicas de Saúde do município de Botucatu/SP, Brasil e do Serviço de Orientação e Prevenção do Câncer do município de Bauru/SP, Brasil. Dessas, amostras provenientes de 93 mulheres foram testadas pelas duas técnicas, 56 (60,2%) foram positivas para o *Linear Array*<sup>®</sup> e 29 (31,2%) foram HPV-positivas para o *Cobas*<sup>®</sup>. Das 27 amostras com resultados diferentes, 17 (63,0%) foram positivas para HPV de baixo risco e não são compreendidas na detecção pelo sistema *Cobas*<sup>®</sup>, essas foram consideradas como negativas para HPV de alto risco na comparação entre as técnicas. No entanto, as 10 (37,0%) amostras restantes foram positivas para HPV de alto risco, principalmente para “outros HPV de alto risco”, sendo consideradas discordantes. A partir disso, esse estudo confirmou a capacidade do *Linear Array*<sup>®</sup> em gerar mais resultados positivos para “outros HPV de alto risco” em comparação ao *Cobas*<sup>®</sup>. Dentre as mulheres HPV-positivas, o HPV-16 foi o genótipo mais prevalente pela técnica de *Linear Array*<sup>®</sup> e *Cobas*<sup>®</sup>, estando presente em 11 (28,9%) e 9 (31,0%) amostras respectivamente, resultando em um *kappa* de 0,8881. As duas técnicas apresentaram uma taxa de concordância de 89,2% com um valor de *kappa* de 0,7460, indicando uma concordância considerável. Dessa forma, o *Cobas*<sup>®</sup> apresentou uma alta taxa de concordância em relação ao *Linear Array*<sup>®</sup> e, portanto, pode ser considerado como teste empregado em rastreamento da população, tendo em vista seu menor custo e praticidade durante a execução da técnica.

Palavras-Chaves: HPV. Diagnóstico. *Linear Array HPV Genotyping*<sup>®</sup>. *Cobas HPV Test*<sup>®</sup>

## ABSTRACT

Approximately 40 Human Papillomavirus (HPV) genotypes that infect the anogenital region are currently described. These genotypes are classified as low-, probable high- and high-risk HPV according to their oncogenic potential of causing high grade squamous intraepithelial lesions and cervical carcinoma. HPV detection and genotyping is important to identify the women group at risk of developing HPV-induced lesions. The Linear Array HPV Genotyping<sup>®</sup> (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA) is a method of HPV detection and genotyping most used in scientific research. While the Cobas HPV Test<sup>®</sup> (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA) is a method most used in diagnostic routine to HPV detection and genotyping. Therefore, the objective of this study was to compare the Linear Array<sup>®</sup> and Cobas<sup>®</sup> techniques for high-risk oncogenic HPV positivity in women of reproductive age. This is a cross-sectional study that included 162 cervical samples from women attending the Primary Health Care Units in Botucatu/SP, Brazil and the Cancer Prevention and Orientation Service, in Bauru/SP, Brazil. A subset of 93 women included in the study had comparable results for both techniques, 56 (60.2%) were HPV-positive by Linear Array<sup>®</sup> and 29 (31.2%) were HPV-positive by Cobas<sup>®</sup>. Of the 27 samples with conflicting results, 17 (63.0%) were positive for low-risk HPV. Such genotypes are not detectable by Cobas<sup>®</sup> system, thus they were considered as negative for high-risk HPV when comparing both techniques. However, the 10 (37.0%) remaining samples were positive for high-risk HPV, mainly for “other high-risk HPV” and were considered discordant. Thus, this study confirmed the ability of the Linear Array<sup>®</sup> to generate more positive results for “other high-risk HPV” compared to Cobas<sup>®</sup>. Among HPV-positive women, HPV-16 was the most prevalent genotype by the Linear Array<sup>®</sup> and Cobas<sup>®</sup> technique, being present in 11 (28.9%) e 9 (31.0%) samples respectively, resulting in kappa value of 0.8881. The two techniques had a concordance rate of 89.2%, resulting a kappa value of 0.7460 indicating a considerable agreement. Thus, the Cobas<sup>®</sup> presented a high concordance rate in relation to Linear Array<sup>®</sup>. Therefore, it may be considered the test of choice for population screening, considering its lower cost and practicality during the execution.

Keywords: HPV. Diagnosis. Linear Array HPV Genotyping<sup>®</sup>. Cobas HPV Test<sup>®</sup>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	–	ÁRVORE FILOGENÉTICA DAS ESPÉCIES DE PAPILOMAVIRUS QUE INFECTAM OS HUMANOS IDENTIFICADOS PELA ANÁLISE COMPARATIVA DA REGIÃO open reading frame (ORF) L1.....	22
FIGURA 2	–	CLASSIFICAÇÃO DOS GENÓTIPOS DE HPV QUANTO AO TROPISMO TECIDUAL EM CUTÂNEOS, MUCOSOS, CUTÂNEOS E/OU MUCOSOS E CUTÂNEOS ASSOCIADOS À EPIDERMODISPLASIA VERRUCIFORME.....	24
FIGURA 3	–	ORGANIZAÇÃO DO GENOMA VIRAL DO HPV.....	26
FIGURA 4	–	PROGRESSÃO DO EPITÉLIO NORMAL ATÉ O DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER DE COLO UTERINO OCACIONADO PELA INFECÇÃO POR HPV.....	31
FIGURA 5	–	PROGRESSÃO DA INFECÇÃO PELO HPV.....	33
FIGURA 6	–	TIRAS DO KIT <i>LINEAR ARRAY HPV GENOTYPING</i> <sup>®</sup> (ROCHE MOLECULAR SYSTEMS, PLEASANTON, CA) APRESENTANDO A HIBRIDIZAÇÃO DOS PRODUTOS DA PCR PARA IDENTIFICAÇÃO DOS GENÓTIPOS DE HPV PRESENTES EM AMOSTRAS CERVICAIS.....	42
FIGURA 7	–	SEQUÊNCIA DE PROCEDIMENTOS DO EXAME ESPECULAR GINECOLÓGICO PARA A COLETA DAS AMOSTRAS CERVICAIS PARA O EXAME PREVENTIVO DO CÂNCER DE COLO UTERINO.....	46
FIGURA 8	–	CÁLCULO DA PREVALÊNCIA.....	48

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	– CLASSIFICAÇÃO DOS HPV GENITAIS PERTENCENTES AO GÊNERO ALPHA-PAPILLOMAVIRUS EM RELAÇÃO AO RISCO EM CAUSAR LESÕES NEOPLÁSICAS.....	24
TABELA 2	– PREVALÊNCIAS DAS INFECÇÕES PELO HPV DE ALTO E BAIXO RISCO ONCOGÊNICO EM MULHERES EM DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL.....	36
TABELA 3	– INTERPRETAÇÃO DO RESULTADO DO TESTE <i>kappa</i> .....	48
TABELA 4	– DADOS CLÍNICOS DAS 162 MULHERES INCLUÍDAS NO ESTUDO.....	49
TABELA 5	– COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DOS TESTES <i>LINEAR ARRAY</i> <sup>®</sup> E <i>COBAS</i> <sup>®</sup> DAS 93 MULHERES INCLUÍDAS NO ESTUDO COM RESULTADOS DISPONÍVEIS PARA AS DUAS TÉCNICAS.....	52

## LISTA DE SIGLAS

ASC-US	–	Células escamosas atípicas de significado indeterminado
BPV	–	Bovine papillomavirus
CCU	–	Câncer de colo uterino
CEP	–	Comitê de Ética e Pesquisa
DNA	–	Deoxyribonucleic acid
FDA	–	Food and Drug Administration
HIV	–	Virus da imunodeficiência humana
HPV	–	Human papillomavirus
HSIL	–	High risk squamous intraepithelial lesion
ICTV	–	The International Committee on Taxonomy of Viruses
INCA	–	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
IST	–	Infecção Sexualmente Transmissível
JEC	–	Junção escamo colunar
LCR	–	Long Control Region
LSIL	–	Low risk squamous intraepithelial lesion
NIC	–	Neoplasia Intraepitelial Cervical
ORFs	–	Open Reading Frame
PCR	–	Polymerase chain reaction
PV	–	Papillomavirus
SOPC	–	Serviço de Orientação e Prevenção do Câncer
TCLE	–	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UBS	–	Unidades Básicas de Saúde
UNIPEX	–	Unidade de Pesquisa Experimental
URR	–	Upstream Regulatory Region
WHO	–	World Health Organization

## SUMÁRIO

1.	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	16
2.	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	19
2.1	PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) .....	19
2.2	HISTÓRICO .....	19
2.3	TAXONOMIA E NOMENCLATURA .....	20
2.4	CLASSIFICAÇÃO DO HPV .....	23
2.5	BIOLOGIA DO HPV .....	25
2.6	TRANSMISSÃO DO HPV .....	28
2.7	CICLO BIOLÓGICO DO HPV.....	29
2.8	FISIOPATOLOGIA DAS LESÕES HPV-INDUZIDAS NO TRATO GENITAL FEMININO .....	31
2.8.1	Condilomas genitais .....	32
2.8.2	Câncer de colo uterino .....	32
2.9	Clearance DA INFECÇÃO PELO HPV .....	34
2.10	EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO PELO HPV.....	35
2.11	EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE COLO UTERINO .....	37
2.12	TÉCNICAS PARA DIAGNÓSTICO DO HPV .....	38
2.12.1	Técnica citopatológica .....	39
2.12.2	Técnica histopatológica .....	40
2.12.3	Técnica molecular baseada na amplificação de ácidos nucleicos.....	40
2.12.3.1	<i>Linear Array HPV Genotyping</i> <sup>®</sup> .....	41
2.12.3.2	<i>Cobas HPV Test</i> <sup>®</sup> .....	43
3.	<b>OBJETIVOS</b> .....	44
3.1	OBJETIVO GERAL .....	44
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	44
4.	<b>METODOLOGIA</b> .....	45
4.1	DESENHO DO ESTUDO .....	45
4.2	COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO.....	46
4.3	PESQUISA DA DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DO HPV.....	47
4.3.1	<i>Linear Array HPV Genotyping</i> <sup>®</sup> .....	47

4.3.2	<i>Cobas HPV Test</i> <sup>®</sup> .....	47
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	48
5.	<b>RESULTADOS</b> .....	49
6.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	53
7.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	56
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	57
	<b>ANEXO 1 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA (CEP)</b> .....	73
	<b>ANEXO 2 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP</b> .....	76



## 1. INTRODUÇÃO

O Câncer de colo uterino (CCU) é a terceira maior causa de morte por câncer em mulheres no Brasil, ocasionando 5 mortes/100 mil mulheres (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA), 2014). Além disso, é o terceiro câncer de maior incidência no país, representando um risco de 15,8 casos/100 mil mulheres em 2016. Por esse fato, o CCU vem sendo considerado um problema de saúde pública, não apenas no Brasil, mas também em todos os países em desenvolvimento devido ao elevado número de casos novos dessa neoplasia (BRASIL, 2015; *World Health Organization (WHO)*, 2015).

Existe uma forte associação de causalidade entre o CCU e a infecção pelo Papilomavírus humano (HPV), visto que em 98,0% dos casos de câncer de colo uterino há a detecção desse vírus. Presume-se que nos 2,0% dos casos remanescentes tal associação não pode ser estabelecida devido a limitações nas técnicas para detecção desse agente infeccioso (LINHARES e VILLA, 2006).

O HPV é um vírus que pode ser transmitido sexualmente que infecta o tecido epitelial e as mucosas. Nesses tecidos, o HPV pode causar o desenvolvimento de lesões benignas proliferativas como condilomas e até neoplasias malignas. (SOLIMAN, SLOMOVITZ e WOLF, 2004; SANTOS, 2012). Atualmente são descritos 40 genótipos de HPV que infectam a região anogenital, os quais podem ser classificados de acordo com o seu potencial oncogênico em HPV de baixo risco, provável alto risco e alto risco. Dentre os HPV de baixo risco, os genótipos 6 e 11 são os mais prevalentes e estão presentes em 90,0% dos casos de condilomas genitais (FLORES-DÍAZ et al., 2017). Já os HPV de provável alto risco são representados pelos genótipos 26, 53, 66, 68, 73 e 82 (MUÑOZ et al., 2006). Enquanto que dentre os HPV de alto risco destacam-se os genótipos 16 e 18, que já foram associados a diversos carcinomas genitais como câncer peniano e anal em homens, além de câncer vulvar, anal e do colo uterino em mulheres (LETO et al., 2011).

A literatura é consistente em mostrar que a presença da infecção pelo HPV é necessária, mas não suficiente para o desenvolvimento de neoplasias. Inúmeros outros fatores de risco para o desenvolvimento de lesões HPV-induzidas já foram descritos.

Dentre esses fatores, destacam-se o tabagismo, menor idade na coitarca, maior número de parceiros sexuais e, principalmente, o maior tempo da persistência da infecção pelo HPV de alto risco nas mulheres (SCHLECHT et al., 2001; ANJOS, et al., 2010; STOFER, NUNES e SCHNEIDER, 2011). Estudos demonstram que 70,0% dos casos de mulheres HPV-positivas tem essa infecção eliminada (*clearance* viral) pelo próprio sistema imunológico no prazo de 12 meses. No entanto, 30,0% das mulheres permanecem com a infecção pelo HPV e, portanto, estão sujeitas às complicações decorrentes dessa infecção (HO et al., 1998).

Dessa forma, os testes para detecção e genotipagem do HPV são fundamentais, tanto para a condução de estudos científicos, como para o diagnóstico nos serviços de saúde, visto que permitem identificar as mulheres em risco de desenvolver lesões HPV-induzidas (CARVALHO et al., 2010; RONCO et al., 2010). Estudos comprovaram que a detecção do HPV para a triagem do CCU é mais eficaz do que o exame citológico isolado (BULKMANS et al., 2007; RONCO et al., 2010; JENTSCHKE, SOERTEL e HILLEMANN, 2012). Com isso, algumas diretrizes recomendam a realização da detecção do HPV concomitantemente ao exame citológico, além da identificação específica dos genótipos 16 e 18 em mulheres que tiverem um resultado HPV-positivo para um genótipo de alto risco e com exame citológico negativo (SOLOMON, 2009).

Os testes moleculares baseados na amplificação de ácidos nucleicos mais utilizados para a detecção e genotipagem do HPV são o *Linear Array HPV Genotyping*<sup>®</sup> e *Cobas HPV Test*<sup>®</sup> (ambos Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA). Enquanto que o primeiro baseia-se na amplificação pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) da região L1 do genoma viral e na detecção do DNA (*deoxyribonucleic acid*) viral amplificado por meio da técnica de hibridização em fita contendo sondas oligonucleotídicas marcadas (ELFGREN et al., 2002). O segundo é uma técnica totalmente automatizada que se baseia na amplificação e na detecção da região L1 do HPV utilizando a técnica de PCR em tempo real (LEVI et al., 2016).

Para pesquisas científicas a técnica mais utilizada é o *Linear Array*<sup>®</sup> devido a sua alta sensibilidade e capacidade de detectar vários genótipos de HPV, tanto os de baixo risco e alto risco oncogênico, além de identificar infecções com múltiplos genótipos de HPV em uma única amostra (FROBERG et al., 2008; GRAVITT et al., 2008; STOLER et al., 2011). Em contrapartida, o *Cobas*<sup>®</sup> é mais utilizado na rotina laboratorial para fins

diagnósticos e consegue identificar os genótipos de HPV-16 e 18 separadamente, visto que os outros 12 genótipos mais frequentes de HPV de alto risco, embora sejam detectados, não são identificados separadamente (LEVI et al., 2016). Além disso, outra diferença importante entre essas duas técnicas é o valor, visto que o *Linear Array*<sup>®</sup> apresenta maior custo.

Dados preliminares do estudo “Prevalência de coinfeção e fatores associados ao Papilomavírus humano (HPV) e à *Chlamydia trachomatis* em mulheres em idade reprodutiva atendidas em Programa de Prevenção do Câncer do Colo Uterino na região sudeste do Brasil” realizado na Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP verificou uma taxa de persistência da infecção pelo HPV de 73,2% em mulheres utilizando a técnica *Linear Array*<sup>®</sup>. No entanto, essa taxa de persistência se mostrou superior em relação aos estudos reportados na literatura, os quais não utilizaram a técnica *Linear Array*<sup>®</sup> para a detecção e genotipagem do HPV (NIELSEN et al., 2010; COSER et al., 2016; SHANMUGASUNDARAM e YOU, 2017). Tendo em vista essa importante diferença, surge a hipótese que tal técnica produz resultados positivos mesmo com quantidades mínimas de DNA viral.

Com isso, considerando a importância de determinar de forma precisa às prevalências dos genótipos de HPV de alto risco oncogênico para identificar as mulheres suscetíveis ao desenvolvimento de lesões HPV-induzidas, é essencial a utilização de métodos sensíveis e específicos na detecção e genotipagem de HPV. Dessa forma, considerando as diferentes características que se baseiam as metodologias do *Linear Array HPV Genotyping*<sup>®</sup> (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA) e do *Cobas HPV Test*<sup>®</sup> (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA) torna-se fundamental comparar os dois sistemas de detecção e genotipagem do HPV em relação à positividade do HPV de alto risco oncogênico em mulheres em idade reprodutiva.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

Os vírus pertencentes ao gênero *Papillomavirus* (PV) são extremamente diversificados, podendo infectar mais de 20 espécies de mamíferos e até aves. Dentre os vírus que infectam os mamíferos, destacam-se os Papilomavírus humano (HPV) que infectam os humanos. Esses são os hospedeiros mais estudados devido às graves implicações dessa infecção para a saúde humana (VILLIERS et al., 2004). Há indícios que as primeiras infecções por HPV ocorreram há 500 mil anos em espécies ancestrais comuns ao homem moderno, os neandertais na Europa e os denisovanos na Ásia (PIEMENOFF; OLIVEIRA e BRAVO, 2017). Dessa forma, pode-se considerar que esse vírus está há mais tempo na Terra do que o próprio homem moderno.

### 2.2 HISTÓRICO

O HPV é um vírus que afeta os humanos desde a antiguidade. Há relatos da patologia causada por esse vírus desde o primeiro século da era Cristã, onde o termo verruga genital foi utilizado pelo poeta Martialis referindo-se metaforicamente aos condilomas acuminados. Naquela época, os médicos gregos e romanos foram os pioneiros a observar a transmissão da verruga genital por meio do ato sexual. No entanto, as suas causas permaneciam desconhecidas (CAMARA et al., 2008).

