

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LÍVIA ROCHA KRUK

DETECÇÃO DE HPVS DE ALTO RISCO POR PCR EM TEMPO REAL EM
AMOSTRAS DE LESÕES DO COLO UTERINO

CURITIBA

2024

Lívia Rocha Kruk

DETECÇÃO DE HPVS DE ALTO RISCO POR PCR EM TEMPO REAL EM
AMOSTRAS DE LESÕES DO COLO UTERINO

TCC apresentado ao curso de Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Patricia Savio de Araujo Souza

CURITIBA

2024

TERMO DE APROVAÇÃO

LÍVIA ROCHA KRUK

**DETECÇÃO DE HPVS DE ALTO RISCO POR PCR EM TEMPO REAL EM
AMOSTRAS DE LESÕES DO COLO UTERINO**

TCC apresentado ao curso de graduação em Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.



Prof. Dra. Patrícia Savio de Araujo Souza
Orientadora – Departamento de Genética, UFPR



Prof. Dra. Camila Marcon
Departamento de Patologia básica, UFPR

Curitiba, 18 de dezembro de 2024.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, primeiramente, à minha família, que sempre se esforçou para me oferecer as melhores oportunidades e compreendeu os dias em que estive triste ou estressada neste ano;

Quero agradecer também ao pessoal do LIGH, que sempre foram muito solícitos em me ajudar e esclarecer todas as minhas dúvidas, tornando esses meses mais leves;

Agradeço à minha orientadora, Patrícia, por ter me dado essa oportunidade, por sempre estar disponível para me ajudar quando eu precisava, e por me acalmar nos momentos de ansiedade;

Agradeço também ao pessoal de todos os laboratórios que eu já passei, pela experiência de crescimento que obtive neles e pelas pessoas que conheci;

Preciso dar um agradecimento especial aos amigos que fiz na faculdade, pois, sem eles, eu não teria chegado até aqui. Obrigada pelos cafezinhos, risadas e passeios que tornaram esses anos de graduação muito mais especiais;

Por fim, agradeço ao meu namorado, que sempre esteve ao meu lado, me apoiando e acalmando nos momentos difíceis deste ano, e pelos momentos divertidos que compartilhamos, que me faziam esquecer, mesmo que por um tempo, os meus problemas.

RESUMO

O câncer de colo de útero (CCU) é o terceiro tipo de câncer mais incidente entre as mulheres e representa a quarta causa mais frequente de mortalidade por câncer no Brasil. A infecção por HPV de alto risco (hrHPV) é uma causa necessária, porém, insuficiente para o desenvolvimento do CCU, sendo que aproximadamente 30% das lesões pré-cancerosas de alto grau, se não tratadas, eventualmente se tornam cânceres invasivos. O HPV também está associado a uma parte considerável de cânceres anogenitais e orofaríngeos, assim como outras lesões na pele e mucosas. No Brasil, são disponibilizados programas de rastreamento de lesões pré-malignas relacionadas ao CCU, a partir do teste de Papanicolau, assim como programas de prevenção através da vacinação disponibilizada pelo SUS. Apesar disso, esse teste citológico apresenta baixa sensibilidade, o que requer que o exame seja feito com mais frequência, e a vacinação não atinge a cobertura adequada. O teste molecular para detecção de HPV é aceito mundialmente como teste primário de triagem para o CCU, tendo sido incluído no SUS em 2024. Porém, as diretrizes atuais para o rastreamento do CCU no SUS ainda não incluem a testagem molecular para HPV e protocolos de seguimento para mulheres com teste positivo. Com isso, esse estudo buscou se antecipar às mudanças nas diretrizes, que futuramente incluirão a testagem molecular para HPV, tendo como objetivo detectar infecções por hrHPV em amostras citológicas com lesões cervicais a partir de qPCR. Nesse estudo, foi realizada a detecção molecular de HPV por qPCR em 197 amostras de citologia cervical de mulheres com lesões cervicais. O DNA foi isolado principalmente pelo método de salting-out e a detecção de HPV foi feita pelo kit IBMP Biomol HPV Alto Risco, autorizado pela Agência de Vigilância sanitária (ANVISA) para este fim. No total, 171 apresentaram infecção por HPV. A infecção pelo HPV-AR, que detecta a presença do conjunto de HPV- 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59,66 e 68 foi a mais prevalente na coorte (n= 67), seguida pelo HPV-16 (n= 49). Apesar disso, a comparação da distribuição de genótipos de HPV com o grau das lesões cervicais, a partir do teste exato de Fisher, sugere associação da infecção por HPV-16/18 com lesões de alto grau e câncer invasivo ($p < 0,05$). Tendo sido a coorte em questão composta por mulheres não vacinadas, esse estudo permitiu uma análise histórica da prevalência de HPV, ao auxiliar na compreensão da distribuição base dos genótipos de HPV antes da introdução das vacinas.

Palavras-chave: HPV; Neoplasia Intraepitelial Cervical; Detecção molecular; qPCR

ABSTRACT

Cervical cancer (CC) is the third most common type of cancer among women and represents the fourth leading cause of cancer-related mortality in Brazil. High-risk HPV (hrHPV) infection is a necessary but insufficient cause for the development of CC, as approximately 30% of untreated high-grade precancerous lesions eventually progress to invasive cancers. HPV is also associated with a significant proportion of anogenital and oropharyngeal cancers, as well as other lesions in the skin and mucosa. In Brazil, screening programs for CC-related premalignant lesions, based on the Pap smear test, are available alongside prevention programs through vaccination provided by the public healthcare system (SUS). Despite these efforts, the cytological test has low sensitivity, requiring more frequent examinations, and vaccination coverage remains inadequate. Molecular testing for HPV detection is globally accepted as the primary screening test for CC and was introduced into the SUS in 2024. However, current CC screening guidelines within the SUS still do not include molecular HPV testing or follow-up protocols for women with positive results. Consequently, this study aimed to anticipate changes in these guidelines, which will eventually incorporate molecular HPV testing, by detecting hrHPV infections in cytological samples with cervical lesions using qPCR. In this study, molecular HPV detection via qPCR was performed on 197 cervical cytology samples from women with cervical lesions. DNA was primarily isolated using the salting-out method, and HPV detection was carried out using the IBMP Biomol HPV High-Risk kit, authorized by the Brazilian Health Regulatory Agency (ANVISA) for this purpose. A total of 171 samples showed HPV infection. Infection by the HPV-AR (detecting HPV types 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, and 68) was the most prevalent in the cohort (n=67), followed by HPV-16 (n=49). Despite this, the comparison of HPV genotype distribution with the grade of cervical lesions, using Fisher's exact test, suggests an association between HPV-16/18 infection and high-grade lesions or invasive cancer ($p<0.05$). Since the cohort in question consisted of unvaccinated women, this study provided a historical analysis of HPV prevalence, contributing to an understanding of the baseline distribution of HPV genotypes prior to the introduction of vaccines.

Keywords: HPV; intraepithelial cervical neoplasia; molecular detection; qPCR.

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

CCU	- Câncer de colo de útero
HPV	- Papilomavírus humano
hrHPV	- HPV de alto risco
NIC	- Neoplasias intraepiteliais cervicais
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
SUS	- Sistema Único de Saúde
qPCR	- PCR em tempo real
OMS	- Organização Mundial da Saúde
PNI	- Programa Nacional de Imunizações
ORF	- Open reading frame (fase de leitura aberta)
CI	- Controle interno
CP	- Controle positivo
CN	- Controle negativo
Ct	- Ciclo de threshold
HSIL	- Lesão intraepitelial escamosa de alto grau
LSIL	- Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau

SUMÁRIO

1	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
1.1	O CÂNCER DE COLO DE ÚTERO, PREVENÇÃO E TRIAGEM	16
1.2	O PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV).....	18
1.2.1	HPV e câncer	19
1.2.2	Progressão da infecção pelo HPV e possíveis desfechos	21
1.3	GERENCIAMENTO DOS RESULTADOS DO RASTREIO	22
1.4	DETECÇÃO POR QPCR	24
2	JUSTIFICATIVA.....	26
3	OBJETIVOS.....	27
3.1	OBJETIVO GERAL.....	27
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1	DESENHO DO ESTUDO	27
4.2	EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA	28
4.3	AMPLIFICAÇÃO DE BETA-GLOBINA HUMANA	29
4.4	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	30
4.5	AMPLIFICAÇÃO POR PCR EM TEMPO REAL.....	30
4.5.1	Análise e interpretação dos Resultados de qPCR.....	32
4.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	33
5	RESULTADOS.....	34
5.1	DISTRIBUIÇÃO DE DIAGNÓSTICOS HISTOPATOLÓGICOS NAS BIOPSIAS E CITOLOGIAS CERVICAIS	34
5.2	AMPLIFICAÇÃO DE B-GLOBINA HUMANA.....	35
5.3	TESTE DO KIT IBMP BIOMOL HPV ALTO RISCO.....	36
5.4	DETECÇÃO DE HPV POR QPCR	38
5.5	COMPARAÇÃO ENTRE LESÕES E POSITIVIDADE DE HPV	40
6	DISCUSSÃO	43
7	CONCLUSÃO	46