O caráter infeccioso das verrugas foi descoberto no final do século XIX. O pesquisador Joseph P. Payne em 1911 autoinoculou raspados verrucosos provenientes de uma criança em seu polegar. Em 1912, os pesquisadores C. Licht e Gaston Variot inocularam tecido verrucoso em voluntários. Em todos esses casos houve o desenvolvimento de verrugas no indivíduo que sofreu o processo de inoculação, confirmando a característica infecciosa da mesma (GARFIELD, 1988).

Contudo, apenas no século XX com o desenvolvimento de técnicas e métodos de identificação foi possível conhecer os patógenos causadores de diversas doenças. A primeira suspeita que os vírus pudessem ser o causadores das verrugas foi feita pelo G. Ciuffo (GARFIELD, 1988). No entanto, somente em 1930 e em 1940 com o

desenvolvimento da microscopia eletrônica e com o cultivo celular respectivamente, foi possível confirmar essa suspeita por meio da visualização de partículas semelhantes a vírus advindas de papiloma de pele (STRAUSS et al., 1949). Dessa forma, Strauss et al. em 1950 identificaram o HPV como o agente etiológico das verrugas (STRAUS et al., 1950).

A partir disso, a pesquisa sobre o HPV se intensificou e no início da década de 1970, alguns genótipos de HPV foram encontrados em amostras provenientes de verrugas, displasia intraepitelial, carcinomas cervical e peniano. Já em 1980, o potencial carcinogênico de alguns genótipos de HPV foi demonstrado (MCINTYRE, 2005).

Em decorrência dessa grave consequência causada por alguns genótipos de HPV, inúmeros estudos quanto à taxonomia, classificação, biologia, epidemiologia e diagnóstico do HPV têm sido amplamente realizados. Tais estudos puderam e ainda poderão permitir o melhor conhecimento desse vírus altamente prevalente na população. Atualmente, estima-se que 80,0% da população sexualmente ativa terão pelo menos uma infecção por HPV durante sua vida (VILLIERS et al., 2004; BLACK et al., 2010; CHESSON et al., 2014; DUARTE et al., 2017; PIEMENOFF; OLIVEIRA e BRAVO, 2017).

### 2.3 TAXONOMIA E NOMENCLATURA

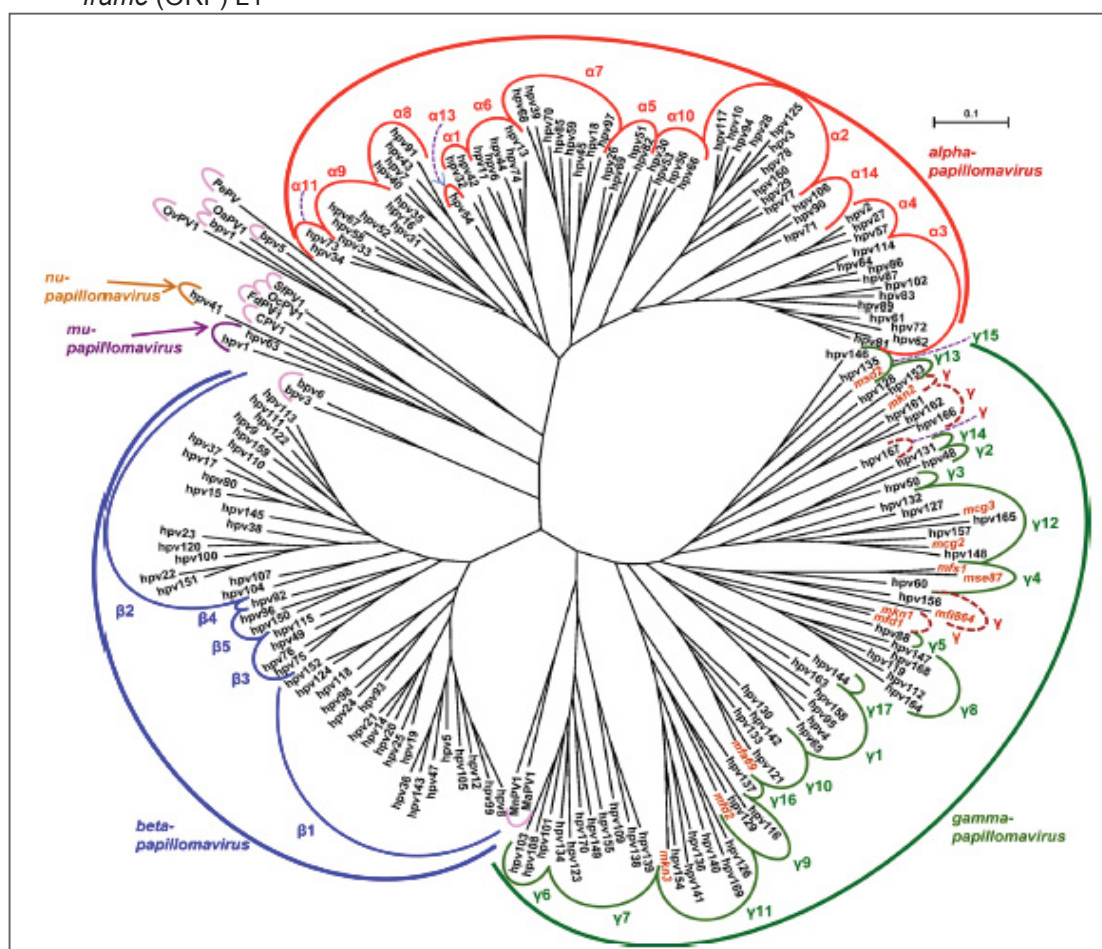
A taxonomia e a nomenclatura dos vírus seguem os critérios estabelecidos pelo *The International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV). Até em seu sexto relatório em 1995, os Papillomavirus e os Polyomavirus pertenciam à mesma família *Papoviridae* por compartilharem características comuns. Contudo, o sétimo relatório do ICTV reconheceu que tais vírus deveriam ser englobados em famílias distintas, a *Papillomaviridae* e a *Polyomaviridae*, respectivamente, devido às diferenças na organização genômica desses vírus (VILLIERS et al., 2004; CAMARA et al., 2008).

Anteriormente, a família *Papillomaviridae* podia ser dividida em 16 gêneros sendo representados por uma letra grega e cada gênero abriga várias espécies (VILLIERS et al., 2004). No entanto, atualmente são descritos 29 gêneros de PVs, os quais continuam sendo representados por uma letra grega e alguns gêneros a letra grega é

precedida pelo prefixo “*dyo*” devido a grande quantidade de gêneros de PVs que excederam o alfabeto grego (BERNARD et al., 2010). A identificação das espécies de PVs é realizada há mais de 15 anos por meio da clonagem completa do genoma viral e da análise comparativa da região mais conservada do vírus, o gene *Open Reading Frame* (ORF) L1. Além da taxonomia em família, gênero e espécie, os PVs também são classificados em genótipos, subtipos e variantes de acordo com a similaridade dos nucleotídeos na região ORF L1. Diferença de até 10,0% na região ORF L1 é considerado um novo genótipo de PV. Enquanto que diferença entre 10,0% a 2,0% do genótipo mais similar é identificado como um subtipo. Por fim, a diferença inferior a 2,0% na sequência de nucleotídeos da região ORF L1 é reconhecido como um variante de genótipos de PV (VILLIERS et al., 2004; CAMARA et al., 2008).

A Figura 1 mostra a árvore filogenética contendo as espécies de PVs que infectam os humanos e que foram identificados por meio da análise comparativa da região ORF L1.

FIGURA 1 – ÁRVORE FILOGENÉTICA DAS ESPÉCIES DE PAPILOMAVIRUS QUE INFECTAM OS HUMANOS IDENTIFICADOS PELA ANÁLISE COMPARATIVA DA REGIÃO *open reading frame* (ORF) L1



FONTE: VILLIERS (2013).

Os vírus pertencentes ao gênero *Alpha-papillomavirus* infectam preferencialmente a mucosa oral e anogenital dos humanos, enquanto que os vírus dos gêneros *Beta-papillomavirus*, *Gamma-papillomavirus*, *Nu-papillomavirus* e *Mu-papillomavirus* infectam principalmente a epiderme dos humanos (FAUQUET e FARGETTE, 2005; VILLIERS, 2013). Já os outros gêneros que não estão representados na Figura 1 infectam preferencialmente os animais, aves e reptéis, por exemplo, os vírus dos gêneros *Epsilon-papillomavirus*, *Xi-papillomavirus* e *Delta-papillomavirus* infectam os bovinos; o *Theta-papillomavirus* e *Eta-papillomavirus* causam lesões cutâneas em aves; e o *Dyozeta* infectam tartarugas marinhas (FAUQUET e FARGETTE, 2005; BERNARD et al., 2010).

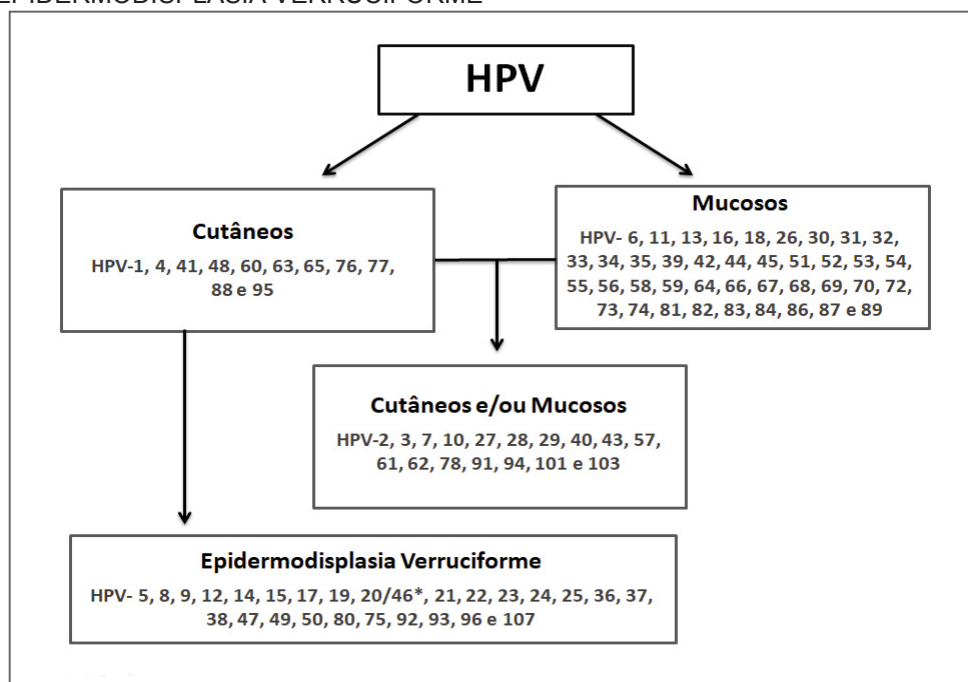
A nomenclatura das espécies é representada pelo nome do hospedeiro do vírus em itálico seguido pelo nome do vírus, por exemplo: *Bovine papillomavirus* (BPV) e *Human papillomavirus* (HPV) que infectam os bovinos e humanos respectivamente (BERNARD et al., 2010). Os HPV incluem diferentes genótipos, os quais foram nomeados pela sua sigla (HPV) seguida do número que indica a sequência em que os genótipos foram descobertos, por exemplo: HPV-6, HPV-11, HPV-16 e HPV-18 (CAMARA et al., 2008). Essa nomenclatura, embora mais utilizada pela comunidade científica, difere do que foi estabelecido pelo ICTV, por exemplo, o grupo *alpha* 9 inclui os HPV-16, 31, 33, 35, 52, 58 e 67; enquanto que o *alpha* 7 inclui os HPV-18, 39, 45, 59, 68, 70 e C85 (VILLIERS et al., 2004; BERNARD et al., 2010).

## 2.4 CLASSIFICAÇÃO DO HPV

O HPV pertence à família *Papillomaviridae* e a espécie *Human papillomavirus* que engloba mais de 200 genótipos virais, dos quais 100 já foram totalmente sequenciados geneticamente e mais de 120 foram parcialmente sequenciados (CAMARA et al., 2008; FEDRIZZI, 2011). Os HPV podem ser classificados em cutâneos e mucosos de acordo com o seu tropismo a tecidos específicos. Os HPV cutâneos, também conhecidos como não genitais, infectam principalmente a pele causando os condilomas comuns e alguns genótipos específicos causam a epidermodisplasia verruciforme, tumores raros de pele. Já os HPV mucosos infectam as mucosas oro-respiratórias e anogenitais, assim também podem ser chamados de HPV genitais. No entanto, essa classificação não é tão precisa, visto que genótipos de HPV genitais podem ser detectados na pele e o contrário também é possível (LETO et al., 2011). A Figura 2 apresenta a classificação do HPV referente ao tropismo tecidual.



FIGURA 2 – CLASSIFICAÇÃO DOS GENÓTIPOS DE HPV QUANTO AO TROPISMO TECIDUAL EM CUTÂNEOS, MUCOSOS, CUTÂNEOS E/OU MUCOSOS E CUTÂNEOS ASSOCIADOS À EPIDERMODISPLASIA VERRUCIFORME



\* O HPV-46 é um subtipo do HPV-20

FONTE: Adaptado de VILLIERS et al. (2004).

Entre os HPV genitais (mucosos), cerca de 40 genótipos infectam o trato anogenital, fazendo parte do gênero *Alpha-papillomavirus*. Os genótipos pertencentes a esse gênero podem ser classificados em HPV de alto risco oncogênico, HPV de provável alto risco e HPV de baixo risco oncogênico em relação ao seu potencial em desenvolver lesões neoplásicas (VILLIERS et al., 2004). A Tabela 1 mostra a classificação dos genótipos de HPV genitais quanto ao risco oncogênico obtida por meio da associação entre os critérios epidemiológicos e a classificação da árvore filogenética (MUÑOZ et al., 2006).

TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO DOS HPV GENITAIS PERTENCENTES AO GÊNERO ALPHA-PAPILLOMAVIRUS EM RELAÇÃO AO RISCO EM CAUSAR LESÕES NEOPLÁSICAS

Risco oncogênico	Genótipos
HPV de alto risco	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, e 59
HPV de provável alto risco	26, 53, 66, 68, 73 e 82
HPV de baixo risco	6, 11, 13, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e 89/CP6108*

\* O HPV-CP6108 foi reclassificado como pertencente ao genótipo 89

FONTE: Adaptado de MUÑOZ et al. (2006).

Os HPV de baixo risco oncogênico, como HPV 6, 11 e 42, estão associados principalmente ao desenvolvimento de condilomas genitais. Já os HPV alto risco oncogênico, destacam-se os genótipos 16, 18, 31, 33 e 45, os quais tem a capacidade de imortalizar os queratinócitos, estando associados às lesões intraepiteliais de alto grau e carcinomas invasivos do colo uterino (MUÑOZ et al., 2003; VILLIERS et al., 2004). Somado a isso, os HPV-16 e 18, juntos, são responsáveis por mais de 70,0% dos casos de carcinomas epidermóides e mais de 80% dos adenocarcinomas do colo uterino (BOSCH e DE SANJOSÉ, 2003; SMITH, LINDSAY e HOOTS, 2007). O alto risco oncogênico atribuído a determinados genótipos de HPV está diretamente relacionado com a biologia do genoma viral.

## 2.5 BIOLOGIA DO HPV

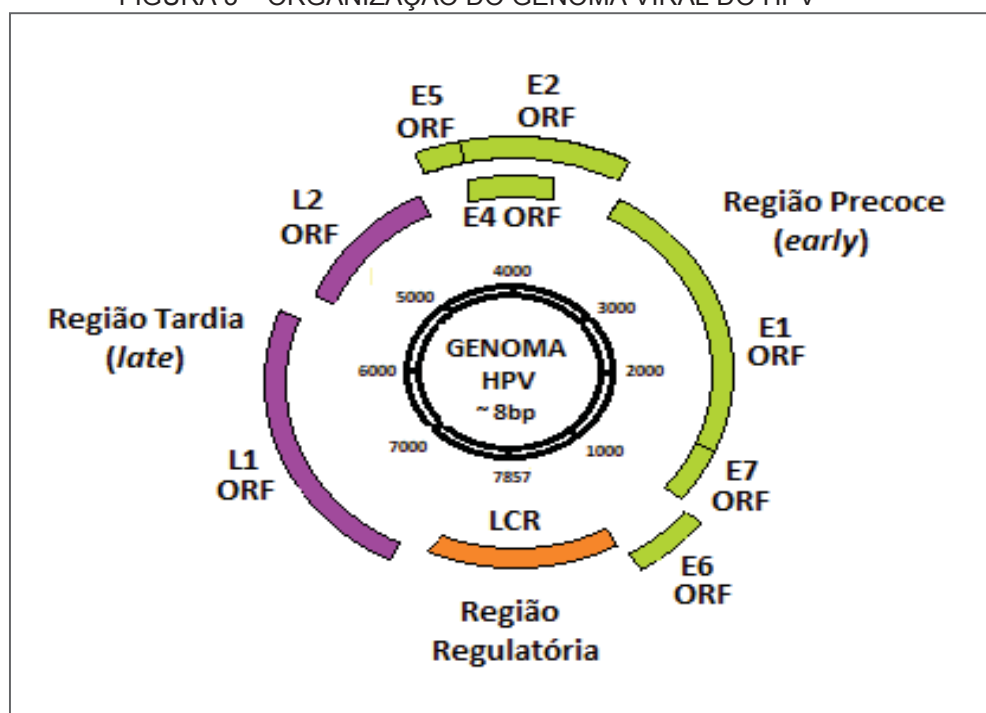
Os HPV possuem material genético composto por DNA e infectam preferencialmente as células epiteliais, sendo chamados de epiteliotróficos (SOLIMAN, SLOMOVITZ e WOLF, 2004). São constituídos por um capsídeo não envelopado com diâmetro em torno de 55 nm. Seu capsídeo engloba uma molécula de DNA circular de dupla fita com aproximadamente 8000bp (ZUR HAUSEN, 1996; RIEMER et al., 2010). Embora seja um vírus pequeno, sua biologia é muito complexa (VILLIERS et al., 2004).

A organização genômica do vírus (Figura 3) é bem conservada e seu genoma está dividido em duas regiões: a região regulatória e a *Open Reading Frame* (ORFs). A região regulatória (LCR, *Long Control Region*), também chamada de *Upstream Regulatory Region* (URR), é uma região não-codificadora que se localiza entre os genes L1 e o E6 e contém a origem de replicação do DNA, responsável por regular a expressão gênica, pois nesse local se encontram os genes regulatórios, os iniciadores e os sítios de ligação com fatores de transcrição que regulam a transcrição dos genes presentes na região codificadora de proteínas (SOLIMAN, SLOMOVITZ e WOLF, 2004).

Por sua vez, a região codificadora de proteínas é a ORFs, a qual possui oito sequências gênicas aberta de leitura que são divididas em duas regiões: a região tardia (*late*) e a região precoce (*early*) (CAVALCANTI e CARESTIATO, 2006). Na região

tardia estão os genes L1 e L2 que codificam as proteínas estruturais do capsídeo viral. O gene L1 codifica a principal proteína do capsídeo, sendo gênero-específica e altamente conservada entre as espécies, por esse fato é utilizado na classificação, identificação e na construção de árvores filogenéticas dos PVs (VILLIERS et al., 2004; OLIVEIRA, 2011). Já o gene L2 codifica a proteína secundária do capsídeo viral que é tipo-específica do capsídeo, tendo mais sequências de variação entre os genótipos de HPV (SOLIMAN, SLOMOVITZ e WOLF, 2004). Enquanto que na região precoce se encontram os genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7. Os genes E1 e E2 codificam proteínas envolvidas na replicação do DNA viral e no controle da transcrição, enquanto que o gene E4 está associado ao colapso da citoqueratina celular ocasionando a formação de coilocitos na célula, já o gene E5 atua na expansão clonal inicial e os oncogenes E6 e E7 codificam proteínas com atividade de transformação e imortalização celular (ROBERTS et al., 1994; ZUR HAUSEN, 1996; SOLIMAN, SLOMOVITZ e WOLF, 2004).

FIGURA 3 – ORGANIZAÇÃO DO GENOMA VIRAL DO HPV



FONTE: O autor (2017).

O potencial oncogênico dos HPV de alto risco pode ser atribuído principalmente a duas proteínas virais precoces, E6 e E7 (MUNGER e HOWLEY, 2002). Estas proteínas são consistentemente expressas em células tumorais e a manutenção da expressão é essencial para a sustentação do fenótipo transformado. A proteína E6, codificada pela região ORF E6 no genoma viral, possui aproximadamente 150 aminoácidos com uma massa molecular de 18 kD, tendo como principal estrutura a presença de 4 domínios Cys-X-X-Cys que permite a formação de dois dedos de zinco. Essa proteína consegue interagir e degradar a proteína supressora de tumor p53, impedindo que a mesma interrompa a divisão celular para a realização do reparo do DNA danificado ou da apoptose (SCHEFFNER et al., 1990; TYRING, 2000; ALMEIDA NETO, 2007). A diferença entre a proteína E6 do HPV de alto e baixo risco oncogênico está relacionada com a interação com a p53. A proteína E6 do HPV de alto risco possui uma forte interação com a p53, ocasionando sua rápida degradação. Em contrapartida, a proteína E6 do HPV de baixo risco se liga fracamente a p53 não atingindo a degradação da mesma (CROOK e VOUSDEN, 1991; LECHNER e LAIMINS, 1994).

A proteína E7 é uma fosfoproteína codificada pela região ORF E7 do genoma viral, possui em torno de 100 aminoácidos em sua cadeia polipeptídica e sua estrutura é semelhante à proteína E6, por esse fato, acredita-se que há um vínculo evolutivo entre essas duas proteínas (ZUR HAUSEN, 1996). A proteína E7 interage com a família de proteínas Rb (pRb, p107 e p130) que induz a transformação celular. Dentre as proteínas dessa família, a mais estudada é a proteína supressora de tumor pRb que está ativa na sua forma hipofosforilada, impedindo a entrada da célula na fase S do ciclo celular, porém, quando a proteína E7 interage com a pRb hipofosforilada ocorre formação de um complexo que inativa e degrada a pRb, permitindo a entrada da célula na fase S (COBRINIK et al., 1992; MUNGER e HOWLEY, 2002). A afinidade entre a pRb com a proteína E7 do HPV de alto risco é cerca de 10 vezes maior em comparação com a E7 do HPV de baixo risco oncogênico, influenciando diretamente na capacidade de transformação celular. Isso ocorre devido à substituição de um aminoácido na posição 21 da cadeia polipeptídica, onde há a presença de um resíduo de ácido aspártico na proteína E7 do HPV de alto risco enquanto que na E7 do HPV de baixo risco há a presença de um resíduo de glicina (HECK et al., 1992; HUIBREGTSE e SCHEFFNER, 1994).

Dessa forma, as atividades de E6 e E7 de HPV de alto risco sobre as proteínas p53 e pRb, respectivamente, contribuem para a imortalização das células infectadas pelo vírus e, portanto, no desenvolvimento de lesões HPV-induzidas que podem evoluir para casos de neoplasias (MUNGER e HOWLEY, 2002).

## 2.6 TRANSMISSÃO DO HPV

A transmissão do HPV ocorre frequentemente por meio do contato interpessoal, sendo que a principal rota de transmissão desse vírus é pela via sexual. Embora a infecção por HPV seja uma infecção sexualmente transmissível (IST), outras vias de transmissão não sexual têm sido relatadas por meio de fômites (SANTOS, 2012; RYNDOCK e MEYERS, 2014). Como o capsídeo do HPV é estável e sua transmissão se dá juntamente com os queratinócitos degradados, a rede de queratina e a membrana do queratinócito fornece proteção para o vírus em frente aos estresses ambientais (RYNDOCK e MEYERS, 2014). Por esse fato, apesar de menos frequente ainda é possível a transmissão do HPV em fômites presentes em toalhas, instrumentos ginecológicos e outros objetos, visto que o vírus é resistente à ação de desinfetantes (GALLAY et al., 2016; MARTINO et al., 2013).

Outras possibilidades de transmissão não sexual estão relacionadas à autoinfecção e a heteroinfecção. A autoinfecção se refere à transmissão do HPV para a mesma pessoa infectada por meio de arranhaduras na região genital. Enquanto que a heteroinfecção não sexual é caracterizada pela transmissão do HPV de pessoas infectadas para os membros da família por meio do contato digital (SONNEX, STRAUSS e GRAY, 1999; SABEENA et al., 2017).

A transmissão do HPV pela via vertical pode ocorrer quando a mãe infectada transmite o vírus para o feto durante a gravidez ou no trabalho de parto. O feto pode ser tornar infectado pelo HPV durante a gestação em decorrência das microrroturas nas membranas fetais. No entanto, a maioria das infecções pelo HPV em recém-nascido ocorre durante o trabalho de parto devido ao contato do bebê ao trato genital materno infectado (SABEENA et al., 2017).

## 2.7 CICLO BIOLÓGICO DO HPV

A partir da transmissão, inicia-se o ciclo biológico do HPV no epitélio escamoso da pele e das mucosas em decorrência ao seu tropismo por esses tipos celulares. O ciclo biológico desse vírus é muito complexo e dependente da diferenciação celular, mas pode ser sintetizado em três etapas: estabelecimento, manutenção e produtiva (CAVALCANTI e CARESTIATO, 2006; CAMARA et al., 2008 e ROCHA, 2016).

A etapa de estabelecimento consiste na penetração do vírus nas células basais do epitélio escamoso por meio de microlesões. Essas células são menos diferenciadas e reconhecem o vírus pelos receptores de superfície celular específico que interagem com as proteínas do capsídeo viral, permitindo a entrada do vírus na célula (CAMARA et al., 2008; HORVARTH et al., 2010; ROCHA, 2016). Os mecanismos dessa interação permanecem desconhecidos, mas estudos mostram que a alfa-6-integrina é um receptor celular que reconhece o HPV (EVANDER et al., 1997). Previamente a interação com os receptores celulares, o vírus se liga ao sulfato de heparan na membrana basal, essa ligação é mandatória para a posterior interação com os receptores *in vivo* (SAPP e BIENKOWSKA-HABA, 2009). A entrada do HPV na célula faz com que o mesmo perca seu capsídeo, expondo o seu material genético à maquinaria enzimática celular, permitindo a expressão dos genes virais. Inicialmente, o genoma viral permanece na forma circular (epissomal), não se integrando ao genoma celular, mas a sua replicação é realizada concomitantemente com a replicação do DNA celular, produzindo 20 a 50 cópias de vírus por célula infectada (DOOBAR, 2006; CAMARA et al., 2008).

Posteriormente, inicia-se a etapa de manutenção, onde as proteínas virais E1 e E2 iniciam a replicação viral e as E6 e E7 agem no ciclo celular garantindo a sua replicação contínua. Nesse sentido, a ação contínua das proteínas E6 e E7 induzem a transformação celular, onde as células infectadas passam a se multiplicar rapidamente, consequentemente aumentando a replicação viral e a quantidade de células infectadas pelo HPV, dando início a etapa produtiva (MUÑOZ et al., 2006; ROCHA, 2016).

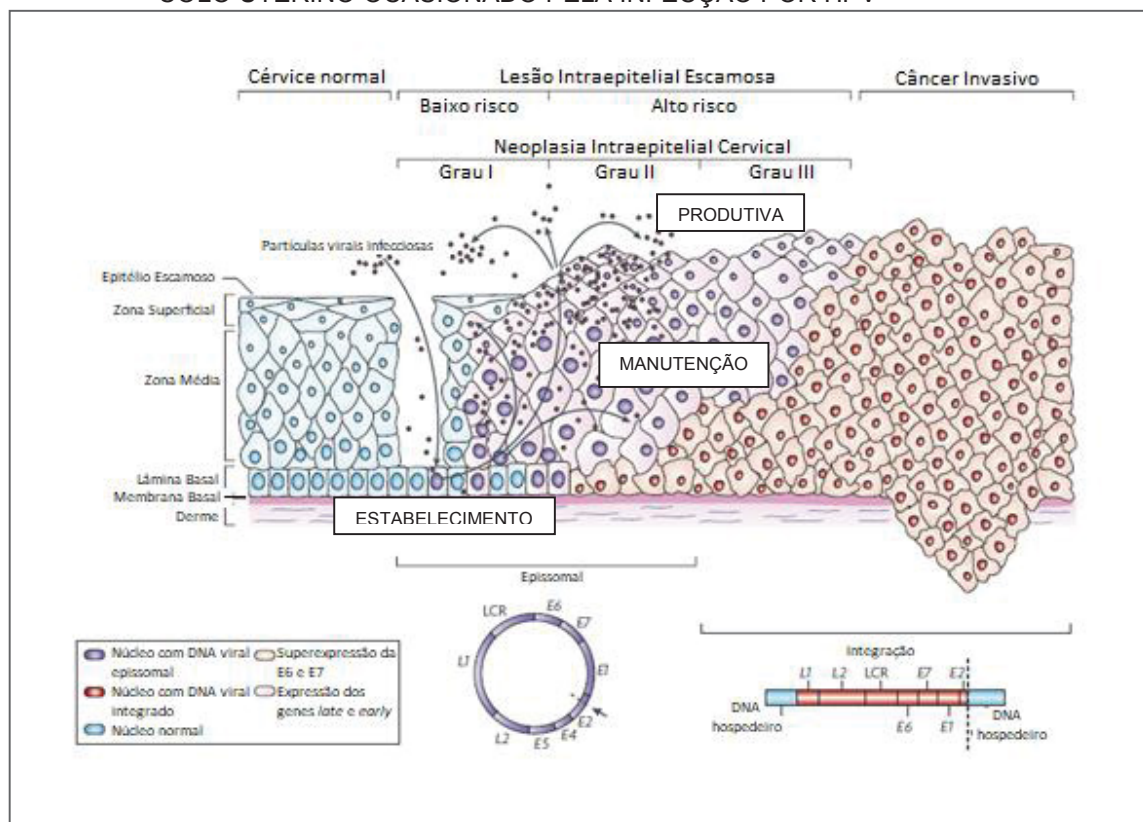
Durante a etapa produtiva, as células basais infectadas pelo HPV deixam a camada basal, sofrem diferenciação e param de se multiplicar, sendo este o sinal para que o vírus aumente sua taxa de replicação o que ocasiona a perda do controle

expressão dos genes E6 e E7. Além disso, os vírus que infectam as células suprabasais do epitélio iniciam a expressão dos genes tardios, os quais codificam as proteínas L1 e L2 que são responsáveis pela formação do capsídeo viral. Dessa forma, o capsídeo é montado em torno do genoma viral, formando a partícula viral, a qual é liberada pela célula podendo infectar outras células do epitélio (HOU, WU e CHIANG, 2002; ROCHA, 2016).

A integração do genoma viral no genoma humano está associada com a evolução da lesão HPV-induzida ao CCU. Tal associação se deve à perda da integridade do gene E2 devido à integração do DNA viral no DNA do hospedeiro, assim não produzindo a proteína E2 e, conseqüentemente, perdendo o seu papel inibitório sobre a transcrição dos genes E6 e E7. Dessa maneira, ocorre uma superexpressão dos genes E6 e E7 acarretando na superexpressão de proteínas E6 e E7, as quais inativam e degradam as proteínas supressoras tumorais p53 e pRb, respectivamente, contribuindo no desenvolvimento de carcinomas (HOU, WU e CHIANG, 2002; ROCHA, 2016).

A Figura 4 ilustra as etapas do ciclo biológico do HPV, considerando as alterações celulares associadas.

FIGURA 4 – PROGRESSÃO DO EPITÉLIO NORMAL ATÉ O DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER DE COLO UTERINO OCASIONADO PELA INFECÇÃO POR HPV



FONTE: Adaptado de WOODMAN, COLLINS e YOUNG (2007).

## 2.8 FISIOPATOLOGIA DAS LESÕES HPV-INDUZIDAS NO TRATO GENITAL FEMININO

Uma vez infectadas, 70,0% das mulheres tem essa infecção eliminada pelo sistema imunológico no prazo de 12 meses e cerca de 30,0% permanecem com essa infecção, as quais estão sujeitas a sofrerem as complicações advindas dessa infecção (HO et al., 1998). As principais manifestações clínicas provenientes da infecção por HPV são caracterizadas pelo desenvolvimento de condilomas genitais e de lesões neoplásicas na região genital (SANTOS, 2012). As lesões neoplásicas na região genital podem afetar o ânus, a vulva e o colo uterino (LETO et al., 2011). Dentre os cânceres genitais ocasionados pela infecção por HPV de alto risco, o CCU tem a maior incidência, mesmo após a implementação de programas de prevenção (BRASIL, 2015).



### 2.8.1 Condilomas genitais

Os condilomas genitais são caracterizados pelo desenvolvimento de verrugas mucosas multifocais e grandes na região anogenital, podendo ser denominados de condilomas acuminados ou verrugas genitais (SANTOS, 2012). Os genótipos de baixo risco oncogênico estão associados com o desenvolvimento de condilomas, visto que os HPV-6 e 11 são responsáveis por 90,0% dos casos (FLORES-DÍAZ et al., 2017).

Os condilomas genitais podem estar fora ou dentro do útero e se apresentam em três formas distintas: latente, subclínica e clínica. A forma latente não manifesta sinais clínicos, sendo identificada por métodos moleculares na ausência de evidências histológicas e citológicas da lesão. A forma subclínica é diagnosticada por colposcopia com o uso da solução iodo-iodetada de Schiller e o ácido acético 5,0%, visto que essa forma é mais comumente encontrada na infecção pelo HPV no colo uterino. Já a forma clínica pode ser diagnosticada a olho nu devido à presença do condiloma nos órgãos genitais externos (SANTOS, 2012).

Embora tenham caráter transitório, sendo eliminados espontaneamente pelo hospedeiro em meses ou até anos, os condilomas genitais é a síndrome mais prevalente entre os portadores de IST (SANTOS, 2012; ARAÚJO et al., 2015). Mesmo sendo a mais prevalente, muitas pessoas não reconhecem o condiloma como lesão HPV-induzidas e um número ainda maior de pessoas desconhecem a relação do HPV com o desenvolvimento de neoplasias (BURLAMAQUI et al., 2017).

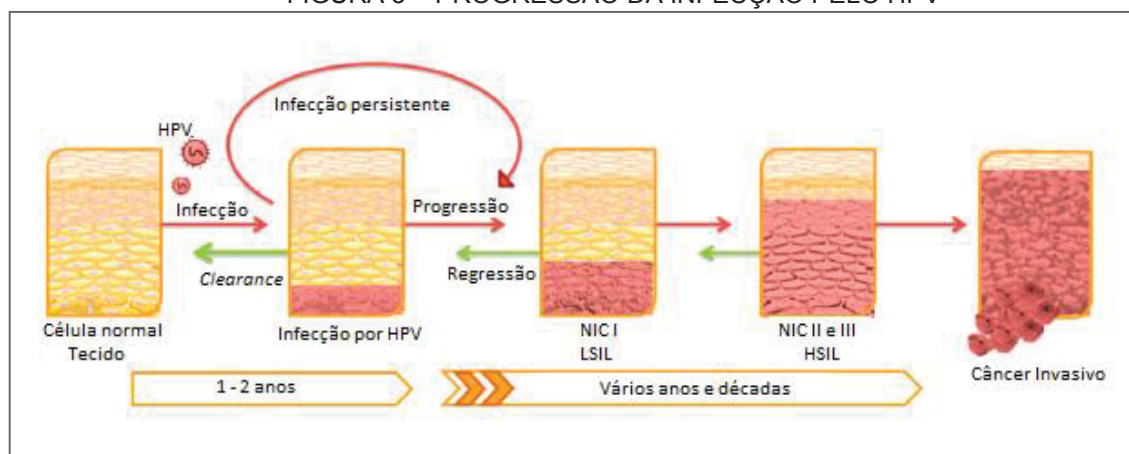
### 2.8.2 Câncer de colo uterino

O Câncer de colo uterino também conhecido como câncer cervical, é caracterizado pela replicação exacerbada do epitélio de revestimento do útero na junção escamo colunar (JEC), podendo acometer o tecido subjacente e até tecidos próximos e distantes (INCA, 2011; BARRIOS e GARAU, 2017). Há dois tipos principais de carcinomas invasivos do colo uterino: o carcinoma epidermóide e o adenocarcinoma. O carcinoma epidermóide acomete o epitélio escamoso, sendo facilmente diagnosticado por meio de métodos citológicos, além de ser o mais prevalente, representando 80,0% dos casos. Já o adenocarcinoma atinge o epitélio

glandular e mesmo sendo de difícil diagnóstico devido à falta de padronização, o número de casos vem aumentando expressivamente nos últimos anos (INCA, 2011; TEIXEIRA et al., 2012).