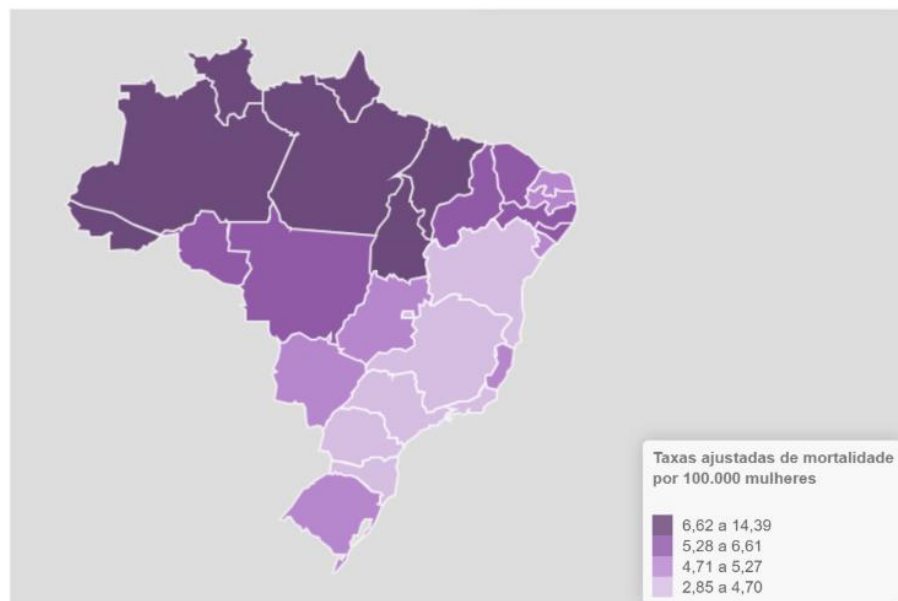
1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 O CÂNCER DE COLO DE ÚTERO, PREVENÇÃO E TRIAGEM

O CCU é uma malignidade ginecológica comum e representa a quarta causa mais frequente de mortalidade por câncer entre as mulheres em todo o mundo (OMS, 2024). Em 2022, o CCU afetou mais de 600.000 mulheres globalmente, causando 340.000 mortes, sendo que cerca de 94% dessas ocorreram em países de baixa e média renda, com as maiores taxas na África subsaariana, América Central e Sudeste Asiático. Essas diferenças refletem desigualdades no acesso a serviços de saúde e fatores sociais e econômicos, como prevalência do HIV, pobreza e discriminação de gênero (OMS, 2024).

No Brasil, excluídos os tumores de pele não melanoma, o CCU é o terceiro tipo de câncer mais incidente entre as mulheres, sendo que a sua incidência é maior nas regiões Norte e Nordeste do país. Na mortalidade proporcional por câncer em mulheres em 2021, os óbitos por CCU ocuparam o quarto lugar, representando 6,05% do total, sendo que o Norte representa 15,4% dos óbitos por câncer em mulheres (INCA, 2024) (Figura 1).

Figura 1. TAXAS DE MORTALIDADE DO CÂNCER DE COLO DE ÚTERO NO BRASIL



FONTE: INCA, 2024. Atlas on-line de mortalidade

LEGENDA: Representação espacial das taxas ajustadas por idade pela população mundial de mortalidade por câncer de colo do útero, por 100.000 mulheres, pelas unidades da federação do Brasil, entre 2019 e 2022.

A infecção pelos HPVhr é uma causa necessária, porém, insuficiente para o desenvolvimento do CCU. A ocorrência de NIC 2/3 e CCU é rara entre as mulheres que contraem o HPV, acometendo cerca de 10% e 1% das mulheres infectadas por HPV, respectivamente, porém se não tratadas, aproximadamente 30% das lesões pré-cancerosas de alto grau eventualmente se tornam cânceres invasivos (Loopik, D. L. *et al*, 2021). Dentre alguns fatores que estão relacionados com a progressão das lesões cervicais e o desenvolvimento de câncer, estão a condição do sistema imunológico do hospedeiro, fatores genéticos e o tipo viral, sendo que a prevenção, através da vacinação e triagem, é o melhor método para se evitar o câncer (Sasagawa T, Takagi H, Makinoda S., 2012) (Lei, J., *et al*, 2020).

Os programas de rastreamento do câncer cervical têm como objetivo identificar mulheres assintomáticas que possuem lesões pré-cancerosas, permitindo que o diagnóstico e o tratamento ocorram antes do desenvolvimento do câncer (Eun, T. J. & Perkins, R. B., 2020). O exame de triagem mais comum e amplamente disponível no Brasil é o Papanicolau, ou teste de citologia oncótica, o qual identifica lesões precursoras do CCU a partir da análise morfológica das células de revestimento do colo uterino (Corrêa, F. de M., *et al*, 2022). Apesar disso, ele apresenta baixa sensibilidade, o que requer que o exame seja feito com mais frequência (Cuzick *et al.*, 2006). O teste molecular para HPV foi aceito recentemente como teste primário de triagem para o câncer cervical, tendo sido incluído no SUS em 2024, como parte das estratégias de prevenção ao câncer cervical (BRASIL, 2024). Além disso, as novas diretrizes recomendadas pela OMS indicam o teste baseado em DNA de HPV como método preferível, por ser um diagnóstico objetivo, sem necessidade de interpretações dos resultados (OMS, 2021).

Os testes moleculares para HPV são ensaios que detectam o DNA do HPV utilizando um conjunto de primers, seja por detecção direta do genoma ou pela amplificação de um fragmento de DNA viral, através de PCR, a partir de regiões genômicas dos vírus conservadas ou não (Bhatla, N., Singla, S., Awasthi, D., 2012). A genotipagem do HPV identifica tipos virais específicos, permitindo identificar aqueles com maior risco de persistência e progressão. A triagem primária para HPV a cada 5 anos pode fornecer uma proteção adequada contra NIC 2/3 e CCU, em

comparação com o teste de citologia, que deve ser realizada a cada 3 anos (Bhatla, N., Singhal, S, 2020).

No Brasil, a vacinação contra o HPV foi adicionada ao PNI em 2014, sendo disponibilizada gratuitamente. A vacina utilizada no Brasil é a quadrivalente, a qual protege contra lesões causadas pelos HPVs mais comuns: HPV-6, 11, 16 e 18 (BRASIL, Ministério da Saúde, 2023). Inicialmente, o objetivo do PNI era atingir uma cobertura vacinal de, no mínimo, 80% para a primeira e a segunda doses. Em 2014, 87% dos municípios do Brasil atingiram a meta estabelecida para a primeira dose, mas apenas 32% conseguiram atingir a meta para a segunda dose (Moura, L. L; Codeço, C. T.; Luz, P. M., 2021). Já em 2022, a cobertura vacinal caiu para 75,81% entre as meninas e para 52,16% entre os meninos (BRASIL, Ministério da Saúde, 2023). Neste ano (2024) o Ministério da Saúde adotou a vacinação do HPV em esquema de dose única, permitindo dobrar a capacidade da imunização com o estoque de vacinas disponíveis, buscando um aumento na imunização (Brasil, 2024). Diversos fatores individuais têm sido associados à baixa cobertura vacinal de HPV, como baixo nível educacional, baixa renda, residência em áreas rurais, acesso limitado à informação e aos serviços de saúde, além de barreiras impostas por crenças religiosas (Fernández-Feito, A. et al, 2020).

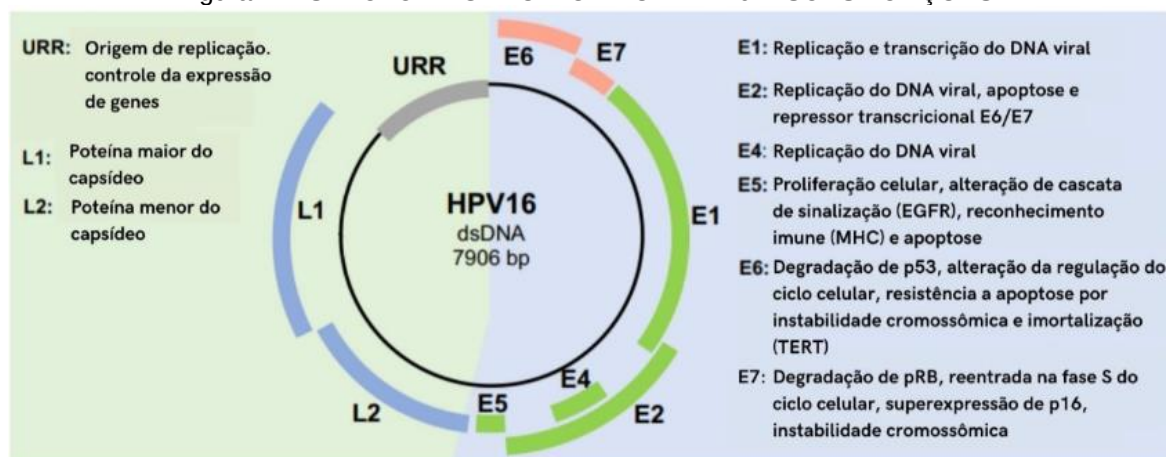
1.2 O PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