Lesões cervicais precursoras são as alterações citológicas que acometem o colo uterino antecedendo o desenvolvimento de neoplasia. Essas lesões precursoras apresentam diferentes graus evolutivos de acordo com as características citológicas e histológicas, podendo ser classificadas segundo o sistema de Bethesda (1988) em Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau (*Low Risk Squamous Intraepithelial Lesion* - LSIL) e Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau (*High Risk Squamous Intraepithelial Lesion* - HSIL). As LSIL são caracterizadas pelas modificações citológicas e histológicas que afetam o terço inferior do epitélio e pelas alterações morfológicas causadas pela infecção pelo HPV, compreendendo as antigas denominações de displasia leve e Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) de grau I (LUNDBERG, 1989; INCA, 2000). Já as HSIL são as alterações citológicas e histológicas que acometem o terço médio e superior do epitélio, correspondendo às antigas denominações de displasia moderada e avançada, NIC de grau II e III e por fim, o carcinoma *in situ* (LUNDBERG, 1989; INCA, 2000). A Figura 5 ilustra a progressão da infecção pelo HPV.

FIGURA 5 – PROGRESSÃO DA INFECÇÃO PELO HPV



FONTE: Adaptado de SHANMUGASUNDARAM e YOU (2017).

O principal fator de risco para o desenvolvimento do CCU é a infecção persistente por HPV de alto risco oncogênico (DIZ e MEDEIROS, 2009). Mecanismos biológicos,

como: imaturidade cervical, produção inadequada de muco e a presença de ectopia cervical fazem com que as mulheres jovens e adolescentes sejam as mais suscetíveis à infecção por HPV (KAHN et al., 2002). Como a infecção por HPV genital geralmente não apresenta sintomas, mulheres são infectadas ainda jovens, mas somente após alguns anos desenvolvem a neoplasia, visto que o CCU tem a maior incidência entre mulheres na faixa etária de 45 a 50 anos (HILDESHEIM et al., 1999; FEDRIZZI et al., 2008; DIZ e MEDEIROS, 2009). No entanto, essa perspectiva está se modificando, pois tem se observado a presença de lesões neoplásicas em mulheres mais jovens devido à mudança no comportamento sexual, como o início precoce da vida sexual e a multiplicidade de parceiros (CHAN et al., 2003; ZHAO, NOVAK e AUSTIN, 2011; XAVIER JÚNIOR et al., 2017).

## 2.9 Clearance DA INFECÇÃO PELO HPV

Em geral, as infecções por HPV genitais possuem caráter transitório, pois são eliminadas pelo sistema imunológico num período compreendido entre 1 e 2 anos (TROTIER e FRANCO, 2006). No entanto, uma parcela de mulheres HPV-positivas não sofre o *clearance* do HPV, permanecendo com o vírus no organismo (HO et al., 1998). Além disso, tem sido observado de maneira consistente que pequena proporção de mulheres que são positivas para um determinado genótipo de HPV volta a apresentar positividade para o mesmo genótipo viral. Contudo, não se sabe se esta infecção é eliminada totalmente podendo ocorrer reinfecção, ou ainda se o vírus permanece latente nas células das camadas basais do epitélio podendo entrar novamente em ciclo lítico (TROTIER e FRANCO, 2006).

Em relação ao tempo de *clearance* da infecção pelo HPV, sabe-se que infecções por HPV de alto risco oncogênico requerem mais tempo para serem eliminadas quando comparadas às infecções pelos HPV de baixo risco, sendo que o HPV-16 é o genótipo que apresenta os mais longos períodos de infecção. Além disso, já foi demonstrado que a taxa de *clearance* do HPV-16 é mais baixa quando comparada aos demais genótipos de HPV (MOLANO et al., 2003). Essa relação foi confirmada por importante estudo realizado por Franco et al. (1999) que mostraram que o tempo de *clearance* para infecções por HPV de alto risco oncogênico é aproximadamente o dobro do tempo

em relação aos de baixo risco oncogênico, sendo que o tempo de *clearance* para os mesmos foram de 8,1 meses e 4,8 meses, respectivamente.

Alguns estudos mostram que as infecções por múltiplos genótipos de HPV também influenciam no tempo de *clearance* do HPV, visto que a eliminação viral foi mais lenta em infecções múltiplas (HO et al., 1998; PERRONS et al., 2005; GOODMAN et al., 2009). No entanto, essa associação não foi confirmada por outros estudos, como Campos et al. (2011) e Miranda et al. (2013), pois não verificaram a associação significativa entre o tempo de *clearance* e a presença de infecção múltipla.

Outro fator importante que determina a eliminação do HPV é a carga viral, a qual é inversamente proporcional à taxa de *clearance*. Infecções com maior carga viral demoram mais para serem eliminadas pelo sistema imunológico do indivíduo em comparação as infecções com baixa carga viral, estas podem ser eliminadas em até dois anos, enquanto que as infecções com maior carga de HPV podem ser eliminadas após cinco anos ou não serem eliminadas, permanecendo no organismo (HO et al., 1998; MUÑOZ et al., 2009).

Características inerentes ao vírus influenciam no risco de infecção persistente, visto que diversos genótipos de HPV têm mostrado diferenças quanto ao tempo de *clearance* e, portanto, do seu potencial oncogênico (HILDESHEIM e WANG, 2002; SICHERO, FERREIRA e TROTTIER, 2007). Com isso, a informação referente ao tempo de *clearance* da infecção pelo HPV é importante, pois o maior tempo da persistência da infecção pelo HPV de alto risco é fator determinante para o desenvolvimento de lesões HPV-induzidas no colo uterino. Estimativas recentes apontam que o DNA do HPV pode ser detectado em mais de 291 milhões de mulheres no mundo, das quais 32,0% são infectadas pelos genótipos 16 e 18 (DE SANJOSÉ et al., 2007).

## 2.10 EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO PELO HPV

A prevalência global da infecção por HPV em mulheres com exame citopatológico normal foi de 11,7% em 2010, mas essa prevalência variou em relação à região geográfica, a idade, ao comportamento sexual, ao tabagismo, a paridade, a anticoncepção e entre outros fatores (BURCHELL et al., 2006; BRUNI et al., 2010). A

região do Caribe e o Leste Africano apresentaram prevalência acima de 30,0% para infecção por HPV, enquanto que países da América do Norte apresentaram prevalência de 4,7%. Na América do Sul a prevalência foi de 15,3%, semelhante àquela reportada nos países do Sudeste Asiático. As mulheres mais jovens com menos de 25 anos apresentaram maior positividade para o HPV, a qual diminuiu progressivamente com o aumento da idade. Algumas regiões da América Central e da América do Sul, já reportaram que a prevalência de HPV aumenta consideravelmente em mulheres acima dos 45 anos (BRUNI et al., 2010).

Assim como visto mundialmente, a prevalência da infecção pelo HPV no Brasil diverge muito entre as regiões do país conforme demonstrado na Tabela 2.

TABELA 2 – PREVALÊNCIAS DAS INFECÇÕES PELO HPV DE ALTO E BAIXO RISCO ONCOGÊNICO EM MULHERES EM DIFERENTES REGIÕES DO BRASIL

<b>Autores</b>	<b>Cidade/Estado</b>	<b>Período de realização do estudo</b>	<b>População incluída</b>	<b>Prevalência de HPV (%)</b>
Oliveira et al., 2013	Rio Grande/RS	2010 – 2011	302	18,2%
Entiauspe et al., 2014	Pelotas/RS	2010 – 2011	251	29,9%
Fedrizzi et al., 2008	Florianópolis/SC	2007 – 2008	100	21,0%
Oliveira et al., 2010	Niterói/RJ	2004 – 2005	241	27,4%
Miranda et al., 2012	Ouro Preto/MG	–	399	11,0%
Oliveira, 2011	Goiânia/GO	2008 – 2010	200	47,0%
Vieira et al., 2015	Belém/PA	2012 – 2013	265	25,3%
Santos Filho et al., 2016	Maceió/AL	2010	515	21,5%

Conforme observado na Tabela 2, é possível verificar que a prevalência de HPV varia de 11,0% a 47,0% em diferentes regiões do Brasil. Apesar dessa grande variação de prevalência, todos os estudos incluídos tiveram os genótipos de HPV de alto risco oncogênico como os mais prevalentes na população estudada.

Em decorrência da necessidade da realização de estudos epidemiológicos que abrangessem todo o território nacional sobre a prevalência da infecção por HPV, o Ministério da Saúde juntamente com o Hospital Moinhos de Vento em Porto Alegre/RS desenvolvem o estudo “POP-Brasil-Estudo Epidemiológico sobre a Prevalência Nacional de Infecção pelo HPV”. Os dados preliminares desse estudo divulgados

recentemente mostraram que 54,6% dos homens e mulheres entre 16 a 25 anos estavam infectados pelo HPV, destes cerca de 38,0% estavam infectados por um genótipo de alto risco (ASSOCIAÇÃO HOSPITALAR MOINHOS DE VENTO, 2017).

Dentre os genótipos de alto risco, destacam-se o HPV-16 e 18, pois cerca de 105 milhões de mulheres no mundo serão infectadas por esses genótipos (BURCHELL et al., 2006). Conforme a lesão no colo uterino evolui para casos de carcinoma, a prevalência do HPV-16 e 18 na lesão aumentam, visto que juntos são responsáveis por mais de 70,0% dos cânceres epidermóides e por cerca de 80,0% dos adenocarcinomas do colo uterino (BOSCH e DE SANJOSÉ, 2003; SMITH, LINDSAY e HOOTS, 2007; HOWELL-JONES et al., 2010; *INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER* (IARC), 2017). Entretanto, o HPV-16 é um dos genótipos mais prevalentes em mulheres sexualmente ativas e com citologia cervical normal (VILLA, 1997), além de ser o responsável por cerca de 70,0% dos casos de câncer do colo uterino (MORTAZAVI et al., 2002).

## 2.11 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE COLO UTERINO

Estudos demonstraram que 5,0% de todos os cânceres diagnosticados anualmente no mundo estão associados à infecção pelo HPV (PARKIN, 2006; DALTON-GRIFFIN e KELLAM, 2009). Em relação ao CCU, dados epidemiológicos obtidos a partir de estudos moleculares comprovaram a associação causal desse tipo de câncer com determinados genótipos de HPV (BOSCH, LORINCZ e MUÑOZ, 2002).

O CCU é considerado um problema de saúde pública principalmente em países em desenvolvimento devido sua alta taxa de incidência nessas regiões (BRASIL, 2015). Em 2012, o projeto Globocan estimou 528 mil novos casos de CCU mundialmente, dos quais 83 mil ocorreram em regiões mais desenvolvidas e 445 mil casos ocorreram em regiões menos desenvolvidas (WHO, 2015). Além disso, em 2012 foram estimados 266 mil mortes causadas pelo CCU no mundo, das quais 230 mil ocorreram nas regiões menos desenvolvidas que engloba países do continente Africano, Melanésia, Caribe e da América Latina (WHO, 2015).

Na América Latina e no Caribe, o CCU é o segundo mais incidente e a segunda maior causa de morte por câncer em mulheres (BRASIL, 2015; WHO, 2015). No Brasil,

essa perspectiva não é diferente, visto que durante 1979 até 1990 o CCU foi o segundo tipo de câncer que mais causou mortes em mulheres, sendo que o primeiro foi o câncer de mama (INCA, 2014). No entanto, atualmente o CCU está entre os três tipos de cânceres que mais causam mortes em mulheres, além de ser o terceiro com a maior incidência no Brasil sendo previstos 16340 novos casos com um risco de 15,8 casos/100 mil mulheres em 2016, essa taxa varia entre as diferentes regiões do país (INCA, 2014; BRASIL, 2015). A região Norte tem a maior incidência de CCU com um risco de 23,9 casos/100 mil mulheres, seguido pela região Centro-oeste com 20,7 casos/100 mil mulheres, a região Nordeste possui a terceira maior incidência com 19,4 casos/100 mil mulheres, enquanto a região Sul apresenta 15,1 casos/100 mil mulheres, e por fim, a região Sudeste possui a menor incidência de CCU, apresentando 11,3 casos/100 mil mulheres. (BRASIL, 2015). A diferença da taxa de incidência de CCU entre as regiões do país está relacionada com diversos fatores, dentre eles destacam-se as características econômicas e culturais, as quais interferem no acesso da população aos serviços de saúde especializados e no diagnóstico adequado (DOWNS et al., 2008; BARBOSA et al., 2016).

## 2.12 TÉCNICAS PARA DIAGNÓSTICO DO HPV

O diagnóstico precoce e o tratamento das lesões HPV-induzidas são imprescindíveis na redução da porcentagem de mulheres com CCU, visto que o prognóstico desse tipo de câncer depende diretamente da intensidade e extensão da lesão neoplásica no momento do diagnóstico inicial (CAETANO E CAETANO, 2005; BRINGHENTI et al., 2010).

Existem várias técnicas de diagnóstico e rastreamento da infecção por HPV e do CCU, as quais podem ser classificadas em técnicas citopatológica, histopatológica e molecular. Inicialmente, as técnicas citopatológica e histopatológica eram as únicas utilizadas no diagnóstico do HPV, porém essas técnicas apenas sugerem a infecção por HPV, sendo que detectam as lesões celulares devido ao efeito citopático desse vírus (SOUZA, MELO e CASTRO, 2001; ROCHA, 2016). No entanto, com o desenvolvimento das técnicas moleculares foi possível identificar as sequências do

material genético do vírus na amostra clínica, permitindo diferenciar os inúmeros genótipos de HPV (CAVALCANTI e CARESTIATO, 2006).

### 2.12.1 Técnica citopatológica

A técnica citopatológica, também conhecida como citologia oncótica ou exame Papanicolau, é a mais utilizada no rastreamento de lesões pré-neoplásicas e CCU, sendo pioneira na identificação de alterações compatíveis com a infecção pelo HPV por meio da coloração realizada pelo método de Papanicolau. Mesmo não detectando diretamente o HPV, o exame citopatológico é o mais utilizado na prevenção do CCU devido a sua ampla abrangência, custo reduzido e fácil execução (CAVALCANTI e CARESTIATO, 2006; SANTOS, 2012; ROCHA, 2016). No entanto, essa técnica apresenta muitas limitações que interferem na sua sensibilidade, como a presença de erros durante a coleta e a fixação da amostra, a pequena quantidade de células que permanecem na lâmina para o exame, a subjetividade da leitura da amostra, o grande número de exames insatisfatórios e os resultados falso-negativos (GUEDES, 2002; FRANCO et al., 2006; STABILE et al., 2012).

Esse exame consiste na coleta de amostra cervical para a confecção de um esfregaço em lâmina, o qual é corado pelo método de Papanicolau, e por fim é realizada a análise das células em microscópio óptico, avaliando a disposição e o arranjo das células do epitélio, assim como a presença de alterações celulares que caracterizam a infecção por HPV, como a coilocitose, espessamento da membrana citoplasmática, anisocitose, macrocitose, hiperplasia, atipia nuclear e entre outras alterações (SOUZA, MELO e CASTRO, 2001; CAVALCANTI e CARESTIATO, 2006; BRASIL, 2012). Os resultados anormais obtidos no exame citopatológico são encaminhados para a colposcopia, exame que permite a avaliação ampliada do colo uterino, direciona a biópsia e auxilia no diagnóstico. O diagnóstico alterado obtido no exame citopatológico deve ser confirmado pela técnica histopatológica (CAVALCANTI e CARESTIATO, 2006; DIXIT, BHAVSAR e MARFATIA, 2011).



### 2.12.2 Técnica histopatológica

A técnica histopatológica é caracterizada pela análise do tecido obtido por biópsia, avaliando a morfologia arquitetural e celular com intuito de verificar a presença de lesões e malignidade (MARQUES, 2011). Assim como no exame citopatológico, a técnica histopatológica também consegue detectar os efeitos citopáticos da infecção causada pelo HPV, os quais diminuem com o aumento da gravidade da lesão neoplásica (NAUD et al., 2000; CAVALCANTI e CARESTIATO, 2006; ROSENBLATT et al., 2018). O exame histopatológico é considerado como padrão ouro, pois determina o prognóstico da doença e as medidas terapêuticas a frente dessa patologia (DIXIT, BHAVSAR e MARFATIA, 2011).

### 2.12.3 Técnica molecular baseada na amplificação de ácidos nucleicos

Atualmente existem inúmeras técnicas moleculares baseadas na amplificação de ácidos nucleicos que visam à detecção do material genético do HPV nas amostras. Essas técnicas possuem maior sensibilidade e especificidade comparada aos métodos precursores, como a citopatologia e a histopatologia. Ao contrário dessas técnicas que sugerem a infecção pelo HPV, a técnica molecular confirma a infecção por esse vírus, além de permitir a identificação dos diferentes genótipos do vírus (MOLIJN et al., 2005; ROCHA, 2016). Dessa forma, as técnicas moleculares baseadas na amplificação de ácidos nucleicos têm sido aplicadas na pesquisa médica e na rotina diagnóstica com a finalidade de detecção e genotipagem do HPV permitindo o monitoramento dessa infecção (GRAVITT, PEYTON e ALESSI, 2000; COUtlÉE, ROULEAU e PETIGNAT, 2006; VAN HAMONT et al., 2006; CASTLE et al., 2009). Dentre essas técnicas, destacam-se o *Linear Array HPV Genotyping*<sup>®</sup> e o *Cobas HPV Test*<sup>®</sup>, ambos fabricados pela Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA.