Os HPVs são vírus de DNA não envelopados, com genoma circular de fita dupla contendo aproximadamente 8 kb e pertencentes à família *Papillomaviridae* (Chrysostomou, A.C. et al, 2018) (Van Doorslaer, K., 2013). A família *Papillomaviridae* atualmente inclui cerca de 450 tipos distintos de papilomavírus humanos, conforme listado no *Papillomavirus Episteme*, e classificados em cinco gêneros filogenéticos (PaVe, 2024). Os vírus dessa família compartilham a mesma estrutura genômica, sendo organizados em três regiões principais: (i) uma região reguladora a montante (URR, do inglês *Upstream Regulatory Region*), que apresenta promotores, *enhancers* e a origem de replicação; (ii) uma região codificante precoce, que codifica seis genes com funções diversas, os quais são expressos primeiramente no ciclo de infecção viral; e (iii) uma região codificante tardia, que codifica as proteínas de capsídeo L1 e L2 (Bravo, G. I. e Félez-Sánchez, M., 2015) (Mcbride A., A., 2022). Os papilomavírus

apresentam elementos conservados, incluindo a URR, as proteínas iniciais E1 e E2 e as proteínas finais L1 e L2 (Bravo, G. I. e Félez-Sánchez, M., 2015) (Figura 2)

Ao longo de milhares de anos, a evolução do genoma dos papilomavírus resultou em mutações, incluindo polimorfismos, inserções e deleções, processos que, eventualmente, levaram à especiação, originando diferentes tipos de HPV. Nesse caso, um tipo distinto de HPV é estabelecido quando cerca de 10% ou mais da sequência nucleotídica da ORF do gene L1 difere de qualquer outro tipo já caracterizado (Burk, R. D., Harari A., Chen Z., 2013) (Bravo, G. I. e Félez-Sánchez, M., 2015). Já quando há uma similaridade molecular dentro da região L1 de mais de 98%, esses papilomavírus são classificados como variantes, as quais ainda assim podem levar a variações bioquímicas e biológicas nos vírus e em suas funções (Sichero L., Villa L. L., 2006) (Giannoudis A., Herrington C. S., 2001). Essas divergências genômicas são bem representadas quando se analisa o tamanho genômico dos HPVs do gênero alfa, os quais variam de 7700 a 8104 pb (PaVe, 2024).

Figura 2. ESTRUTURA GENÔMICA DO HPV 16 E SUAS FUNÇÕES



FONTE: de Sanjosé S., Brotons M., Pavón M. A., 2018. traduzido.

LEGENDA: Regiões marcadas em verde caracterizam genes com principal função na replicação do DNA viral e proliferação celular; regiões em rosa indicam os principais genes responsáveis pelo processo carcinogênico; regiões em azul indicam genes que codificam para proteínas do capsídeo viral; região em cinza indica a origem de replicação (URR). As principais funções de cada gene estão descritas ao lado.

1.2.1 HPV e câncer

Diferentes tipos de HPV podem ter tropismo para infecção em tecidos distintos, como células epiteliais do trato respiratório superior, pele e mucosa vaginal (Tommasino, M., 2014) (Araldi, R. P. et al, 2018). Cerca de 52 tipos de HPVs do gênero *Alphapapillomavirus* são capazes de infectar o trato anogenital, e, com base em seu potencial oncogênico, esses são classificados como HPVs de baixo risco e de alto risco (hrHPV) (Mcbride A., A., 2022). Os HPVs de baixo risco, como HPV-6 e 11, podem causar verrugas benignas, genitais ou não, chamadas de condilomas e papilomas, e já hrHPVs, podem ser responsáveis pelo desenvolvimento de CCU (Egawa, N., et al, 2015) (Tommasino, M., 2014). Segundo a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC), 12 tipos de HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59) são considerados de alto risco, sendo os tipos 16 e 18, isoladamente, associados à 70% dos casos de câncer de colo de útero (INCA, 2024).

O HPV pode infectar tanto homens quanto mulheres, apesar da prevalência de doenças ser muito maior nas mulheres, devido à alta suscetibilidade do epitélio do colo uterino à infecção pelo HPV (de Sanjosé S., Brotons M., Pavón M. A., 2018). A infecção pelos hrHPVs, é uma causa necessária, porém insuficiente, para o desenvolvimento de quase 100% dos cânceres de colo uterino (Bosch F. X. et al, 2002). O HPV também está associado a uma parte considerável de cânceres anogenitais (como vulvar, vaginal, peniano e anal) e orofaríngeos, assim como outras lesões na pele e mucosas, incluindo verrugas e papilomas benignos (de Sanjosé S., Brotons M., Pavón M. A., 2018). A infecção pelo HPV é contraída por meio do contato sexual, sendo que mulheres adolescentes e jovens adultas recentemente iniciadas na atividade sexual têm o maior risco de contrair o vírus (Oyouni A. A. A., 2023).

O HPV infecta queratinócitos na camada basal do epitélio do colo uterino através de microlesões, ou a partir da zona de transformação, onde o epitélio simples se encontra com o epitélio estratificado (Mcbride A., A., 2022). Com isso, os genomas virais se estabelecem no núcleo, inicialmente como epissomas de baixa cópia, e os genes virais iniciais são expressos, sendo replicados em sincronia com a replicação do DNA celular (Bravo, G. I. e Félez-Sánchez, M., 2015). A fase produtiva do ciclo viral ocorre no epitélio diferenciado, e requer a maquinaria de síntese de DNA celular, levando à produção das proteínas E5, E6 e E7 que desregulam o ciclo celular (Bravo, G. I. e Félez-Sánchez, M., 2015) (Mcbride A., A., 2022). Os tipos de alto risco são mais propensos a estimular a proliferação celular tanto nas camadas basais quanto nas

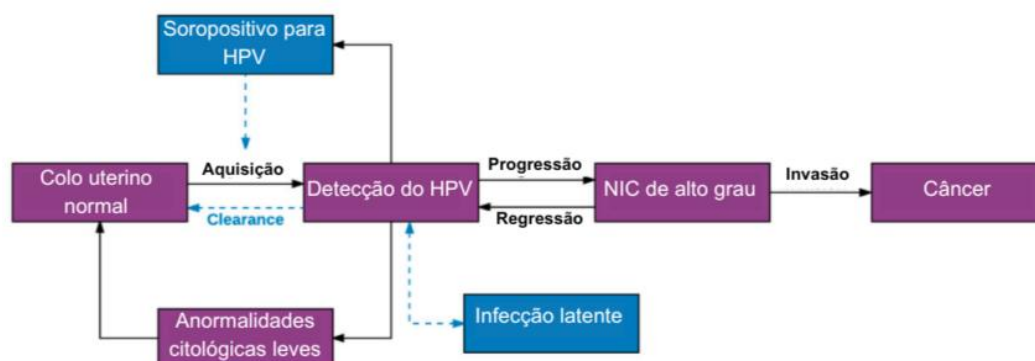
diferenciadas, facilitando a transição de uma infecção produtiva para uma que resulta na transformação epitelial (de Sanjosé S., Brotons M., Pavón M. A., 2018).

Para a iniciação do processo carcinogênico e a progressão das lesões pré-neoplásicas, é importante que ocorra a integração do genoma viral no genoma do hospedeiro, que acontece devido à instabilidade genética causada pelas oncoproteínas E6 e E7 e à presença de sequências micro-homólogas entre o genoma humano e do HPV (Araldi, R. P. et al, 2018). A integração ao genoma humano frequentemente afeta a função do gene E2 do HPV, cujo produto atua como repressor da URR. Dessa forma, a interrupção funcional de E2 leva à uma expressão aumentada de E6 e E7 (Bernard, B. A., et al, 1989) (Mcbride, A. A., 2013). Assim, a proteína E6 inativa a proteína p53, responsável por regular o ciclo celular e induzir apoptose, e a proteína E7 promove a degradação de pRb, permitindo a progressão da célula para a fase S, resultando na perda do controle do ciclo celular e proliferação celular desordenada (Bravo, G. I. e Félez-Sánchez, M., 2015).

1.2.2 Progressão da infecção pelo HPV e possíveis desfechos

Durante uma infecção produtiva pelo HPV, podem ser observadas anormalidades cervicais de baixo grau em exames de triagem, como NIC 1, mas geralmente desaparecem sem intervenção em 1-2 anos. Cerca de 90% das infecções pelo HPV, tornam-se indetectáveis dentro desse mesmo período, o que é comumente chamado de eliminação viral (Gravitt P.E. et al, 2017) (figura 3). No entanto, um grupo de infecções persistentes podem resultar em lesões precursoras do câncer cervical, como a displasia moderada a grave, HSIL ou neoplasia intraepitelial cervical nos graus 2 e 3 (NIC 2 e NIC 3), que são estágios precursores da maioria dos cânceres invasivos do colo do útero. Essas lesões costumam ser diagnosticadas entre 5 e 10 anos após a infecção oncogênica inicial, sendo mais comuns em mulheres entre 25 e 35 anos (Eun, T. J. & Perkins, R. B., 2020). Cerca de 64% das mulheres com menos de 25 anos com NIC 2 eliminarão espontaneamente suas lesões em 2 anos. Porém, as lesões positivas para HPV-16 apresentaram uma probabilidade 31% menor de regressão (Sykes, P. H., 2022).

FIGURA 3. Progressão da infecção do HPV



FONTE: Gravitt P.E. et al, 2017, traduzido.

LEGENDA: Processo de progressão da infecção por HPV. Durante as etapas de NICs, pode haver regressão espontânea das lesões ou, se não tratada, evoluir para o câncer. A figura inclui desfechos como eliminação viral, infecção latente e o progresso para lesões de alto grau até o câncer. Caixas roxas indicam parâmetros já bem aceitos, e caixas azuis indicam incertezas. Setas pontilhadas indicam caminhos alternativos para o processo de progressão da infecção por HPV, onde, em alguns casos, pode haver a eliminação natural do vírus pelo próprio sistema imunológico do hospedeiro; ou então o HPV pode permanecer em estado de latência, sem causar sintomas ou alterações celulares detectáveis.

1.3 GERENCIAMENTO DOS RESULTADOS DO RASTREIO

Apesar da alta sensibilidade inerente ao método de PCR, a testagem molecular para HPV não consegue discriminar infecções transientes e persistentes. Um teste molecular negativo indica a ausência do vírus e assim, baixa probabilidade do desenvolvimento de NIC de alto grau nos próximos 5 – 10 anos. Porém, um teste positivo indica a presença de um fator de risco para o CCU, sendo recomendada uma nova etapa de triagem para melhor gestão dos casos positivos (Catarino, R. et al, 2015).

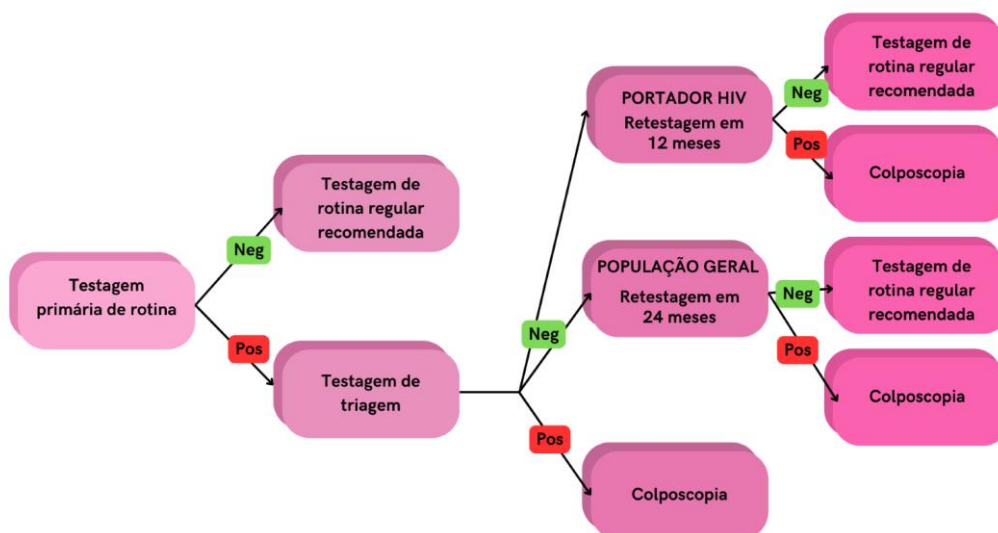
No Brasil, as diretrizes atuais para o rastreamento do CCU ainda não incluem a testagem molecular para HPV e suas recomendações, apesar da inclusão desse teste ao SUS em 2024 (INCA, 2022) (Brasil, 2024). Porém, a OMS, em suas Diretrizes para Tratamento e Prevenção de Lesões Pré-cancerosas Cervicais e Câncer do Colo do Útero, define duas possíveis abordagens de tratamento: abordagem de “rastreamento e tratamento” e “rastreamento, triagem intermediária e tratamento”. Na primeira abordagem, a decisão de tratar é baseada apenas em um resultado positivo no teste de

rastreamento, e já na segunda, a decisão de tratar é tomada após um teste primário positivo, seguido por um segundo teste positivo (um teste de triagem) (WHO, 2021).

Após um teste positivo para HPV, testes de triagem podem ser realizados pelo método de citologia, o qual apresenta maior especificidade em detectar NICs, principalmente após a consciência do status positivo para HPV; ou até mesmo pelo método de inspeção visual com ácido acético (VIA). Outro método recomendado para triagem é a genotipagem total ou parcial do HPV, sendo dessa forma capaz de verificar a presença de tipos oncogênicos, facilitando a estratificação de risco (Bhatla, N., Singhal, S, 2020). Estudos já evidenciaram maiores taxas de detecção de NIC 2 e 3 com co-teste (teste molecular e de citologia) do que apenas pelo teste de citologia (Arbyn, M., et al, 2012), assim como já demonstraram que somente testes negativos para HPV já eram suficientes para garantir baixo risco de lesões de alto grau e CCU (Kathi, H. A., et al, 2011).

Quando o teste de triagem intermediária para casos positivos por DNA - HPV resulta em positivo, recomenda-se a realização de colposcopia com biópsia e exame histopatológico para determinar o tratamento ideal. Quando o teste de triagem resulta negativo, recomenda-se a retestagem por DNA – HPV em 24 meses e, se negativo, passar para o intervalo de rastreio regular. Já para mulheres portadoras de HIV, a retestagem por DNA – HPV é recomendada após 12 meses do resultado negativo de triagem (WHO, 2021) (Figura 4).

Figura 4. Fluxograma de Testagem e Acompanhamento para Detecção de HPV em Populações Geral e Específica (Portadores de HIV)



FONTE: A autora (2024).

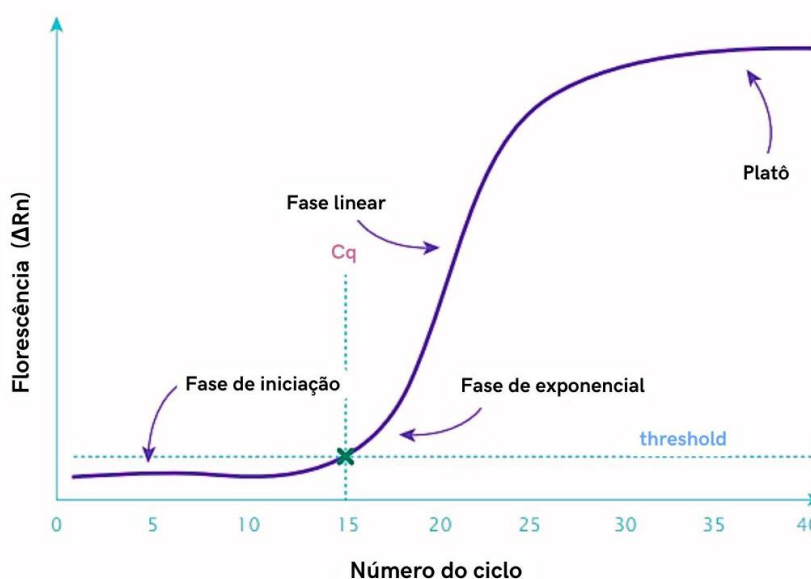
LEGENDA: Processo de rastreamento, triagem intermediária e acompanhamento dependendo dos resultados de detecção de HPV, segundo as diretrizes da OMS para triagem e tratamento de lesões pré-cancerosas cervicais para prevenção do câncer de colo do útero.

1.4 DETECÇÃO POR QPCR

A PCR em tempo real é uma técnica de amplificação do DNA com monitoramento da reação em tempo real, por meio de um sinal fluorescente que aumenta conforme o produto de PCR se forma a cada ciclo da reação. Com alta sensibilidade, o processo permite acompanhar a amplificação das regiões de interesse a partir de uma curva de amplificação, mostrando o aumento da fluorescência a cada ciclo de PCR subsequente, o que gera uma curva com caráter sigmoide (Green, M. R.; Sambrook, J., 2018).

Os dados gerados após a amplificação por qPCR são analisados em softwares específicos, que geram gráficos de amplificação que demonstram o número de ciclos de amplificação em relação ao aumento de fluorescência detectada (Figura 5). Com o aumento da fluorescência, é gerado um *threshold*, o qual representa o limiar onde a fluorescência gerada atinge um nível estatisticamente diferente da fluorescência de background da reação (Green, M. R.; Sambrook, J., 2018), e no qual o aumento de fluorescência é exponencial. Assim, quando a curva de amplificação atinge esse limiar de *threshold*, é determinado o ciclo de *threshold* (Ct), ou ciclo de quantificação (Cq). Com isso, quanto menor o Ct, maior a concentração inicial dos ácidos nucleicos alvo presentes na amostra (PCR Biosystems, 2022) (Green, M. R.; Sambrook, J., 2018).

Figura 5. Representação de um gráfico de amplificação típica por qPCR

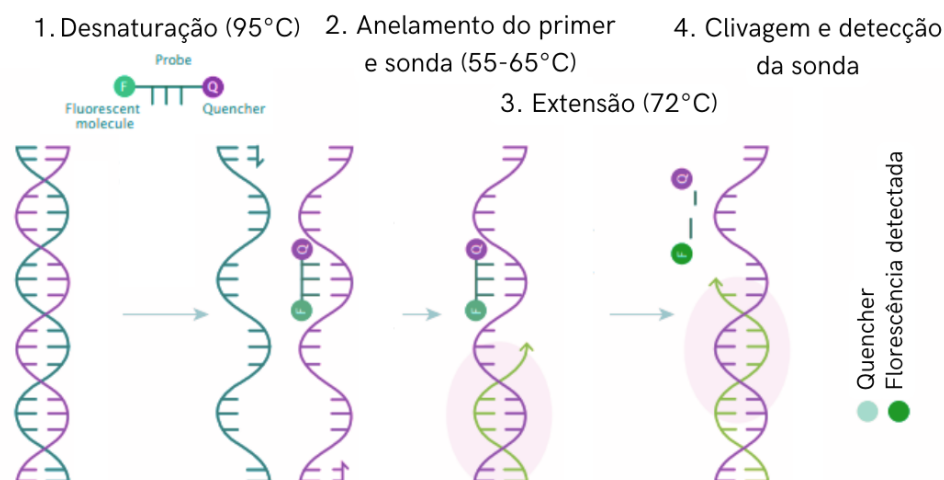


FONTE: PCR Biosystems, 2022. Traduzida.