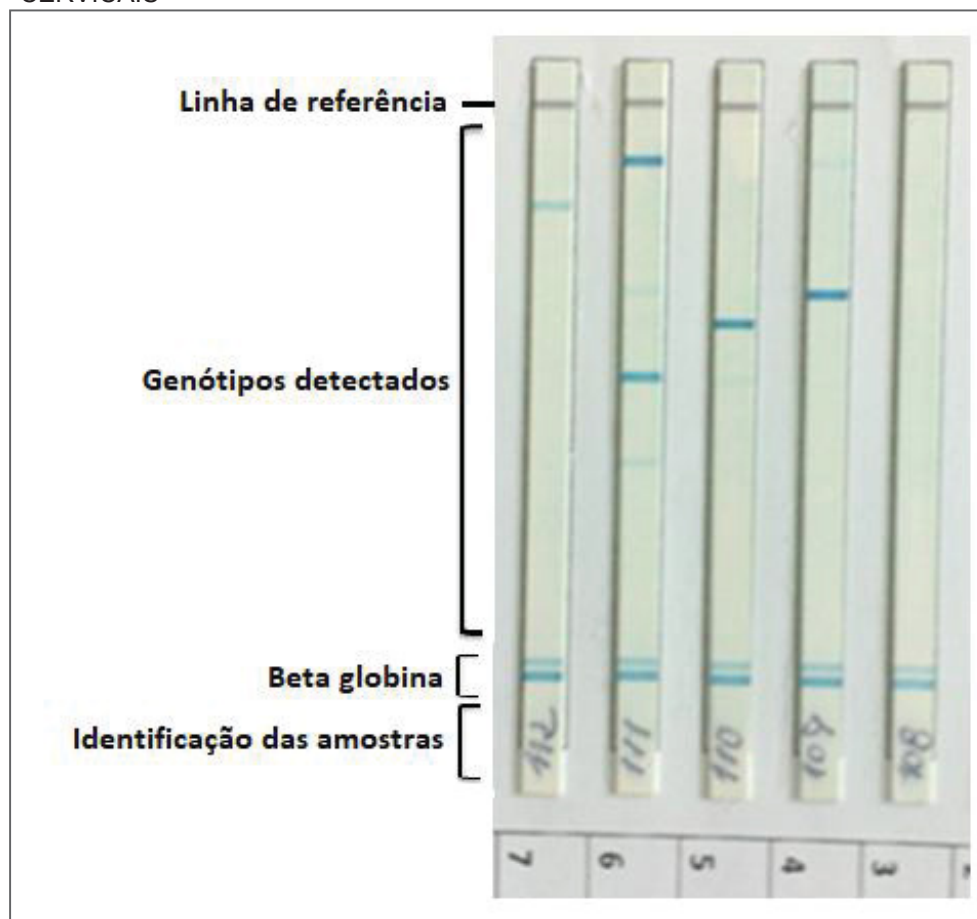
### 2.12.3.1 *Linear Array HPV Genotyping*<sup>®</sup>

O *Linear Array HPV Genotyping*<sup>®</sup> (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA) é o teste de genotipagem de HPV mais utilizado na pesquisa científica e tem se destacado devido a sua alta sensibilidade e a sua capacidade de detectar uma ampla variedade de genótipos de HPV (COUtlÉE, ROULEAU e PETIGNAT, 2006; STEVENS et al, 2007; FROBERG et al., 2008; GRAVITT et al., 2008; STEINAU, SWAN e UNGER, 2008; HOWELL-JONES et al., 2010).

Essa técnica é realizada em duas etapas, sendo que a primeira baseia-se na amplificação por PCR *end-point* da região L1 do material genético viral utilizando os iniciadores PGMY09/11, gerando produtos amplificados de aproximadamente 450bp. Já a segunda etapa consiste na detecção do DNA amplificado utilizando a técnica de *blot* reverso em fita com sondas marcadas (ELFGREN et al., 2002). Este teste tem a capacidade de detectar um total de 37 genótipos de HPV, dos quais 13 são genótipos de HPV de alto-risco: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68; e 24 são genótipos de baixo risco oncogênico: 6, 11, 26, 40, 42, 44 (55), 53, 54, 61, 62, 64, 66, 67, 69, 70, 71, 72, 73 (MM9), 81, 82 (MM4 e IS39), 83 (MM7), 84 (MM8) e 89 (CP6108). Contudo, uma atualização do *International Human Papillomavirus (HPV) Reference Center* referente aos genótipos de HPV mostrou que o HPV-CP6108 foi reclassificado como HPV-89 e o HPV-IS39 como HPV-32 (HOULIHAN et al., 2016). Além disso, essa técnica também permite identificar infecções por múltiplos genótipos de HPV, as quais podem estar presentes em até 35,0% das mulheres (MOLANO et al., 2003). O controle interno do ensaio é realizado pela amplificação e detecção do gene da beta globina humana (TORRES et al., 2012).

A Figura 6 apresenta as tiras do kit *Linear Array*<sup>®</sup> (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA) apresentando a hibridização dos produtos da PCR para identificação dos genótipos presentes em amostras cervicais

FIGURA 6 – TIRAS DO KIT *LINEAR ARRAY HPV GENOTYPING*<sup>®</sup> (ROCHE MOLECULAR SYSTEMS, PLEASANTON, CA) APRESENTANDO A HIBRIDIZAÇÃO DOS PRODUTOS DA PCR PARA IDENTIFICAÇÃO DOS GENÓTIPOS DE HPV PRESENTES EM AMOSTRAS CERVICAIS



FONTE: O autor (2018).

A boa eficiência desse método para a detecção de infecções múltiplas pelo HPV se baseia principalmente na concentração considerada ótima dos pares de *primers* para cada genótipo de HPV, ajustada para minimizar qualquer competição intra-ensaio devido à co-amplificação dos diferentes produtos possíveis (COUPLÉE, ROULEAU e PETIGNAT, 2006). O limite de detecção dos 18 genótipos (HPV-6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73 (MM9), 81, 82 (MM4), 83 (MM7), 84 (MM8), IS39 e CP6108) dos 37 genótipos identificados varia de 53 a 8089 cópias por mL de amostra (TORRES et al., 2012).

### 2.12.3.2 Cobas HPV Test<sup>®</sup>

O *Cobas HPV Test<sup>®</sup>* (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA) é um dos testes mais utilizados na rotina diagnóstica e aprovado pelo órgão Norte-Americano *Food and Drug Administration* (FDA). Este teste detecta os genótipos de HPV-16 e 18 separadamente, bem como um conjunto de outros 12 genótipos de HPV de alto risco oncogênico (HPV-31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68) que são detectados, mas não identificados separadamente (LEVI et al., 2016).

Mesmo tendo sido validado por trabalhos recentes, como Heideman et al. (2011), Llorevas et al., (2013) e Cui et al. (2014), o *Cobas<sup>®</sup>* tem sido amplamente utilizado, não apenas na rotina diagnóstica, mas em vários trabalhos presentes na literatura, os quais comprovaram sua alta sensibilidade para detecção da infecção por HPV (GAGE et al., 2012; REBOLJ et al., 2014; LEVI et al., 2016). A sensibilidade analítica dessa técnica depende do genótipo e varia entre 80 a 2400 cópias da sequência alvo por mL de amostra (TORRES et al., 2012).

O sistema *Cobas<sup>®</sup>* é um teste totalmente automatizado que tem a capacidade de analisar até 280 amostras em um dia. Esse teste é constituído de dois instrumentos: o *Cobas x 480* e o *Cobas z 480*. O primeiro realiza a extração do DNA e a preparação da mistura de PCR, já o segundo é responsável por executar a PCR. A obtenção e interpretação dos resultados são realizadas pelo *software Cobas 4800 System* (TORRES et al., 2012).

Assim como *Linear Array HPV Genotyping<sup>®</sup>*, o sistema *Cobas HPV Test<sup>®</sup>* também utiliza a amplificação do gene constitutivo da beta-globina como controle interno e se baseia na amplificação de sequência da região L1 do DNA viral, mas utilizando a técnica de PCR em tempo real, e não *end-point* o como o primeiro método (LEVI et al., 2016). O *Cobas<sup>®</sup>* utiliza quatro fluoróforos para a detecção dos produtos da PCR, um fluoróforo para o gene da beta-globina, um para HPV-16, outro para HPV-18 e um para os doze genótipos de HPV restantes que são detectados em conjunto (TORRES et al., 2012). Embora seja descrita uma concordância de 91% entre as duas técnicas, o *Linear Array HPV Genotyping<sup>®</sup>*, apresenta uma maior positividade para o HPV dentre os casos discordantes (GAGE et al., 2012).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Comparar os testes *Linear Array HPV Genotyping*<sup>®</sup> (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA) e *Cobas HPV Test*<sup>®</sup> (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA) quanto a positividade de Papilomavírus humano (HPV) de alto risco oncogênico em mulheres em idade reprodutiva.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a prevalência dos genótipos de HPV em mulheres imunocompetentes utilizando os dois sistemas de detecção e genotipagem de HPV;
- Comparar as duas técnicas quanto à positividade para infecção pelos genótipos de HPV de alto risco 16 e 18.
- Identificar os casos discordantes quanto à positividade para HPV de alto risco resultantes das análises das duas técnicas empregadas.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo transversal, realizado de março de 2016 a fevereiro de 2018, que incluiu 162 mulheres que procuraram as Unidades Básicas de Saúde (UBS) do município de Botucatu/SP e o Serviço de Orientação e Prevenção do Câncer (SOPC) no município de Bauru/SP para coleta do exame preventivo do câncer de colo uterino.

Os critérios de inclusão para as mulheres atendidas nessas unidades foram: idade entre 18 e 50 anos, não-gestantes, não-menopausadas, ausência de soroconversão para o vírus da imunodeficiência humana (HIV), ausência de tratamento de infecções do trato genital inferior no período de 30 dias e no mínimo 72 horas de abstinência sexual. Já as amostras que foram consideradas como materiais inadequados devido à negatividade da beta globina foram excluídos desse estudo.

Foram incluídas nesse estudo mulheres com alto risco para a positividade da infecção pelo HPV. As 93 (57,4%) mulheres incluídas nas UBS do município de Botucatu/SP fazem parte da coorte do estudo longitudinal “Prevalência de coinfeção e fatores associados ao Papilomavírus humano (HPV) e à *Chlamydia trachomatis* em mulheres em idade reprodutiva atendidas em Programa de Prevenção do Câncer do Colo Uterino na região sudeste do Brasil” e apresentaram resultado anterior de positividade para o HPV. Tal estudo encontra-se em andamento no Laboratório de Imunopatologia da Relação Materno Infantil da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPLEX) da Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP. Já as 69 (42,6%) mulheres incluídas no SOPC em Bauru/SP foram encaminhadas a esse serviço de referência após resultado alterado do exame preventivo do câncer de colo uterino realizado nas UBS do município de Bauru/SP e região.

As participantes incluídas nesse estudo foram informadas quanto ao objetivo do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Durante a entrevista, as mulheres responderam a um questionário para obtenção dos dados sócio-demográficos, história ginecológica, hábitos sexuais e comportamentais. As

entrevistas foram realizadas pelas enfermeiras das unidades, as quais foram devidamente treinadas.

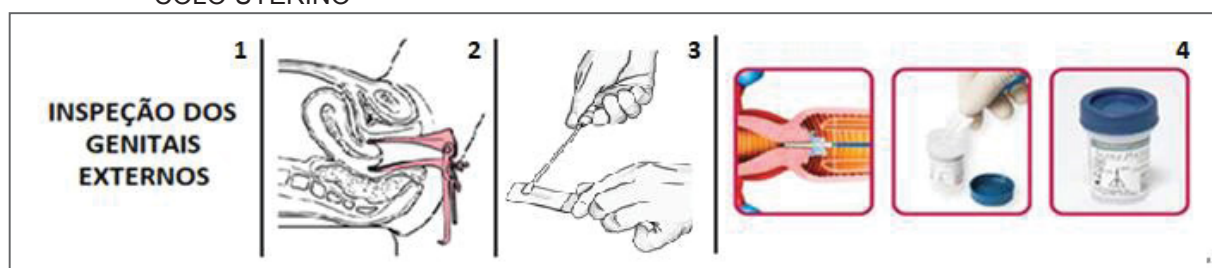
#### 4.2 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO

Os procedimentos para obtenção dos materiais biológicos foram realizados pelas enfermeiras das UBS de Botucatu/SP e do SOPC de Bauru/SP. Para a coleta das amostras cervicais foi realizado o exame especular ginecológico que consistiu nas seguintes etapas (Figura 7):

1. Inspeção dos genitais externos para detecção de lesões vulvares e perianais;
2. Afastamento das paredes vaginais, com especulo bi-valvo de Collins, isento de lubrificante para inspeção das mesmas, bem como do colo uterino;
3. Coleta do conteúdo do terço médio da parede vaginal com o auxílio de um *swab*;
4. Coleta do conteúdo endocervical e ectocervical por meio do sistema *SurePath*<sup>®</sup> (Tripath Imaging, Burlington, NC) para a citologia líquida.

As amostras coletadas do terço médio da parede vaginal foram utilizadas para a confecção de lâminas para classificação da microbiota vaginal após coloração de Gram. Já as amostras cervicais coletadas pelo sistema *SurePath*<sup>®</sup> (Tripath Imaging, Burlington, NC) foram utilizadas para a detecção e genotipagem de HPV utilizando os métodos *Linear Array*<sup>®</sup> e *Cobas*<sup>®</sup>.

FIGURA 7 – SEQUÊNCIA DE PROCEDIMENTOS DO EXAME ESPECULAR GINECOLÓGICO PARA A COLETA DAS AMOSTRAS CERVICAIS PARA O EXAME PREVENTIVO DO CÂNCER DE COLO UTERINO



FONTE: Adaptado de <sup>1</sup> O autor (2018); <sup>2</sup> Medical dictionary (2009); <sup>3</sup> Remote Primary Health Care Manuals (2018) e <sup>4</sup> DMED news (2018).

## 4.3 PESQUISA DA DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DO HPV

### 4.3.1 *Linear Array HPV Genotyping*<sup>®</sup>

A detecção e genotipagem do HPV pela técnica de *Linear Array*<sup>®</sup> foram realizadas no Laboratório de Imunopatologia da Relação Materno Infantil na UNIPEX da Faculdade Medicina de Botucatu/UNESP.

As amostras cervicais coletadas em *SurePath*<sup>®</sup> (Tripath Imaging, Burlington, NC) foram armazenadas a -20°C até o momento do processamento. O DNA das amostras foram extraídos utilizando o kit de extração de DNA *AmpliLute Liquid Media Extraction* (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA).

Após a extração do DNA das amostras, foi realizada a detecção e genotipagem do HPV utilizando o kit *Linear Array HPV Genotyping*<sup>®</sup> (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA). Foi realizada a amplificação da região do gene L1 do HPV utilizando os iniciadores PGMY09/11 (BAUER, TING e GREER, 1991). Após a amplificação do DNA do HPV, realizou-se a genotipagem do HPV pelo método de hibridização com sondas oligonucleotídicas do kit *Linear Array*<sup>®</sup>. O produto amplificado foi hibridizado em uma tira contendo sondas oligonucleotídicas específicas para 37 genótipos de HPV. Em seguida, a detecção do HPV foi realizada por meio de uma reação colorimétrica para identificação do genótipo de HPV presente em cada amostra. Finalmente, a posição das bandas presentes nas tiras foram comparadas com a escala fornecida pelo fabricante para a confirmação da extração do DNA com a positividade da beta globina e para a obtenção do resultado da positividade ou negatividade dos genótipos de HPV. Todas as amostras foram processadas conforme as instruções do fabricante.

### 4.3.2 *Cobas HPV Test*<sup>®</sup>

A detecção e genotipagem do HPV pela técnica de *Cobas HPV Test*<sup>®</sup> foram realizadas no Laboratório de Patologia do Hospital do Câncer de Barretos, Barretos/SP. As amostras presentes no *SurePath*<sup>®</sup> (Tripath Imaging, Burlington, NC) provenientes das mulheres participantes desse estudo foram utilizadas na detecção e na genotipagem de HPV por essa técnica. Esta é uma metodologia totalmente



automatizada que consistiu na amplificação de sequência do gene L1 do DNA do vírus e identifica HPV-16 e 18 separadamente, bem outros 12 genótipos de HPV de alto risco (HPV-31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, e 68), de diferentes sinais de fluorescência emitidos pela clivagem da sonda *Taqman* durante a amplificação. O resultado é expresso como positividade para “HPV-16” e/ou “HPV-18” e/ou “outros HPV de alto risco”.

#### 4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O *software* utilizado para as análises foi o *Excel* (Microsoft Corporation, Redmond, WA). A prevalência dos genótipos do HPV foi determinada por meio do cálculo da prevalência (Figura 8).

FIGURA 8 – CÁLCULO DA PREVALÊNCIA

$$\text{Cálculo da Prevalência: } \frac{\text{número de amostras positivas} \times 100}{\text{número total de amostra}}$$

FONTE: WAGNER (1998).

A determinação da concordância entre as duas técnicas de detecção e genotipagem de HPV foi realizada pelo teste estatístico *kappa* em *software* disponível online ([www.vassarstats.net/kappa.html](http://www.vassarstats.net/kappa.html)). A interpretação do resultado do teste *kappa* foi realizada de acordo com a Tabela 3.

TABELA 3 – INTERPRETAÇÃO DO RESULTADO DO TESTE *kappa*

<b>Kappa</b>	<b>Grau de concordância</b>
<0	Sem concordância
0 – 0,19	Insignificante
0,20 – 0,39	Mediana
0,40 – 0,59	Moderada
0,60 – 0,79	Considerável
0,80 – 1,00	Quase perfeita

FONTE: LANDIS e KOCH (1977).

## 5. RESULTADOS

Foram incluídas nesse estudo 162 mulheres atendidas nas UBS de Botucatu/SP e no SOPC de Bauru/SP. As participantes apresentaram média de idade de 32,6 anos ( $\pm 9,8$  anos) no momento da inclusão no estudo. Até o momento as amostras cervicais de 162 mulheres foram processadas pela técnica de *Cobas*<sup>®</sup>, enquanto que 93 foram processadas pela técnica de *Linear Array*<sup>®</sup>. A Tabela 4 apresenta os dados clínicos das mulheres incluídas no estudo obtido por meio da solicitação do exame citopatológico.