LEGENDA: Gráfico de amplificação de qPCR que compara a fluorescência (ΔRn) pelo número de ciclos de amplificação de PCR. O início da subida da curva no gráfico representa a fase exponencial da reação, seguida pela fase linear. Já quando os reagentes da reação se tornam limitados, ocorre o platô da curva.

Duas maneiras para a detecção da amplificação da reação via fluorescência são: a detecção baseada na utilização de intercalantes de DNA, como SYBR Green, e a baseada na utilização de sondas, como sondas de hidrólise. A detecção baseada em sondas de hidrólise, é realizada a partir da utilização de sondas nucleotídicas complementares à uma região de interesse da molécula, ligadas covalentemente à um fluoróforo em uma extremidade e à um *quencher* na outra. Os *quenchers* atuam absorvendo a fluorescência emitida pelos fluoróforos, quando estes estão perto. Durante a etapa de extensão da PCR, as sondas ligadas à região de interesse na molécula são clivadas pela DNA polimerase, separando assim o fluoróforo do *quencher*, permitindo a emissão e detecção da fluorescência (PCR Biosystems, 2022) (Figura 6).

Figura 6. Detecção de amplificação por sondas de hidrólise



FONTE: PCR Biosystems, 2022. Adaptada.

LEGENDA: Processamento das sondas de hidrólise para a emissão de fluorescência durante a qPCR. (1) ocorre a desnaturação da dupla fita de DNA à 95°C; (2) a temperatura da reação é reduzida para que ocorra o anelamento dos primers específicos e da sonda de hidrólise (probe); (3) a Taq DNA polimerase inicia a extensão da fita de DNA a partir do ponto de anelamento dos primers; (4) ao passar pela sonda, essa é clivada pela DNA polimerase, separando as extremidades com o fluoróforo e o *quencher*, permitindo a emissão e detecção da fluorescência.

2 JUSTIFICATIVA

A infecção pelo HPV e suas complicações decorrentes ainda são um problema nacional, sendo que o CCU é o terceiro tipo de câncer mais incidente entre as mulheres brasileiras. Dessa forma, a vacinação não substituirá a necessidade de rastreio do CCU, principalmente com a cobertura vacinal não atingindo as metas propostas, pois, além de a vacinação apresentar efeitos maiores à longo prazo, grupos que não foram vacinados possuem um risco maior de desenvolver câncer e dependem do rastreio precoce (Corrêa, F. de M., et al, 2022). Além disso, a vacina disponibilizada pelo SUS contempla apenas os HPV-6, 11, 16 e 18, não protegendo contra o câncer ocasionado por outros tipos oncogênicos.

No Brasil, as diretrizes atuais para o rastreamento do CCU ainda não incluem a testagem molecular para HPV e suas recomendações, apesar da inclusão desse teste ao SUS em 2024 (INCA, 2022) (Brasil, 2024). Dessa forma, esse estudo busca se antecipar às mudanças nas diretrizes, que eventualmente incluirão a testagem molecular para HPV.

Como comentado anteriormente, a incidência de NIC 3 e CCU é significativamente maior para mulheres infectadas com os HPVs 16 e 18, em

comparação com outros hrHPV (INCA, 2024). Dessa forma, um método importante para o rastreamento das infecções por HPV é o teste molecular multiplex por qPCR, por ser capaz de distinguir tipos virais, a partir de suas variações nucleotídicas, sendo assim apto a verificar a presença de tipos oncogênicos, facilitando a estratificação de risco, e podendo, assim, ser utilizado tanto como método de rastreio como de triagem (Bhatla, N., Singhal, S, 2020).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Detectar infecções por HPV de alto risco (hrHPV) em amostras citológicas com lesões cervicais para avaliar a prevalência de diferentes genótipos em coorte composta por mulheres com e sem lesões de alto grau da região de Curitiba.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a testagem molecular por PCR em tempo real para identificar genótipos oncogênicos de HPV, com foco nos tipos 16, 18 e outros hrHPV (HPV-31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68) em amostras citológicas da coorte em estudo;
- Verificar a prevalência dos genótipos detectados na coorte em estudo;
- Comparar os resultados da testagem molecular com dados histológicos ou citológicos das pacientes, para verificar possível relação entre os tipos de HPV e o grau das lesões cervicais;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO

A utilização das amostras para a detecção molecular de hrHPV foi aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos do Hospital Erasto Gaertner, sob o número 1943/2009. As amostras são provenientes de um estudo do tipo caso-

controle, sendo o grupo caso formado por mulheres que apresentavam neoplasias intraepiteliais cervicais (NICs), e o grupo controle composto por mulheres sem lesões.

As amostras de casos utilizadas nesse estudo são resultantes de coletas realizadas entre os anos de 2010 e 2012 no Hospital Erasto Gaertner em Curitiba - Paraná. As amostras do grupo controle provêm de campanhas públicas para triagem cervical, realizadas nos mesmos anos, coletadas nos seguintes: Cercadinho; Jardim Rondinha; Ferraria; Itaboa; Guarany; Águas Claras; Botiatuva; Penitenciária Feminina de Piraquara; Casa 3 e Casa 4 da UFPR.

Durante as coletas, as mulheres foram entrevistadas para obtenção de informações sociocomportamentais, incluindo: idade, instrução, ancestralidade familiar, idade da primeira reação sexual, número de parceiros sexuais, data do último preventivo coletado, prática de tabagismo, entre outros (Gillio-Tos, A., 2012). As idades das mulheres recrutadas para esse estudo variam de 14 a 47 anos, sendo que mulheres com mais de 47 anos não foram incluídas nas coletas para evitar alterações nos resultados citológicos, devido à atrofia ou displasia do colo do útero relacionadas à menopausa, as quais podem alterar a morfologia celular (Gillio-Tos, A., 2012) (Saad, R. S., et al, 2006).

As amostras de células do epitélio do colo uterino foram coletadas com escova endocervical (QIAGEN, Digene® Female Swab Specimen Collection Kit, Hilden: Qiagen) e preservadas em meio de transporte de amostras STM (Specimen Transport Medium) (QIAGEN, Digene®). Exames de citologia e biópsia também foram realizados, quando necessário.

Neste estudo, foram utilizadas 203 amostras do grupo caso, das quais 12 apresentavam testagem prévia para HPV, sendo 9 por genotipagem parcial do HPV, a partir de PCR multiplex com sondas específicas (Gillio-Tos, A. *et al*, 2012) e 3 por amplificação com os primers GP5/6+ e PGMY9/11, os quais detectam uma ampla gama de genótipos a partir da amplificação de uma porção do gene L1 do HPV (HUSMAN et al., 1995) (Coutlée, F. et al, 2002). As amostras estavam armazenadas no laboratório em freezer à -20°C.

4.2 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA

As células de raspado do colo uterino tiveram seu DNA extraído por diferentes métodos de extração, sendo que para iniciar o processo, as amostras citológicas

foram descongeladas em temperatura ambiente, homogeneizadas em vórtex e centrifugadas. 10 amostras foram extraídas pelo método manual baseado em coluna de afinidade com o kit PureLink Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, EUA), utilizando 200uL de amostra, seguindo as instruções do fabricante. Esse método de extração se baseia inicialmente na lise celular, a partir da incubação da amostra com uma solução caotrópica e proteinase K; na então ligação do DNA na membrana de sílica presente nos tubos filtro, seguido de lavagens para remover os contaminantes; e então na eluição do DNA em um tampão de eluição (Thermo Fisher Scientific, 2024).

Já 48 amostras foram extraídas com o extrator e purificador de DNA e RNA automático Extracta 32 da Locus, o qual utiliza o método de extração por beads magnéticas. O kit utilizado foi o Extracta kit fast – DNA e RNA viral, adicionando-se inicialmente 5uL de proteinase K e 100uL de amostra. Nesse método, a extração segue os passos de lise celular; ligação do DNA às beads magnéticas, devido à diferença de carga; etapas de lavagem; e eluição do material genético.

O restante das amostras (144) foi extraído pelo método de salting-out, adicionando entre 100 e 200uL de amostra, dependendo da quantidade de material disponível. Esse método se baseia na lise das membranas celulares e proteínas, a partir da adição de SDS e proteinase K; precipitação dessas, por adição de altas concentrações de NaCl e centrifugação; recuperação do DNA por precipitação alcoólica e eluição em água.

As concentrações de ácidos nucleicos e as razões de absorbância em 260 nm e 280 nm e em 260nm e 230nm foram estimadas utilizando o aparelho NanoDrop2000.

4.3 AMPLIFICAÇÃO DE BETA-GLOBINA HUMANA

A amplificação da beta-globina humana (B-globina) foi utilizada para verificar a integridade do material genético das amostras, e funcionou como um controle interno. Foi utilizado como controle negativo água de injeção e como controle positivo amostra de DNA extraída de sangue periférico.

Os primers utilizados foram sintetizados pela Applied Biosystems Custom Primers and Probes, Thermo Fisher Scientific (Carlsbad, CA, USA) foram: Globina F (5' GCT TCT GAC ACA ACT GTG TTC AC 3') e Globina R (5' GGC CTC ACC ACC

AAC TTC AT 3'), tendo como resultado um amplicom de 128pb (NCBI: UCSC In-Silico PCR).

O protocolo para a amplificação da reação foi de 1x de tampão; 0,2mM de dNTP; 2mM de MgCl₂; 0,5uM de cada primer; e 0,5U de Taq polimerase. As condições de ciclagem foram: 1 ciclo de 95°C por 1 min; 30 ciclos à 95°C, à 55°C e à 72°C por 30s; e uma extensão final à 72°C por 5 min seguido de estabilização à 4°C. O volume final da reação foi de 25uL.

Os reagentes utilizados para as reações de PCR foram adquiridos da *Promega Corporation* (Kit GoTaq® DNA Polymerase), seguindo as especificações do fabricante.

4.4 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

O produto das reações de PCR de B-globina foi analisado por eletroforese em gel de agarose (Kasvi) à 1,5% em TBE 1X. Foram adicionados 2uL dos produtos das amplificações com 1,5uL de azul de bromofenol (0,25%) com glicerina (30%) e gel red à 1X. Para a verificação do tamanho das bandas, foi utilizado marcador de peso molecular de 100 pb (100bp DNA Ladder Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), sendo que o volume de material adicionado ao gel foi o mesmo. As imagens dos géis de agarose foram capturadas utilizando o sistema de documentação de géis de luz ultravioleta (UV) DNR Bio-Imaging Systems (Gel Documentation Systems, DNR Bio-Imaging Systems).

4.5 AMPLIFICAÇÃO POR PCR EM TEMPO REAL

A qPCR foi realizada utilizando o Kit IBMP Biomol HPV Alto Risco, o qual é utilizado para a detecção molecular qualitativa de genótipos oncogênicos do HPV (IBMP, Kit Biomol HPV Alto Risco). O kit é capaz de discriminar os genótipos de HPV-16 e HPV-18, além de detectar outros 12 tipos de alto risco em um grupo denominado "HPV-AR", os quais fazem parte: HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-56, HPV-58, HPV-59, HPV-66 e HPV-68.

A reação do kit é multiplex e tem como alvo os genes E6 e E7 de diferentes tipos de HPV, além de um controle interno endógeno. A detecção da presença de ácidos nucleicos dos alvos moleculares é realizada através de sondas de hidrólise

específicas. A amplificação do controle interno (CI) confirma o bom desempenho da reação, além de indicar a qualidade do DNA extraído da amostra. O fabricante também preconiza a inclusão de um controle positivo sintético (CP) e um controle negativo (CN) a cada experimento, para verificar a eficiência e a contaminação da reação, respectivamente. Tais controles são fornecidos no kit. Assim, uma amostra negativa deve apresentar amplificação apenas do CI na qPCR, indicando negatividade especificamente para os vírus HPV-16, 18 e outros HPVs de alto risco. Já uma amostra positiva, deve amplificar o CI e pode amplificar HPV-16 e/ou HPV-18 e/ou HPV-AR, indicando infecção por vírus específicos. Caso uma amostra positiva não amplifique o CI, ela será desconsiderada, pois não se pode garantir a qualidade do DNA extraído.

Para a reação, inicialmente foi elaborado o mapa de amplificação da placa, identificando os poços a serem utilizados e a posição de cada amostra, juntamente com o controle positivo e negativo do kit. Em seguida, os volumes da mistura de reação foram calculados, com base no número de amostras que seriam amplificadas (Quadro 1). Em cada placa, também foi incluído um segundo controle negativo (CN2), composto por água ultrapura, que não deveria apresentar nenhum tipo de amplificação, diferente do controle interno do kit, o qual amplifica o controle endógeno.

QUADRO 1 – Preparo da mistura da reação de qPCR do Kit IBMP Biomol HPV de Alto Risco

Mistura de reação	
Componentes da mistura	Volume para 1 reação
Tampão de PCR	5,0 uL
Oligomix	6,6 uL
Enzima	0,4 uL
TOTAL	12,0 uL

FONTE: IBMP, Brasil (2023)

Com isso, 12uL da mistura de reação foram adicionados à 8uL de DNA em uma microplaca óptica de 0,1mL com 96 poços (Applied Biosystems® MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate), seguindo o mapa de amplificação. A placa foi selada com adesivo óptico (Applied Biosystems® MicroAmp® Optical Adhesive Film), centrifugada e então submetida a ciclagem efetuada no equipamento QuantStudio 5

Real-Time PCR System (Applied Biosystems, EUA), conforme preconizado no protocolo do kit (Quadros 2 e 3).

QUADRO 2 – Fluorescências para configuração de cada alvo

Alvo	Report
HPV-16	FAM
HPV-18	VIC
HPV-AR	ROX
Controle Interno (CI)	Cy5

FONTE: IBMP, Brasil (2023)

QUADRO 3 – Parâmetros de termociclagem

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
1° estágio	95	10 min	1
2° estágio	95	15 seg	40
	60	30 seg	

FONTE: IBMP, Brasil (2023)

4.5.1 Análise e interpretação dos Resultados de qPCR

As análises dos dados das qPCRs foram realizadas com o uso do *Design & Analysis Software* versão 2.8.0 (Thermo Fisher Scientific, EUA). Assim, para cada alvo, foi determinado um *threshold* diferente, sendo de 40.000 para HPV-16; 30.000 para HPV-18; 20.000 para HPV-AR e 15.000 para o controle interno, de acordo com os parâmetros definidos no protocolo do fabricante. Dessa forma, as reações que ultrapassaram a linha de *threshold* apresentaram uma intensidade de fluorescência de amplificação acima dos níveis de background, e seu Ct (ciclo de *threshold*) foi calculado. Após avaliar o valor de Ct, pode-se considerar que houve amplificação da amostra.

De acordo com as instruções do fabricante, para que uma corrida seja considerada válida, o CP deve apresentar amplificação para todos os 4 alvos avaliados, apresentando $Ct \leq 25$, e o CN não deve apresentar amplificação para nenhum dos alvos de HPV, mas deve apresentar amplificação do CI com $Ct \leq 25$. Já, para que uma amostra seja considerada negativa, ela não deve apresentar

amplificação para nenhum dos alvos de HPV, e deve apresentar amplificação do CI com $Ct \leq 33$. Para uma amostra ser considerada positiva, ela deve apresentar amplificação com curva de perfil típico para algum dos alvos de HPV, assim como para CI. Porém, valores de $Ct \leq 5$ devem ser desconsiderados e a amostra deve ser repetida (Quadro 4).

QUADRO 4 – Critérios para interpretação dos resultados

Na amostra				CP	CN	Resultado
HPV-16	HPV-18	HPV-AR	CI			
-	-	-	+	+	-	Não detectável
+	-	-	+	+	-	Detectável HPV-16
-	+	-	+	+	-	Detectável HPV-18
-	-	+	+	+	-	Detectável HPV-AR
-	+	+	+	+	-	Detectável HPV-18 e AR
+	-	+	+	+	-	Detectável HPV-16 e AR
+	+	-	+	+	-	Detectável HPV-16 e 18
+	+	+	+	+	-	Detectável HPV-16, 18 e AR
+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	Ensaio inválido
+/-	+/-	+/-	+/-	-	+/-	Ensaio inválido
-	-	-	-	+	-	Amostra inválida

FONTE: IBMP, Brasil (2023). Adaptada

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos por esse estudo foram organizados e analisados utilizando o software Microsoft Excel 365 (Microsoft Corporation) para tabulação e cálculos iniciais, e o GraphPad Prism (versão 8, GraphPad Software) para análises estatísticas e confecção de gráficos.

A prevalência dos tipos de HPV encontrados foi determinada a partir da determinação de frequências absolutas e relativas, com intervalo de confiança (IC) de 95%. Para verificar associações entre variáveis, foi calculada a Odds Ratio (OR) com IC de 95%. Foram calculados a partir dos testes exato de Fisher e Qui-quadrado a significância estatística dos resultados encontrados, considerando significativo $p < 0,05$.

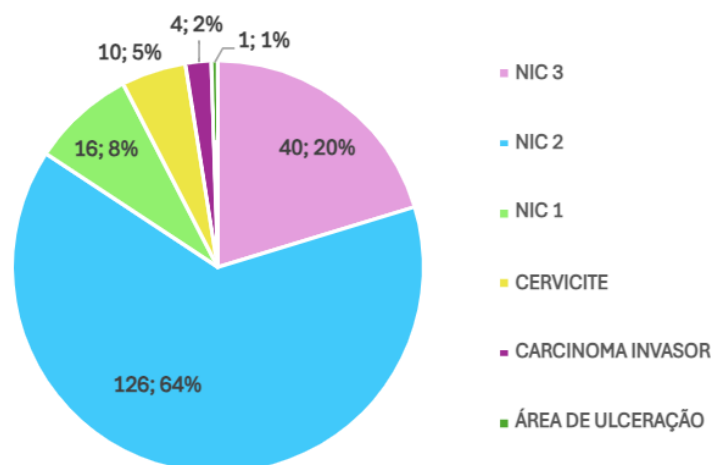
5 RESULTADOS

5.1 DISTRIBUIÇÃO DE DIAGNÓSTICOS HISTOPATOLÓGICOS NAS BIÓPSIAS E CITOLOGIAS CERVICAIS

Os resultados de citologia por Papanicolau e biópsia das pacientes do estudo foram coletados e a distribuição das diferentes categorias diagnosticas é apresentada no Gráfico 1. Foram analisadas um total de 197 resultados, sendo desses 187 provenientes de biópsia e 10 de citologia. 10 pacientes apresentaram laudos apenas por citologia, e 7 apenas por biópsia.