TABELA 4 – DADOS CLÍNICOS DAS 162 MULHERES INCLUÍDAS NO ESTUDO

Variáveis	Número	%
<b>Microbiota vaginal*</b>		
Normal	106	65,4%
Intermediária/Vaginose Bacteriana	49	30,2%
Material inadequado para análise	7	4,3%
<b>Resultado do exame citopatológico</b>		
Negativo para células neoplásicas malignas	114	70,4%
ASC-US <sup>1</sup>	23	14,2%
LSIL <sup>2</sup> /HSIL <sup>3</sup>	21	13,0%
Material insuficiente	4	2,5%

\* Microbiota vaginal classificada de acordo com o sistema de Nugent et al. (1991)

<sup>1</sup> ASC-US: Células escamosas atípicas de significado indeterminado

<sup>2</sup> LSIL: Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau

<sup>3</sup> HSIL: Lesão intraepitelial escamosa de alto grau

Das 162 amostras cervicais submetidas à análise pelo sistema *Cobas*<sup>®</sup>, 63 (38,9%) foram HPV-positivas. O HPV-16 foi o genótipo mais frequentemente detectado pelo sistema *Cobas*<sup>®</sup>, e esteve presente em 18 (28,6%) amostras, das quais 7 (38,9%) apresentaram infecções múltiplas, visto que foram positivas para “outros HPV de alto risco”, além do HPV-16. O HPV-18 esteve presente em 7 (11,1%) amostras, das quais 5 (71,4%) também foram positivas para “outros HPV de alto risco”. Além disso, 38 (60,3%) amostras foram positivas somente para “outros HPV de alto risco” compreendidos no teste.

Em relação ao teste *Linear Array*<sup>®</sup>, 93 (57,4%) amostras foram testadas até o momento. Dessas, um total de 56 (60,2%) amostras foram HPV-positivas, sendo que

44 (78,6%) foram positivas para um único genótipo, enquanto que 12 (21,4%) apresentaram infecções mistas. Quanto ao risco oncogênico, 25 (44,6%) mulheres apresentaram infecção por pelo menos um genótipo de HPV de baixo risco, enquanto que 38 (67,8%) mulheres foram positivas para ao menos um genótipo de HPV de alto risco. O HPV-16 foi o genótipo mais frequente, presente em 11 (19,6%) amostras, seguido pelo HPV-70 presente em 6 (10,7%) amostras e pelos HPV-45, 52 e 58, onde cada um desses genótipos estavam presentes em 5 (8,9%) amostras. O HPV-18 esteve presente em apenas 2 (3,6%) amostras. As 69 (42,6%) amostras remanescentes incluídas no estudo, já foram submetidas à extração do DNA e à amplificação e detecção do gene da beta globina. Os demais resultados da genotipagem de HPV aguardam a importação dos kits adquiridos para a finalização do processamento.

A Tabela 5 mostra os resultados disponíveis das análises das 93 amostras que foram testadas pelas duas técnicas, *Linear Array*<sup>®</sup> e *Cobas*<sup>®</sup>.

Em relação as 93 amostras com resultados disponíveis pelas duas técnicas, 56 (60,2%) foram HPV-positivas pelo *Linear Array*<sup>®</sup>, sendo 38 (67,8%) de alto risco e 18 (32,1%) de baixo risco. Já a positividade pelo *Cobas*<sup>®</sup> foi observada em 29 (31,2%) amostras que tiveram resultados positivos para o HPV de alto risco. Portanto, um total de 27 amostras apresentaram resultados diferentes em relação à positividade. Dessas, 17 (63,0%) foram positivas para HPV de baixo risco oncogênico pelo *Linear Array*<sup>®</sup>, enquanto que esses genótipos não são compreendidos no sistema *Cobas*<sup>®</sup>. No entanto, as 10 (37,0%) amostras remanescentes foram positivas para os genótipos de alto risco (HPV-16, 35, 39, 51, 56, 58, 59 e 68) pelo *Linear Array*<sup>®</sup> e que, portanto, deveriam ter sido detectadas pelo sistema *Cobas*<sup>®</sup>, sendo consideradas amostras discordantes. Como o *Cobas*<sup>®</sup> contempla apenas a detecção e genotipagem de HPV de alto risco, as amostras positivas para os HPV de baixo risco pelo *Linear Array*<sup>®</sup> foram consideradas negativas para o HPV de alto risco na comparação entre as duas técnicas. Assim, a concordância calculada referente à positividade para HPV de alto risco pelas duas técnicas foi considerável com um valor de *kappa* de 0,7460.

Dentre as amostras positivas, o HPV-16 foi o genótipo mais prevalente pelos dois métodos, um total de 9 (31,0%) amostras foram positivas pelo *Cobas*<sup>®</sup> e 11 (28,9%) pelo *Linear Array*<sup>®</sup>, resultando em um valor de *kappa* de 0,8881 que é considerado uma

concordância quase perfeita em relação às duas técnicas. O HPV-18 também apresentou uma concordância quase perfeita referente às técnicas de *Linear Array*<sup>®</sup> e *Cobas*<sup>®</sup>, pois foi positivo para apenas 2 amostras entre as 93 amostras comparáveis, resultando em um valor de *kappa* de 1.

Em relação aos “outros HPV de alto risco” (HPV-31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68) que são identificados de forma conjunta pelo sistema *Cobas*<sup>®</sup>, apresentaram positividade em 21 (72,4%) amostras pelo *Cobas*<sup>®</sup> e em 28 (73,7%) pelo *Linear Array*<sup>®</sup>, resultando em um valor de *kappa* de 0,7524, sendo considerada uma concordância considerável.

As 69 amostras que aguardam serem analisadas pelo *Linear Array*<sup>®</sup> já possuem o resultado disponível pelo sistema *Cobas*<sup>®</sup>. Desse total, 31 (45,0%) amostras foram HPV-positivas. Dessas, 8 (25,8%) amostras foram positivas para o HPV-16, das quais 4 (50,0%) também apresentaram positividade para “outros HPV de alto risco”. Quanto ao HPV-18, 5 (16,1%) amostras foram positivas para esse genótipo, das quais 4 (80,0%) coexistiram com “outros HPV de alto risco”. As 18 (58,0%) amostras positivas remanescentes apresentaram resultado compatível com “outros HPV de alto risco” apenas.

TABELA 5 – COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DOS TESTES *LINEAR ARRAY*<sup>®</sup> E *COBAS*<sup>®</sup> DAS 93 MULHERES INCLUÍDAS NO ESTUDO COM RESULTADOS DISPONÍVEIS PARA AS DUAS TÉCNICAS

<i>Linear Array Genotyping</i> <sup>®</sup>	<i>Cobas HPV Test</i> <sup>®</sup>							
	Alto risco		HPV-16		HPV-18		Outros*	
	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não	Sim	Não
Alto risco	28 (30,1%)	10 (10,7%)						
Sim	1 (1,0%)	54 (58,0%)						
Não								
HPV-16								
Sim			9 (9,7%)	2 (2,1%)				
Não			0 (0,0%)	82 (88,1%)				
HPV-18								
Sim					2 (2,1%)	0 (0,0%)		
Não					0 (0,0%)	91 (97,8%)		
Outros*								
Sim							20 (21,5%)	8 (8,6%)
Não							1 (1,0%)	64 (68,8%)

\*Outros: Outros HPV de alto risco detectados pelo *Cobas*<sup>®</sup> de forma conjunta compreendendo os genótipos 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68.

## 6. DISCUSSÃO

Esse estudo transversal incluiu mulheres de alto risco para a infecção pelo HPV para comparação de duas técnicas amplamente utilizadas para detecção e genotipagem de HPV. Tal medida foi adotada para aumentar a taxa de detecção do vírus e, dessa forma, permitir que a comparação entre as duas técnicas propostas fosse baseada num tamanho amostral adequado. Enquanto que a técnica de *Cobas*<sup>®</sup> é a mais utilizada na rotina diagnóstica, à técnica de *Linear Array*<sup>®</sup> é a eleita na maioria dos estudos científicos e geralmente associada a uma maior sensibilidade (COUTLÉE, ROULEAU e PETIGNAT, 2006; STEVENS et al, 2007). Essas observações estão de acordo com os resultados desse estudo e, considerando a tendência crescente da utilização da genotipagem de HPV na rotina ginecológica, são fundamentais para o direcionamento dos serviços diagnósticos para o método mais adequado à sua realidade.

Das 93 amostras com resultados disponíveis para as duas técnicas, 17 (18,3%) amostras foram positivas para HPV de baixo risco pelo o *Linear Array*<sup>®</sup>, não sendo detectadas pelo sistema *Cobas*<sup>®</sup>. Esse resultado já era esperado, pois o *Cobas*<sup>®</sup> só detecta genótipos de alto risco oncogênico (LEVI et al., 2016). Por esse fato, essas amostras foram consideradas como negativas para HPV de alto risco na comparação entre as técnicas.

A partir disso, a prevalência da infecção pelo HPV de alto risco encontrada nesse estudo foi de 40,9% pelo *Linear Array*<sup>®</sup> e de 31,2% pelo *Cobas*<sup>®</sup> em relação às amostras que podem ser comparadas. Esses resultados se mostraram diferentes em comparação à literatura (YOUSSEF et al., 2016). Deve-se ressaltar que tal diferença pode ser explicada pelas características da população desse estudo que foi constituída por mulheres com alto risco para a infecção por HPV independente do resultado citopatológico. Nesse sentido, o estudo realizado por Youssef et al. (2016), utilizando o teste *Linear Array*<sup>®</sup>, apresentaram prevalência de 17,7% para mulheres com resultado citológico normal e de 56,5% em mulheres com citologia alterada.

Em relação às diferentes positivities da infecção pelo HPV oriundas das duas técnicas, a diferença encontrada nesse estudo é muito maior àquela reportada por Gage et al. (2012) que encontraram positividade de 83,6% e 83,2% para o HPV para o,

*Linear Array*<sup>®</sup> e *Cobas*<sup>®</sup>, respectivamente, em mulheres com citologia alterada. Esses mesmos autores demonstraram que a prevalência de HPV em mulheres com citologia normal foi à mesma (44,8%) pelo *Linear Array*<sup>®</sup> e pelo *Cobas*<sup>®</sup>. No entanto, deve-se ressaltar que Gage et al. (2012) incluíram apenas mulheres com citologia alterada ou normal, enquanto que no presente estudo a população foi incluída independentemente dos resultados das citologias anteriores. Até mesmo no SOPC (Bauru/SP), a população atendida também compreende aquelas mulheres com resultado “células atípicas de significado indeterminado” no exame citopatológico.

Cerca de 10,7% das amostras que podem ser comparadas apresentaram resultados discordantes para o *Linear Array*<sup>®</sup> e para o *Cobas*<sup>®</sup> e foram positivas para os genótipos 16, 35, 39, 51, 56, 58, 59 e 68 pelo o *Linear Array*<sup>®</sup>, enquanto que no sistema *Cobas*<sup>®</sup> apresentaram-se como HPV-negativas mesmo sendo genótipos que são compreendidos na detecção por esse sistema. Uma possível explicação para a discordância de resultados entre as duas técnicas se deve a característica do *Linear Array*<sup>®</sup>, o qual é mais provável em gerar resultados positivos para os “12 outros HPV de alto risco” em comparação ao *Cobas*<sup>®</sup> (CASTLE et al., 2009). Entretanto, o estudo de Gage et al. (2012) mostraram que o *Cobas*<sup>®</sup> gerou mais resultados positivos para o HPV-16 e 18 em relação ao *Linear Array*<sup>®</sup> entre as amostras com resultados discordantes. No entanto, essa relação não foi detectada neste estudo, visto que entre as amostras com resultados discordantes, duas foram positivas para o genótipo 16 pelo *Linear Array*<sup>®</sup>, enquanto que no *Cobas*<sup>®</sup> tiveram resultado negativo. É difícil estabelecer o motivo dessa diferença, pois as amostras foram coletas pelo sistema *SurePath*<sup>®</sup> (Tripath Imaging, Burlington, NC), o qual é mais indicado para a técnica de *Cobas*<sup>®</sup> devido ao aumento da sua sensibilidade (LEVI et al., 2016). Outra discordância que chamou atenção nesse estudo foi referente a uma amostra que apresentou positividade para “outros HPV de alto risco” pelo *Cobas*<sup>®</sup>, enquanto que no *Linear Array*<sup>®</sup> apresentou infecção mista para genótipos de baixo risco (HPV-11, 81 e 82). Uma das possíveis explicações para essa divergência está relacionada aos genótipos de baixo risco, os quais podem ter uma similaridade filogenética com algum dos doze HPV de alto risco que são identificados em conjunto pelo sistema *Cobas*<sup>®</sup>, ocasionando uma amplificação inespecífica por parte desse sistema.

A taxa de concordância desse estudo foi de 89,2% entre as amostras com resultados comparáveis. Essa porcentagem de concordância se mostrou relativamente próxima em relação aos outros estudos, como o Gage et al. (2012) que apresentaram taxa de concordância de 91,0%, enquanto que o Castle et al. (2009) mostraram uma taxa de 94,1%, confirmando a alta concordância na detecção e genotipagem de HPV utilizando essas duas metodologias.

Conforme os estudos Iwasaki et al. (2014) e de Miranda et al. (2012) o HPV-16 é o genótipo mais prevalente entre mulheres HPV-positivas. Essa relação também foi observada nesse estudo, pois o HPV-16 teve maior positividade nos dois métodos de detecção e genotipagem de HPV. O HPV-18 teve uma concordância quase perfeita nesse estudo, porém teve uma baixa prevalência, não permitindo, portanto, traçar conclusões definitivas. Dessa forma, estudos futuros são necessários para tal comparação. Os “outros HPV de alto risco” apresentaram uma concordância considerável com um *kappa* de 0,7524. Esse resultado se mostrou inferior ao da literatura, visto que a concordância entre o *Cobas*<sup>®</sup> e o *Linear Array*<sup>®</sup> no estudo de Castle et al. (2009) teve um *kappa* de 0,9100 em relação aos “outros HPV de alto risco”. Além de confirmar que o *Linear Array*<sup>®</sup> tem a maior probabilidade de gerar resultados positivos para “outros HPV de alto risco” em comparação ao sistema *Cobas*<sup>®</sup>, o que também foi confirmado nesse estudo (CASTLE, 2009).

Por fim, os resultados desse estudo mostraram uma alta concordância global entre os dois métodos de detecção e genotipagem de HPV referente aos genótipos de alto risco, embora menor do que aquela reportada na literatura (CASTLE et al., 2009; GAGE et al., 2012).



## 7. CONCLUSÃO

A detecção e a genotipagem da infecção pelo HPV é importante para identificar as mulheres em risco de desenvolver lesões HPV-induzidas. Considerando a tendência da recomendação na utilização de técnicas de detecção de HPV juntamente com o exame citopatológico, torna-se fundamental a realização de estudos que visam comparar as metodologias existentes para futura adequação nos serviços diagnósticos. Dessa forma, os achados desse estudo mostraram que a técnica de *Cobas*<sup>®</sup> apresenta uma alta taxa de concordância em relação ao *Linear Array*<sup>®</sup> e, portanto, pode ser considerado como teste empregado em rastreamento da população, tendo em vista seu menor custo e praticidade durante a execução da técnica. A partir disso, a utilização de métodos de diagnósticos eficientes para a detecção da infecção pelo HPV permite o diagnóstico precoce das lesões, além de contribuir na recomendação do uso terapêutico das vacinas contra o HPV, as quais podem ser empregadas na reversão das lesões HPV-induzidas, evitando a realização de procedimentos mais invasivos, como a conização.

## REFERÊNCIAS

1. ALMEIDA NETO, A. **Papillomavirus humano e o polimorfismo do códon 71 (alelo-G) do gene TP53 no carcinoma escamoso oral**. 82 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Geral) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007. Disponível em: <[http://repositorio.ufpe.br:8080/bitstream/handle/123456789/9031/arquivo8850\\_1.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.ufpe.br:8080/bitstream/handle/123456789/9031/arquivo8850_1.pdf?sequence=1&isAllowed=y)> Acesso em: 20 nov. 2017.
2. ANJOS, S. J. S. B et al. Fatores de risco para câncer de colo do útero segundo resultados de IVA, citologia e cervicografia. *Rev. Esc. Enferm. USP*, v. 44, n. 4, p. 912-20, 2010.
3. ARAÚJO, M. A. L. et al. Doenças sexualmente transmissíveis atendidas em unidade primária de saúde no Nordeste do Brasil. *Cad. Saúde Colet.*, v. 23, n. 4, p. 347-353, 2015.
4. ASSOCIAÇÃO HOSPITALAR MOINHOS DE VENTO. Estudo Epidemiológico sobre a Prevalência Nacional de Infecção pelo HPV (POP-Brasil): Resultados preliminares – Associação Hospitalar Moinhos de Vento – Porto Alegre, 2017. Disponível em: <<https://www.sboc.org.br/images/downloads/LIVRO-POP.pdf>> Acesso em: 16 jan. 2018.
5. BAUER, H. M.; TING, Y.; GREER, C. E. Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *Jama*; v. 265, n. 4, p. 472 - 7, 1991.
6. BARBOSA, I. R. et al. Desigualdades regionais na mortalidade por câncer de colo de útero no Brasil: tendências e projeções até o ano 2030. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 21, n. 1, p. 253-262, 2016.
7. BARRIOS, E.; GARAU, M. Cáncer: magnitud del problema en el mundo y en Uruguay, aspectos epidemiológicos. *Univ. Repúb. Urug.*, v. 4, n. 1, p. 9-46, 2017.
8. BERNARD, H. U. et al. Classification of Papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, v. 401, n. 1, p. 70–79, 2010.