Dos 180 resultados provenientes de biópsia, mas também com resultados de citologia, 52 apresentaram resultados divergentes entre os laudos. Sendo que desses, 73,08% apresentavam laudos mais brandos por citologia.

GRÁFICO 1 – Distribuição das categorias diagnosticadas

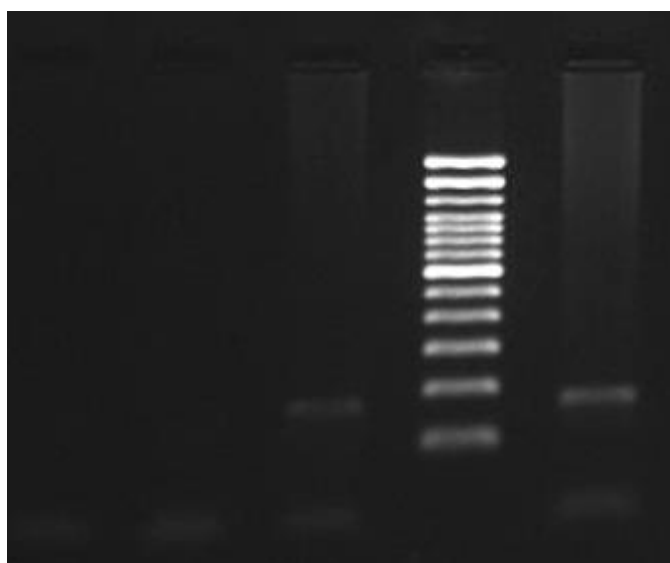


LEGENDA – Resultados de exames citológicos e de biópsias de colo de útero das amostras do grupo caso. Amostras com ausência de resultados de biópsia tiveram seus laudos de citologia analisados (n= 10). Do total de 197 amostras analisadas, 40 apresentaram laudos para Neoplasia intraepitelial cervical grau 3 (NIC 3); 126 para Neoplasia intraepitelial cervical grau 2 (NIC 2); 16 para Neoplasia intraepitelial cervical grau 1 (NIC 1); 10 para cervicite; 4 para carcinoma invasor e 1 para área de ulceração.

5.2 AMPLIFICAÇÃO DE B-GLOBINA HUMANA

Das 203 amostras inicialmente extraídas, 106 foram submetidas a amplificação de B-globina. Dessas, 59 apresentaram a banda esperada na análise do gel de eletroforese, e 42 não apresentaram a banda (Figura 7).

Figura 7. Gel de eletroforese para detecção da banda de B-globina



LEGENDA: Gel de eletroforese à 1,5% de algumas amostras utilizadas. A presença da banda indica a presença do gene da B-globina humana. Da esquerda para a direita: amostra negativa, controle

negativo, amostra positiva, marcador de peso molecular e controle positivo. Foi utilizado como controle negativo água de injeção e como controle positivo amostra de DNA extraída de sangue periférico

5.3 TESTE DO KIT IBMP BIOMOL HPV ALTO RISCO

Inicialmente, para a verificação da aplicabilidade do kit com as amostras disponíveis, 14 amostras foram selecionadas para a reação de qPCR. Dessas, 9 incluíam amostras com resultados anteriores por genotipagem parcial do HPV, a partir de PCR multiplex com sondas específicas (Gillio-Tos, A. *et al*, 2012); 3 com resultados positivos por amplificação com os primers GP5/6+ e PGMY9/11; e mais 2 amostras sem resultados prévios. Além disso, as amostras utilizadas no teste foram extraídas pelos 3 métodos de extração comentados anteriormente, para verificar se o método interferiria na reação (Quadro 5). Todas as amostras amplificadas foram positivas para B-globina humana.

QUADRO 5 – Amostras utilizadas na testagem do kit

Método de extração	Amostras	Resultados anteriores HPV
Automática	EGN224	16, 18, 31
Automática	EGN274	16, 52
Automática	EGN271	NEG
Automática	EGN268	52
Coluna	EGN005	pos GP e PGMY
Coluna	EGN010	pos GP e PGMY
Automática	EGN021	pos GP e PGMY
Automática	EGN198	16
Automática	EGN211	33
Automática	EGN238	52
Automática	EGN195	31,35,52
Automática	EGN251	59
Salting-out	EGN276	-
Salting-out	EGN282	-

LEGENDA – Amostras utilizadas, indicando o método de extração do material genético, código da amostra e resultado anterior para HPV. Amostra com resultado “neg” indica negatividade para a presença de HPV; amostras com “-” não haviam sido testadas para a presença HPV; amostras “pos

GP e PGMV” foram detectadas como positivas com o uso dos conjuntos de primers GP5/6+ e PGMV9/11 por PCR convencional.

As amostras foram submetidas a amplificação por qPCR juntamente com os CP e CN do kit, seguindo os parâmetros indicados anteriormente.

Ao analisar os resultados, todas as amostras anteriormente positivas foram detectadas como positivas após a qPCR. Porém, uma amostra antes positiva para HPV-16, 18 e 31, foi positiva na qPCR apenas para HPV-18 e AR. Todas as amostras analisadas apresentaram amplificação do CI com $Ct < 33$. O CP apresentou amplificação para todos os 4 alvos avaliados, apresentando $Ct < 25$ e o CN amplificou apenas o CI com $Ct < 25$. Dessa forma, o kit foi considerado apto a detectar HPV nas amostras utilizadas no estudo (Quadro 6).

QUADRO 6 – Comparação dos resultados antes e após qPCR

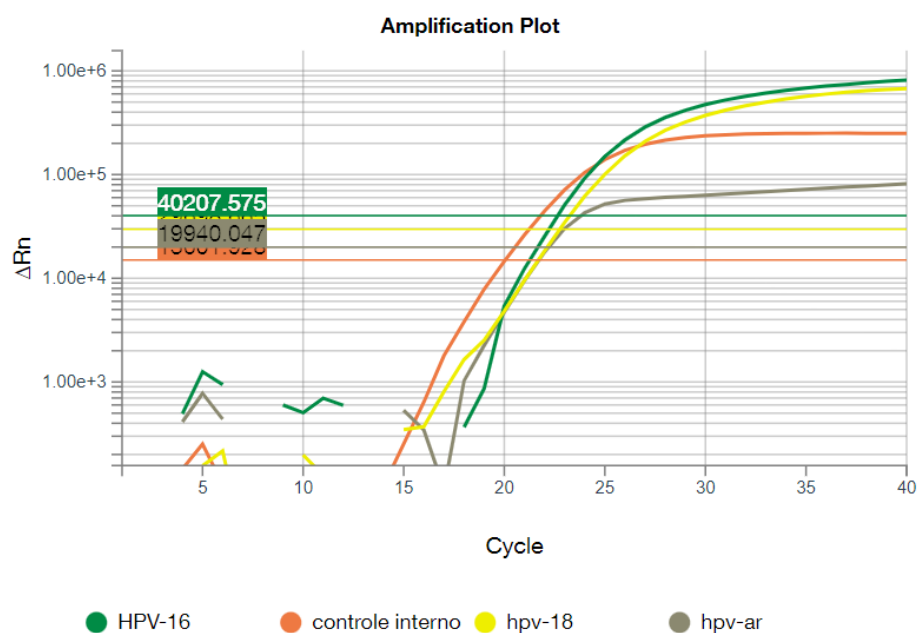
Resultados anteriores HPV	Resultados qPCR
16, 18, 31	AR, 18
16, 52	AR, 16
NEG	NEG
52	AR
pos GP e PGMV	16
pos GP e PGMV	16
pos GP e PGMV	AR
16	16
33	AR
52	AR
31,35,52	AR
59	AR
-	NEG
-	NEG

LEGENDA – Amostras detectadas como HPV-AR podem ser positivas para qualquer um dos HPVs a seguir: HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-56, HPV-58, HPV-59, HPV-66 e HPV-68. Amostra com resultado “neg” indica negatividade para a presença de HPV; amostras com “-” não haviam sido testadas para a presença HPV; amostras “pos GP e PGMV” foram detectadas como positivas com o uso dos conjuntos de primers GP5/6+ e PGMV9/11 por PCR convencional.