9. BLACK, C. C. et al. Use of a Linear Array for the detection of human papillomavirus genotypes in head and neck cancer. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, v. 134, n. 12, p. 1813-817, 2010.
10. BOSCH, F. X.; DE SANJOSÉ, S. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer--burden and assessment of causality. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.*, v. 31, p. 3-13, 2003.
11. BOSCH, F. X.; LORINCZ, A.; MUÑOZ, N. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J. Clin. Pathol.*, v. 55, n. 4, p. 244 - 65, 2002.
12. BRASIL. Ministério da Saúde. Técnico citopatologia, 2012. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/tecnico\\_citopatologia\\_caderno\\_referencia\\_1.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/tecnico_citopatologia_caderno_referencia_1.pdf)> Acesso em: 22 jan. 2018.
13. BRASIL. Ministério da Saúde. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil/Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), 2015. Disponível em: <<https://www.policiamilitar.mg.gov.br/conteudoportal/uploadFCK/saude/18112016153229991.pdf>> Acesso em: 21 dez. 2017.
14. BRINGHENTI, M. E. et al. Prevenção do câncer cervical: associação da citologia oncológica a novas técnicas de biologia molecular na detecção do Papilomavírus Humano (HPV). *DST – J. bras. Doenças Sex. Transm.*, v. 22, n. 3, p. 135-140, 2010.
15. BRUNI, L. et al. Cervical Human Papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J. Infect. Dis.*, v. 202, n. 12, p. 1789-1799, 2010.
16. BULKMANS, N. W. J. et al. Human papillomavirus DNA testing for the detection of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 and cancer: 5-year follow-up of a randomised controlled implementation trial. *Lancet*, v. 370, n. 9601, p. 1764-1772, 2007.
17. BURCHELL, A, N. et al. Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine.*, v. 24, Suppl 3:S3/52-61, 2006.

18. BURLAMAQUI, J. C. F. et al. Human Papillomavirus and students in Brazil: an assessment of knowledge of a common infection - preliminary report. *Braz J Otorhinolaryngol.*, v. 83, n. 2, p. 120-125, 2017.
19. CAETANO, R.; CAETANO, C. M. M. Custo-efetividade no rastreamento do câncer cérvico-uterino no Brasil: um estudo exploratório. Rio de Janeiro, 2005. Disponível em: <  
<http://www.inca.gov.br/inca/Arquivos/HPV/relatorio%20do%20estudo%20HPV.pdf>  
> Acesso em: 21 dez. 2017.
20. CAMARA, G. N. N. L. et al. Os Papilomavírus Humanos – HPV: histórico, morfologia e ciclo biológico. *Universitas Ciências da Saúde*, v. 1, n. 1, p. 149-158, 2008.
21. CAMPOS, N. G. et al. persistence of concurrent infections with multiple human papillomavirus types: a populationbased cohort study. *J Infect Dis.*, v. 203, n. 6, p. 823-827, 2011.
22. CARVALHO, N. O. et al. Comparison of HPV genotyping by type-specific PCR and sequencing. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 105, n. 1, p. 73-78, 2010.
23. CASTLE, P. E. et al. Evaluation of a prototype real-time PCR assay for carcinogenic human papillomavirus (HPV) detection and simultaneous HPV genotype 16 (HPV16) and HPV18 genotyping. *J. Clin. Microbiol.*, v. 47, n. 10, p. 3344 - 7, 2009.
24. CAVALCANTI, S. M. B.; CARESTIATO, F. N. Infecções causadas pelos papilomavírus humanos: atualização sobre aspectos virológicos, epidemiológicos e diagnóstico. *DST – J. bras. Doenças Sex. Transm.*, v. 18, n. 1, p. 73-79, 2006.
25. CHAN, J. K. et al. HPV infection and number of lifetime sexual partners are strong predictors for 'natural' regression of CIN 2 and 3. *Br J Cancer.*, v. 89, n. 6, p. 1062-1066, 2003.
26. CHESSON, H. W. et al. The Estimated lifetime probability of acquiring human papillomavirus in the United States. *Sex Transm Dis.*, v. 41, n. 11, p. 660-664, 2014.

27. COBRINIK, D. et al. The retinoblastoma protein and cell cycle controle. *Cell.*, v. 81, n. 3, p. 323–330, 1992.
28. COSER, J. et al. Cervical human papillomavirus infection a persistence: a clinic-based study in the countryside from South Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.*, v. 20, n. 1, p. 61–68, 2016.
29. COUtlÉE, F.; ROULEAU, D.; PETIGNAT, P. Enhanced detection and typing of Human Papillomavirus (HPV) DNA in anogenital samples with PGMV primers and the linear array HPV genotyping test. *J. Clin. Microbiol.*, v. 44, n. 6, p.1998-2006, 2006.
30. CROOK, T.; VOUSDEN, K. H. Degradation of p53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and trans-activation. *Cell.*, v. 67, n. 3, p. 547-556, 1991.
31. CUI, M. et al. Clinical performance of roche cobas 4800 HPV test. *J. Clin. Microbiol.*, v. 52, n. 6, p. 2210-2211, 2014.
32. DALTON-GRIFFIN, L.; KELLAM, P. Infectious causes of cancer and their detection. *J. Biol.*, v. 8, n. 7, p. 67, 2009.
33. DE SANJOSÉ, S. et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.*, v. 7, n. 7, p. 453 - 9, 2007.
34. DIXIT, R.; BHAVSAR, C.; MARFATIA, Y. S. Laboratory diagnosis of human papillomavirus virus infection in female genital tract. *Indian J Sex Transm Dis.*, v. 32, n. 1, p. 50–52, 2011.
35. DIZ, M. D. P. E.; MEDEIROS, R. B. Câncer de colo uterino – fatores de risco, prevenção, diagnóstico e tratamento. *Rev. Med.*, v. 88, n. 1, p. 7-15, 2009.
36. DMED NEWS, 2018. Disponível em <<https://www.dmed.com.br/news>> Acesso em: 06 fev. 2018.

37. DOOBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)*, v. 110, n. 5, p. 525-541, 2006.
38. DOWNS, L. S. et al. The disparity of cervical cancer in diverse populations. *Gynecol. Oncol.*, v. 109, n. 2, (Suppl):S22-30, 2008.
39. DUARTE, D. V. et al. Prevalence of human papillomavirus infection and cervical cancer screening among riverside women of the Brazilian Amazon. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.*, v. 39, n. 7, p. 350-357, 2017.
40. ELFGREN, K. et al. Rate of human papillomavirus clearance after treatment of cervical intraepithelial neoplasia. *Obstet. Gynecol.*, v. 100, n. 5, p. 965 – 71, 2002.
41. ENTIAUSPE, L. G. et al.. High incidence of oncogenic HPV genotypes found in women from Southern Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, v. 45, n. 2, p. 689-694, 2014.
42. EVANDER, M. et al. Identification of alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol.*, v. 71, n. 3, p. 2449–2456, 1997.
43. FAUQUET C. M.; FARGETTE, D. International Committee on Taxonomy of Viruses and the 3,142 unassigned species. *Virology J.*, v. 64, n. 2, p. 1 – 10, 2005.
44. FEDRIZZI, E. N. et al. Infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) em mulheres de Florianópolis, Santa Catarina. *DST – J. bras. Doenças Sex. Transm.*, v. 20, n. 2, p. 73-79, 2008.
45. FEDRIZZI, E. N. Epidemiologia da infecção genital pelo HPV. *Rev. Bras. Pat. Trato. Gen. Inf.*, v. 1, n. 1, p. 3-8, 2011.
46. FLORES-DÍAZ, E. et al. HPV-11 variability, persistence and progression to genital warts in men: the HIM study. *J. Gen. Virol.*, v. 98, p. 2339-2342, 2017.
47. FRANCO, E. L. et al. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J. Infect. Dis.*, v. 180, n. 5, p. 1415–23, 1999.

48. FRANCO, R. et al. Fatores associados a resultados falso-negativos de exames citopatológicos do colo uterino. *Rev Bras Ginecol Obstet.*, v. 28, n. 8, p. 479-485, 2006.
49. FROBERG, M. et al. Human papillomavirus 'reflex' testing as a screening method in cases of minor cytological abnormalities. *Br. J. Cancer*, v. 99, n. 4, p. 563 – 8, 2008.
50. GAGE, J. C. et al. Comparison of the cobas Human Papillomavirus (HPV) test with the hybrid capture 2 and linear array HPV DNA tests. *J. Clin. Microbiol.*, v.50, n. 1, p. 61 - 5, 2012.
51. GALLAY, C. et al. Human papillomavirus (HPV) contamination of gynaecological equipment. *Sex. Transm. Infect.* v. 92. n. 1, p. 19-23, 2016.
52. GARFIELD, E. All sorts of warts – separating facts from fiction. *Current contents*, v. 11, n. 9, p. 3-11, 1988.
53. GOODMAN. M. T. et al. Prevalence, acquisition, and clearance of cervical Human Papillomavirus infection among women with normal cytology: Hawaii Human Papillomavirus cohort study. *Cancer Res.* v. 68, n. 21, p. 8813–8824, 2008.
54. GRAVITT, P. E.; PEYTON, C. L.; ALESSI, T. Q. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J. Clin. Microbiol.*, v. 38, n. 1, p. 357-361, 2000.
55. GRAVITT, P. E et al. A comparison of linear array and hybrid capture 2 for detection of carcinogenic human papillomavirus and cervical precancer in ASCUS-LSIL triage study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, v. 17, n. 5, p. 1248-54, 2008.
56. GUEDES, A. N. **Comparação do desempenho do esfregaço citológico cervicovaginal convencional com esfregaço colhido em meio líquido em mulheres com alto risco para neoplasia de colo uterino.** 75 f. Dissertação (Mestrado em Tocoginecologia) - Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002. Disponível: <

[http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/313284/1/Guedes\\_AnaClaudia\\_M.pdf](http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/313284/1/Guedes_AnaClaudia_M.pdf)> Acesso em: 02 mar. 2018.

57. HECK, D. V. et al. Efficiency of binding the retinoblastoma protein correlates with the transforming capacity of the E7 oncoproteins of the human papillomaviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 89, n. 10, p. 4442-4446, 1992.
58. HEIDEMAN, D. A. M. et al. Clinical validation of the cobas 4800 HPV test for cervical screening purposes. *J. Clin. Microbiol.*, v. 49, n. 11, p. 3983-3985, 2011.
59. HILDESHEIM, A; et al. Risk factors for rapid-onset cervical cancer. *Am J. Obstet. Gynecol.*, v. 180, n. 3, p. 571-577, 1999.
60. HILDESHEIM, A.; WANG, S. S. Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review. *Virus Res.*, v. 89, n. 2, p.229 - 40, 2002.
61. HO, G. et al. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N. Engl. J. Med.*, v. 338, n. 7, p. 423-428, 1998.
62. HORVARTH, C. A. J. et al. Mechanisms of cell entry by human papillomavirus: an overview. *Virology*, v. 7, n. 11, p. 1-7, 2010.
63. HOU, S. W.; WU, S. Y.; CHIANG, C. M. Transcriptional activity among high and low risk human papillomavirus E2 proteins correlates with E2 DNA binding. *J. Biol. Chem.*, v. 277, n. 47, p. 45619-45629, 2002.
64. HOULIHAN, C. F. et al. Rapid acquisition of HPV around the time of sexual debut in adolescent girls in Tanzania. *Int J Epidemiol.*, v. 45, n. 3, p. 762-773, 2016.
65. HOWELL-JONES, R. et al. Multi-site study of HPV type-specific prevalence in women with cervical cancer, intraepithelial neoplasia and normal cytology, in England. *Br. J. Cancer*, v. 103 n. 2, p. 209-216, 2010.
66. HUIBREGTSE, J. M.; SCHEFFNER, M. Mechanisms of tumor suppressor protein inactivation by the human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins. *Seminars in Virology*, v. 5, n. 5, p. 357-367, 1994.



67. IARC - *International Agency for Research on Cancer*. Human Papillomavirus and related diseases report, 2017. Disponível: <  
<http://www.hpvcentre.net/statistics/reports/BRA.pdf>> Acesso em: 21 dez. 2017.
68. INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Neoplasia intra-epitelial cervical – Nic, 2000. Disponível em:  
<[http://www.inca.gov.br/rbc/n\\_46/v04/pdf/normas\\_2.pdf](http://www.inca.gov.br/rbc/n_46/v04/pdf/normas_2.pdf)> Acesso em: 21 dez. 2017.
69. INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Programa nacional de controle do Câncer de colo de útero, 2011. Disponível em:  
<[http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/PROGRAMA\\_UTERO\\_internet.PDF](http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/PROGRAMA_UTERO_internet.PDF)> Acesso em: 21 dez. 2017.
70. INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Atlas on-line de mortalidade, 2014. Disponível em: <  
<https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/>> Acesso em: 03 nov. 2017.
71. IWASAKI, R. et al. Prevalence of high-risk human papillomavirus by cobas 4800 HPV test in urban Peru. *Braz. J. Infect. Dis.*, v. 18, n. 5, p. 469–472, 2014.
72. JENTSCHKE, M.; SOERGEL, P.; HILLEMANN, P. Importance of HPV genotyping for the screening, therapy and management of cervical neoplasias. *GebFra.*, v. 72, n. 6, p. 507–512, 2012.
73. KAHN, J. A. et al. The interval between menarche and age of first sexual intercourse as a risk factor for subsequent HPV infection in adolescent and young adult women. *J. Pediatr.* v. 141, n. 5, p. 718-723, 2002.
74. LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, v. 33, n. 1, p. 159-174, 1977.
75. LECHNER, M. S.; LAIMINS, L. A. Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. *J Virol.*, v. 68, n. 7, p. 4262 – 4273, 1994.

76. LETO, M. G. P. et al. Infecção pelo papilomavírus humano: etiopatogenia, biologia molecular e manifestações clínicas. *An. Bras. Dermatol.*, v. 86, n. 2, p. 306-307, 2011.
77. LEVI, A. W. et al. A comparison of the Roche Cobas HPV test with the Hybrid Capture 2 test for the detection of high-risk human papillomavirus genotypes. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, v. 140, n. 2, p. 153-157, 2016.
78. LLOREVAS, B. et al. HPV testing by cobas HPV test in a population from Catalonia. *PLoS One*, v. 8, n. 3, p. e58153, 2013.
79. LUNDBERG, G. D. The 1988 Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytological diagnoses. *JAMA*, v. 262, n. 7, p. 931-934, 1989.
80. LINHARES, A. C.; VILLA, L. L. Vaccines against rotavirus and human papillomavirus (HPV). *J. Pediatr.*, v. 82, n. 3, p. S25-34, 2006.
81. MARQUES, J. P. H. **Perfil das lesões encontradas nos histopatológicos do colo uterino em pacientes com atipia de células glandulares.** 120 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011. Disponível: < [http://www.bdt.d.ufpe.br/bitstream/handle/123456789/8406/arquivo2824\\_1.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://www.bdt.d.ufpe.br/bitstream/handle/123456789/8406/arquivo2824_1.pdf?sequence=1&isAllowed=y)> Acesso em: 24 jan. 2018.
82. MARTINO, M. et al. High-risk Human Papilloma virus infection of the foreskin in asymptomatic boys. *Urology*, v. 81, n. 4, p. 869-872, 2013.
83. MCINTYRE, P. Finding the viral link: the story of Harald zur Hausen. *In: Cancer World*, p. 32-37, 2005.
84. MEDICAL DICTIONARY, 2009. Disponível em: < <https://medical-dictionary.thefreedictionary.com/Papanicolaou+test>> Acesso em: 06 fev. 2018.
85. MIRANDA, P. M. et al. Human papillomavirus infection in brazilian women with normal cervical cytology. *Genet. Mol. Res.*, v. 11, n. 2, p. 1752-1761, 2012.

86. MIRANDA, P. M. et al. Persistence or Clearance of Human Papillomavirus Infections in Women in Ouro Preto, Brazil. *Biomed Res Int.*, v. 2013, n. 5, p. 1–6, 2013.
87. MOLANO, M. et al. HPV Study Group. Determinants of clearance of human papillomavirus infections in Colombian women with normal cytology: a population-based, 5-year follow-up study. *Am J. Epidemiol.*, v. 158, n. 5, p. 486-494, 2003.
88. MOLIJN, A. et al. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol.*, v. 32, Suppl 1, S43-51, 2005.
89. MORTAZAVI, S. H. et al. The Prevalence of Human Papillomavirus in cervical cancer in Iran. *Asian Pac J Cancer Prev.*, v. 3, n. 1, p. 69-72, 2002.
90. MUNGER, K.; HOWLEY, P. M. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res.*, v. 89, n. 2, p. 213-228, 2002.
91. MUÑOZ, N. et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N. Engl. J. Med.*, v. 348, n. 6, p. 518-27, 2003.
92. MUÑOZ, N. et al. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*, Suppl v. 3, n.23, p. S3 1-10, 2006.
93. MUÑOZ, N. et al. Persistence of HPV infection and risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia in a cohort of Colombian women. *Br. J. Cancer.*, v. 100, n. 7, p. 1184–1190, 2009.
94. NAUD, J. et al. Infecção pelo papiloma vírus humano (HPV). *Revista HCPA*, v. 20, n. 2, p. 138-142, 2000.
95. NIELSEN, A. et al. Persistence of high-risk human papillomavirus infection in a population-based cohort of Danish women. *J. Med. Virol.*, v. 82, n. 4, p. 616-623, 2010.

96. NUGENT, R. P. et al. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J Clin Microbiol.*, v. 29, n. 2, p. 297-301, 1991.
97. OLIVEIRA, L. H. S. et al. Human papillomavirus genotypes in asymptomatic young women from public schools in Rio de Janeiro, *Brazil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 43, n. 1, p. 4-8, 2010.
98. OLIVEIRA, D. F. **Associação entre a infecção pelo Papilomavírus humano e a detecção de anormalidades citológicas em jovens universitárias.** 92 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical e Saúde Pública) - Instituto de Medicina Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011. Disponível em: < <https://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/4569>> Acesso em: 09 nov. 2017.
99. OLIVEIRA, G. R. et al. Fatores de risco e prevalência da infecção pelo HPV em pacientes de Unidades Básicas de Saúde e de um Hospital Universitário do Sul do Brasil. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.*, v. 35, n. 5, p. 226-232, 2013.
100. PARKIN, D. M. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int. J. Cancer*, v. 118, n. 12, p. 3030-3044, 2006
101. PERRONS, C. et al. PERRONS, C. et al. Detection of persistent high risk human papillomavirus infections with hybrid capture II and SPF10/LiPA. *J Clin Virol.*, v. 32, n. 4, p. 278-285, 2005.
102. PIEMENOFF, V. M.; OLIVEIRA, C. M.; BRAVO, I. G. Transmission between archaic and modern human ancestors during the evolution of the oncogenic Human Papillomavirus 16. *Mol. Biol. Evol.* v. 34, n. 1, p. 4-19, 2017.
103. REBOLJ, M. et al. Disagreement between human papillomavirus assays: an unexpected challenge for the choice of an assay in primary cervical screening. *Plos One*, v. 9, n. 1, p. 86835, 2014.
104. REMOTE PRIMARY HEALTH CARE MANUALS, 2018. Disponível em: <<https://www.remotephcmmanuals.com.au/home.html>> Acesso em 22 mar. 2018.

105. RIEMER, A. B. et al. A conserved E7-derived cytotoxic T lymphocyte epitope expressed on human *papillomavirus* 16-transformed HLA-A2<sup>+</sup> epithelial cancers. *J. Biol. Chem.*, v. 285, n. 38, p. 29608-29622, 2010.
106. ROBERTS, S. Mutational analysis of human papillomavirus E4 proteins: identification of structural features important in the formation of cytoplasmic E4/cytokeratin networks in epithelial cells. *J Virol.*, v. 68, n. 10, p. 6432-6445, 1994.
107. ROCHA, B. G. **Desenvolvimento de metodologias para identificação molecular do HPV**. 105 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2016. Disponível em: <<https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/8289/TeseBGR.pdf?sequence=1>> Acesso em: 23 dez. 2017.
108. RONCO, G. et al. Efficacy of human papillomavirus testing for the detection of invasive cervical cancers and cervical intraepithelial neoplasia: a randomised controlled trial. *Lancet Oncol.* v. 11, n. 3, p. 249-57, 2010.
109. ROSENBLATT, C. et al. HPV na prática clínica. Ed. Atheneu., 2018. Disponível em: <<http://hpvinfo.com.br/hpv-livro/>> Acesso em: 24 jan. 2018.
110. RYNDOCK, E. J.; MEYERS, C. A risk for non-sexual transmission of human papillomavirus? *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* v. 12, n. 10, p. 1165-1170, 2014.
111. SABEENA, S. et al. Possible non-sexual modes of transmission of human papilloma virus. *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, v. 43, n. 3, p. 429–435, 2017.
112. SANTOS, J. C. **Caracterização molecular dos tipos de Papilomavírus Humanos-HPV, no município de Porto Velho-RO no período de 2008-2009**. 66 f. Tese (Doutorado em Biologia Experimental) - Centro Interdepartamental de Biologia Experimental e Biotecnologia, Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2012.
113. SANTOS FILHO, M. V. C. et al. Prevalence of human papillomavirus (HPV), distribution of HPV types, and risk factors for infection in HPV-positive women. *Genet. Mol. Res.*, v. 15, n. 2, p. 1-9, 2016.

114. SAPP, M.; BIENKOWSKA-HABA, M. Viral entry mechanisms: human papillomavirus and a long journey from extracellular matrix to the nucleus. *FEBS J.*, v. 276, n. 24, p. 7206-7216, 2009.
115. SCHEFFNER, M. et al. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell.*, v. 63, n. 6, p. 1129 - 36, 1990.
116. SCHLECHT, N. F. et al. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *JAMA.*, v. 286, n. 24, p. 3106-3114, 2001.
117. SHANMUGASUNDARAM, S.; YOU, J. Targeting persistent human papillomavirus infection. *Viruses*, v. 9, n. 229, p. 1-14, 2017.
118. SICHERO, L.; FERREIRA, S.; TROTTIER, H. High grade cervical lesions are caused preferentially by non-european variants of HPVs 16 and 18. *Int. J. Cancer*, v. 120, n. 8, p. 1763-1768, 2007.
119. SMITH, J. S.; LINDSAY, L.; HOOTS, B. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *Int. J. Cancer*, v. 121, n. 3, p. 621-32, 2007.
120. SOLIMAN, P. T.; SLOMOVITZ, B. M.; WOLF, J. K. Mechanisms of cervical cancer. *Drug discovery Today: Disease Mechanisms*, v. 1, n. 2, p. 253-258, 2004.
121. SOLOMON, D. Statement on HPV DNA test utilization: cytopathology education and technology consortium. *Diagn Cytopathol.*, v. 37, n. 7, p. 542–543, 2009.
122. SONNEX, C.; STRAUSS, S.; GRAY, J. J. Detection of human papillomavirus DNA on the fingers of patients with genital warts. *Sex. Transm. Inf.*, v. 75, n. 5, p. 317–319, 1999.
123. SOUZA, N. S. T.; MELO, V. H.; CASTRO, L. P. F. Diagnóstico da infecção pelo HPV em lesões do colo do útero em mulheres HIV+: acuidade da histopatologia. *Rev. Bras. Gynecol. Obstet* v. 23, n. 6, p. 355-361, 2001.

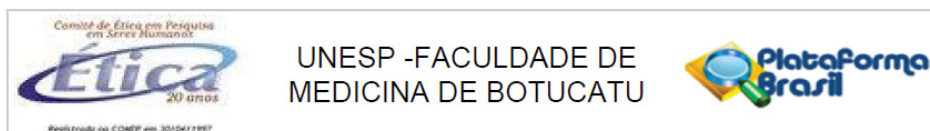
124. STABILE, S. A. B. et al. Estudo comparativo dos resultados obtidos pela citologia oncológica cérvico-vaginal convencional e pela citologia em meio líquido. *Einstein.*, v. 10, n. 4, p. 466-472, 2012.
125. STEINAU, M.; SWAN, D. C.; UNGER, E. R. Type-specific reproducibility of the Roche linear array HPV genotyping test *J Clin Virol.*, v. 42, n. 4, p. 412-414, 2008.
126. STEVENS, M. P. et al. Comparison of the Digene Hybrid Capture 2 assay and Roche AMPLICOR and LINEAR ARRAY human papillomavirus (HPV) tests in detecting high-risk HPV genotypes in specimens from women with previous abnormal Pap smear results. *J Clin Microbiol.*, p. 45, n. 7, p. 2130-2137, 2007.
127. STOFLE, M. E. C.; NUNES, R. D.; SCHNEIDER, I. J. C. Avaliação de fatores associados às lesões HPV induzidas do colo uterino. *Arq. Catarineses Med.*, v. 40, n. 3, p. 84-89, 2011.
128. STOLER, M. H. et al. High-risk human papillomavirus testing in women with ASC-US cytology: results from the ATHENA HPV study. *Am. J. Clin. Pathol.*, v. 135, n. 3, p. 468-475, 2011.
129. STRAUSS, M. J. et al. Crystalline virus-like particles from skin papillomas characterized by intranuclear inclusion bodies. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v. 72, n. 1, p. 46-50, 1949.
130. STRAUSS, M. J. et al. Virus-like particles and inclusion bodies in skin papillomas. *J. Invest. Dermatol.* v. 15, n. 6, p. 433-44, 1950.
131. TEIXEIRA, J. C. et al. Particularização do adenocarcinoma do colo frente ao conhecimento atual. *Femina*, v. 40, n. 5, p. 269-274, 2012.
132. TROTTIER, H.; FRANCO, E. L. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine*, v. 1, p. 1 - 15, 2006.
133. TORRES, M. et al. Human Papillomavirus (HPV) genotyping: automation and application in routine laboratory testing. *Open Virol J.*, v. 6, p. 144-150, 2012.

134. TYRING, S. K. Human papillomavirus infection: epidemiology, pathogenesis, and host immune response. *J. Am. Acad. Dermatol.*, v. 43, n. 1, p. S18-26, 2000.
135. VAN HAMONT, D. et al. Evaluation of the SPF10-INNO LiPA Human Papillomavirus (HPV) genotyping test and the Roche linear array HPV genotyping test. *J. Clin. Microbiol.*, v. 44, n. 9, p. 3122-3129, 2006.
136. VIEIRA, R. C. et al. Prevalence of type-specific HPV among female university students from northern Brazil. *Infect Agent Cancer.*, v. 10, n. 21, p. 1-5, 2015.
137. VILLA, L. L. Human papillomaviruses and cervical cancer. *Adv. Cancer Res.*, v. 71, p. 321 - 41, 1997.
138. VILLIERS, E. T. et al. Classification of papillomaviruses. *Virology*, v. 324, n. 1, p. 17-27, 2004.
139. VILLIERS, E. T. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology*, v. 445, n. 1-2, p. 2-10, 2013.
140. WAGNER, M. B. Medindo a ocorrência de doença: prevalência ou incidência? *J. Pediatr.*, v. 74, p. 157 – 162, 1998.
141. WOODMAN, C. B. J.; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat. Rev. Cancer.* v. 7, n. 1, p. 11-22, 2007.
142. WHO - *World Health Organization*. GLOBOCAN 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012, IARC – International Agency Research on Cancer, 2015. Disponível em: <[http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)> Acesso em: 03 nov. 2017.
143. XAVIER JÚNIOR, J. C. C. et al. Early age at first sexual intercourse is associated with higher prevalence of High-grade Squamous Intraepithelial Lesions (HSIL). *Rev Bras Ginecol Obstet.*, v. 39, n. 2, p. 80-85, 2017.



144. YOUSSEF, M. A. Prevalence of human papilloma virus (HPV) and its genotypes in cervical specimens of Egyptian women by linear array HPV genotyping test. *Infect Agent Cancer.*, v. 11, n. 6, p.1-10, 2016.
145. ZHAO, C.; NOVAK, P. K.; AUSTIN, R. M. Follow-up findings in young females with high-grade squamous intraepithelial lesion papanicolaou test results. *Arch Pathol Lab Med.*, v. 135, n. 3, p. 361-364, 2011.
146. ZUR HAUSEN, H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1288, n. 2, p. 55 - 78, 1996.

## ANEXO 1 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA (CEP)



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** COMPARAÇÃO DOS TESTES LINEAR ARRAY® HPV GENOTYPING E COBAS® HPV TEST PARA DETECÇÃO DA PERSISTÊNCIA DA INFECÇÃO PELO PAPILOMAVIRUS HUMANO (HPV) EM MULHERES IMUNOCOMPETENTES

**Pesquisador:** Camila Marconi

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 69515717.7.0000.5411

**Instituição Proponente:** Unidade de Pesquisa Experimental

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.153.083

#### Apresentação do Projeto:

Estudo de Genotipagem de vírus HPV realizado de material de exame de colo de útero de 200 pacientes, não-gestantes com diagnóstico de citologia alterada e atendidas nas Unidades Básicas de Saúde e encaminhadas ao Serviço de Orientação e Prevenção do Câncer (SOPC) do município de Bauru-SP. O material não será estocado e guardado, afirmativa retirada do projeto e formulários preenchidos pelos autores.

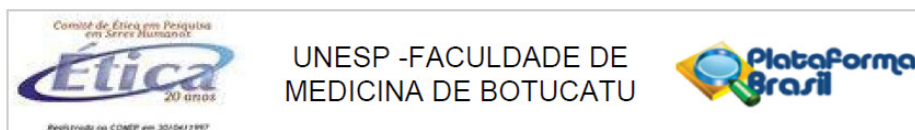
#### Objetivo da Pesquisa:

Comparar a prevalência dos sub-tipos de HPV em mulheres imunocompetentes em idade reprodutiva, utilizando dois métodos de detecção e genotipagem.

#### Objetivos específicos

- Determinar a taxa de persistência da infecção pelo HPV em mulheres imunocompetentes utilizando os sistemas Linear Array HPV Genotyping® e Cobas® HPV Test (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA).
- Comparar as técnicas de Linear Array HPV Genotyping® e Cobas® HPV Test (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA) quanto à positividade para infecção pelos genótipos 16 e 18.
- Determinar a taxa de discordância entre as técnicas de Linear Array HPV Genotyping® e Cobas®

**Endereço:** Chácara Butignolli, s/n  
**Bairro:** Rubião Junior **CEP:** 18.618-970  
**UF:** SP **Município:** BOTUCATU  
**Telefone:** (14)3880-1608 **E-mail:** capellup@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 2.153.083

HPV Test (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA).

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

sem risco, benefício será o conhecimento do tipo de HPV.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Coleta do material será realizada por médica ginecologista e auxiliada por equipe de enfermagem treinada, sem problema ético.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Há autorização da Secretaria de Saúde de Bauru e unidades de pesquisa da FMB unesp. Foi anexada também o regulamento de Biorrepositório.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sugiro aprovação.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Projeto de Pesquisa APROVADO, deliberado em reunião ORDINÁRIA do CEP de 03/07/2017, sem necessidade de envio à CONEP.

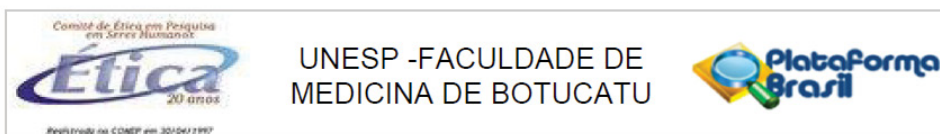
O CEP solicita aos pesquisadores que após a execução do projeto em questão, seja enviado o Relatório Final de Atividades, o qual deverá ser enviado via Plataforma Brasil na forma de "NOTIFICAÇÃO".

LEMBRAMOS QUE A PRESENTE PESQUISA SOMENTE PODERÁ SER INICIADA APÓS DIA 03/07/2017 – DATA DA APROVAÇÃO DO CEP.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situaçã
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_915108.pdf	08/06/2017 23:21:54		Aceito
Outros	biorrepositorioHPVok.pdf	08/06/2017 23:20:34	Camila Marconi	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoBauruCEPBtuConsideracoesSSMBauruPosPend.docx	05/06/2017 18:58:18	Camila Marconi	Aceito
Cronograma	CronogramaPosPend.docx	05/06/2017 15:18:24	Camila Marconi	Aceito

**Endereço:** Chácara Butignolli, s/n  
**Bairro:** Rubião Junior **CEP:** 18.618-970  
**UF:** SP **Município:** BOTUCATU  
**Telefone:** (14)3880-1608 **E-mail:** capellup@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 2.153.083

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEHPVBauruokPosPend.doc	05/06/2017 15:15:44	Camila Marconi	Aceito
Outros	DECLARACAOMarconiHPV.pdf	29/05/2017 16:59:41	Camila Marconi	Aceito
Outros	1545CamilaMarconi.pdf	21/05/2017 11:40:27	Camila Marconi	Aceito
Folha de Rosto	PlatBrasil1545CamilaMarconi.pdf	21/05/2017 11:35:39	Camila Marconi	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

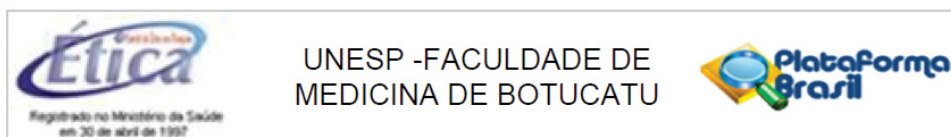
BOTUCATU, 03 de Julho de 2017

---

**Assinado por:**  
**SILVANA ANDREA MOLINA LIMA**  
(Coordenador)

**Endereço:** Chácara Butignolli, s/n  
**Bairro:** Rubião Junior **CEP:** 18.618-970  
**UF:** SP **Município:** BOTUCATU  
**Telefone:** (14)3880-1608 **E-mail:** capellup@fmb.unesp.br

## ANEXO 2 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Prevalência de coinfeção e fatores associados ao Papilomavírus Humano (HPV) e à Chlamydia trachomatis em mulheres em idade reprodutiva atendidas em Programa de Prevenção de Câncer do Colo Uterino na região sudeste do Brasil

**Pesquisador:** Márcia Guimarães da Silva

**Área Temática:**

**Versão:** 4

**CAAE:** 34977014.0.0000.5411

**Instituição Proponente:**

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.909.609

#### Apresentação do Projeto:

Tratam os autos de emenda enviada pelos pesquisadores no sentido de incluir na equipe de Pesquisa mais dois integrantes à saber: "Camila Marconi e Thais Fernandes".

#### Objetivo da Pesquisa:

Constante do Parecer 924.877

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Constante do Parecer 924.877

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Constante do Parecer 924.877. Na presente solicitação trata-se apenas de inclusão de novos membros na equipe de pesquisa.

#### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Constante do Parecer 924.877

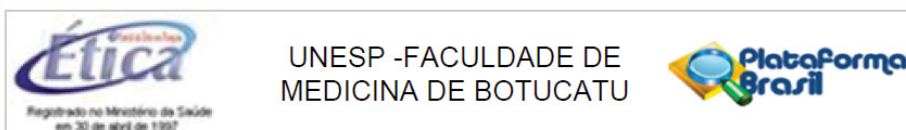
#### Recomendações:

Não se aplica.

#### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sugiro aprovação da inclusão de "Camila Marconi e Thais Fernandes", na equipe de pesquisa.

<b>Endereço:</b> Chácara Butignolli , s/n	<b>CEP:</b> 18.618-970
<b>Bairro:</b> Rubião Junior	
<b>UF:</b> SP	<b>Município:</b> BOTUCATU
<b>Telefone:</b> (14)3880-1608	<b>E-mail:</b> capellup@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 1.909.609

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O CEP em reunião de 06 de Fevereiro de 2.017, aprova a presente emenda no sentido de incluir na equipe de pesquisa deste estudo os seguintes participantes: "Camila Marconi e Thais Fernandes", sem necessidade de informar a CONEP.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_770707E2.pdf	19/12/2016 11:36:51		Aceito
Folha de Rosto	PlataformaBrasilMarciaGSilvaFolhaRostoHPVAss.pdf	19/12/2016 11:28:36	Márcia Guimarães da Silva	Aceito
Parecer Anterior	PARECERANTERIOR.pdf	15/09/2016 10:31:34	Márcia Guimarães da Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoHPVCTPlaBrasil2014.pdf	15/09/2016 10:30:49	Márcia Guimarães da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TermoConsentimentoHPVCT.pdf	15/09/2016 10:30:22	Márcia Guimarães da Silva	Aceito
Outros	JustificativaInclusaoEquipeHPV2CEP.pdf	15/09/2016 10:07:13	Márcia Guimarães da Silva	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BOTUCATU, 07 de Fevereiro de 2017

---

**Assinado por:**  
**SILVANA ANDREA MOLINA LIMA**  
(Coordenador)

**Endereço:** Chácara Butignolli, s/n  
**Bairro:** Rubião Junior **CEP:** 18.618-970  
**UF:** SP **Município:** BOTUCATU  
**Telefone:** (14)3880-1608 **E-mail:** capellup@fmb.unesp.br