5.4 DETECÇÃO DE HPV POR QPCR

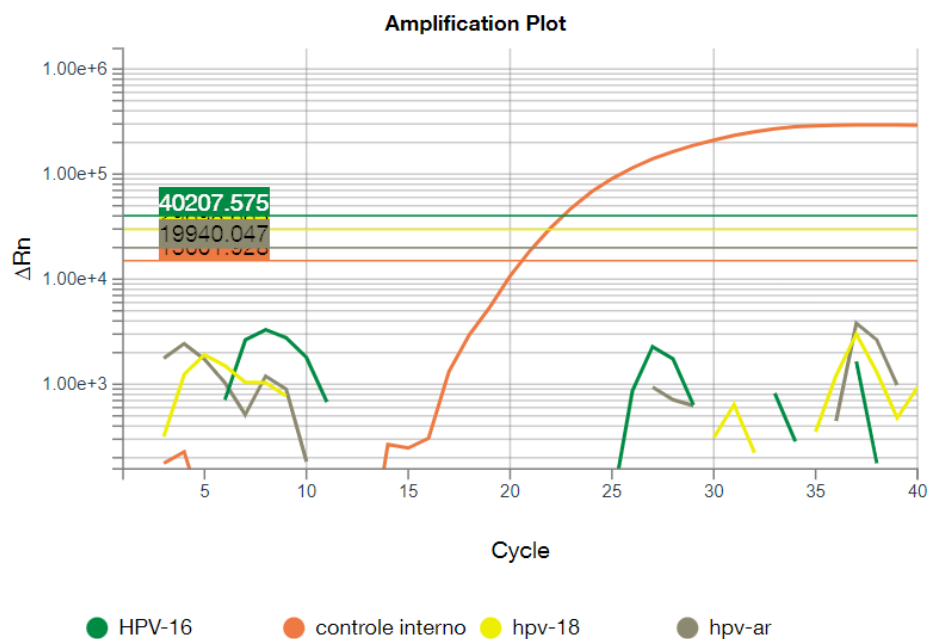
As 191 amostras restantes foram submetidas a amplificação por qPCR, mas 5 falharam, não apresentando curva de amplificação, e 1 amostra não apresentou amplificação do CI, sendo então desconsideradas nas análises. Todas as amostras restantes apresentaram amplificação do CI com $Ct \leq 33$, sendo, portanto, consideradas válidas. O CP apresentou amplificação para todos os 4 alvos avaliados (Gráfico 2), com $Ct \leq 25$ e o CN amplificou apenas o CI com $Ct \leq 25$ (Gráfico 3). O CN2 não apresentou curvas de amplificação em nenhuma das reações de qPCR (Gráfico 4).

Gráfico 2. Curva de amplificação do Controle Positivo (CP)



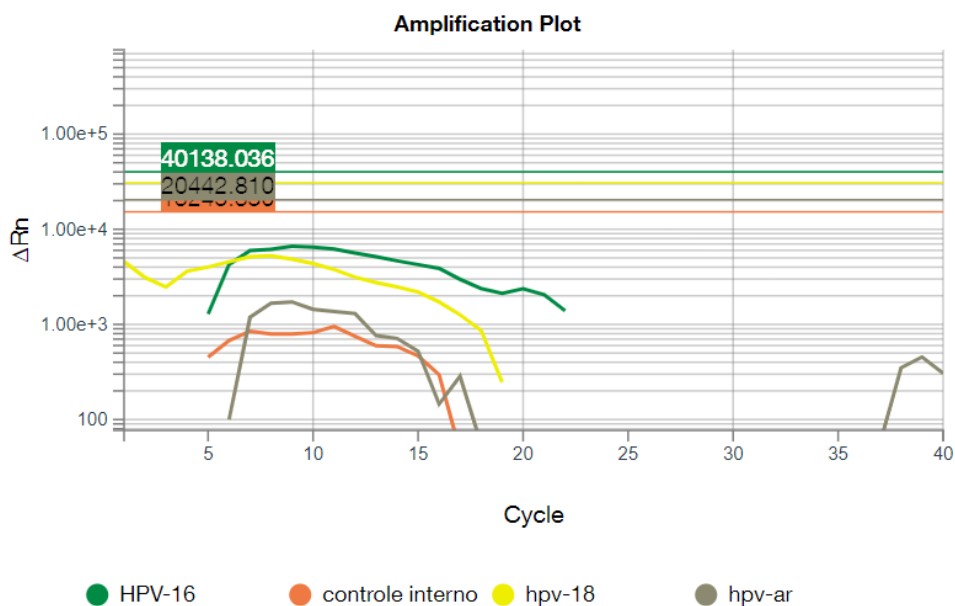
LEGENDA – Amplificação por qPCR do Controle Positivo. Gráfico de fluorescência (ΔRn no eixo Y) por número de ciclos (eixo X) da amostra de controle positivo fornecida pelo fabricante do kit. O *threshold* foi determinado conforme os parâmetros indicados pelo kit. Os valores de Ct foram: CI: 20,0; AR: 22,0; HPV-16: 22,6; HPV-18: 22,7. As cores indicam os respectivos alvos de amplificação da reação multiplex.

Gráfico 3. Curva de amplificação do Controle Negativo (CN)



LEGENDA – Amplificação por qPCR do Controle Negativo. Gráfico de fluorescência (ΔRn no eixo Y) por número de ciclos (eixo X) da amostra de controle negativo fornecida pelo fabricante do kit. O *threshold* foi determinado conforme os parâmetros indicados pelo kit. Os valores de Ct foram: CI: 20,5; os demais: indeterminado. As cores indicam os respectivos alvos de amplificação da reação multiplex.

Gráfico 4. Curva de amplificação do Controle Negativo 2 (CN2)



LEGENDA – Amplificação por qPCR do Controle Negativo 2, composto por água de injeção. Gráfico de fluorescência (ΔRn no eixo Y) por número de ciclos (eixo X). Não apresentou amplificação de nenhum dos alvos. As cores indicam os respectivos alvos de amplificação da reação multiplex.

Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Prevalência de HPV

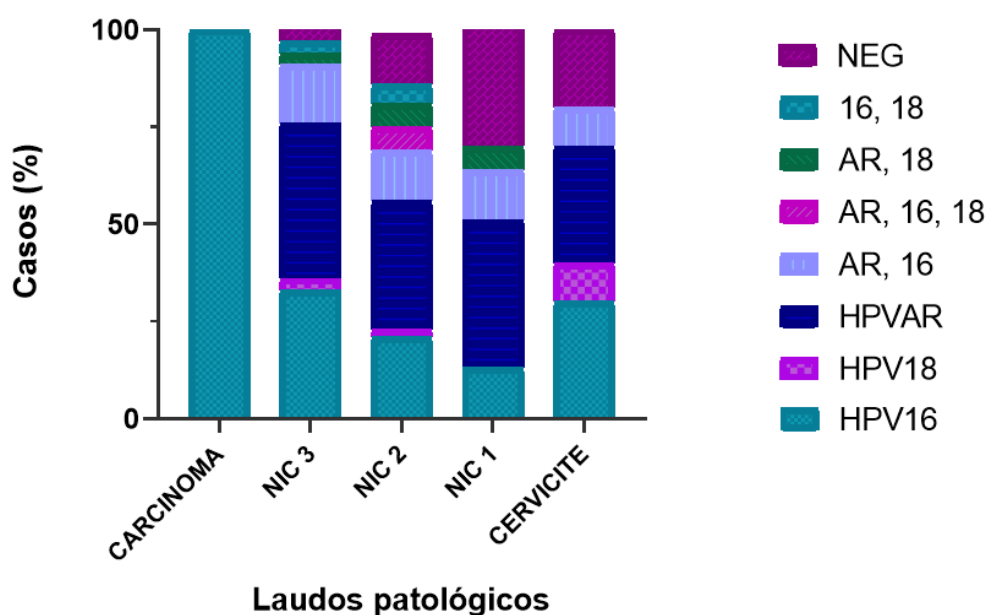
HPVs	Quantidade casos	Prevalência (%)	IC (95%)
HPV-16	49	24,87	19,4 - 31,4
HPV-18	5	2,54	1,1 - 5,8
HPV-AR	67	34,01	27,8 - 40,9
AR e 16	27	13,71	9,6 - 19,2
AR, 16 e 18	7	3,55	1,7 - 7,2
AR e 18	9	4,57	2,4 - 8,5
16 e 18	7	3,55	1,7 - 7,2
NEG	26	13,20	9,2 - 18,6
TOTAL	197	100,00	

LEGENDA – Resultados de casos totais de HPV por tipo e cálculo de prevalência com os devidos intervalos de confiança (IC).

5.5 COMPARAÇÃO ENTRE LESÕES E RESULTADOS DA DETECÇÃO MOLECULAR DE HPV

Os resultados dos laudos histológicos e citológicos das pacientes foram comparados entre os diferentes grupos de infecções por HPV (Gráfico 5).

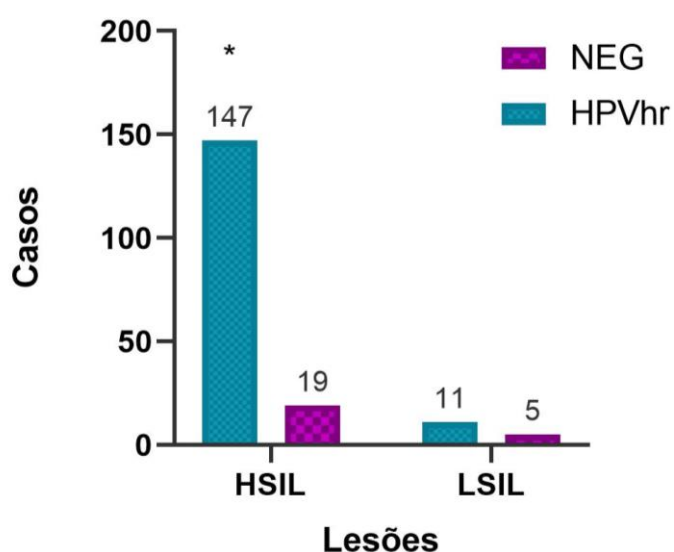
Gráfico 5. Distribuição dos resultados para HPV em porcentagem em relação aos laudos patológicos



LEGENDA – Os laudos de histologia ou citologia das pacientes foram comparados com os respectivos resultados para HPV por qPCR. Gráfico de porcentagem de tipos de infecção por HPV (eixo Y) por laudos patológicos (eixo X). carcinoma invasivo (n= 4); NIC 3 (n= 40); NIC 2 (n= 126); NIC 1 (n= 16); cervicite (n= 10).

Ao serem comparados resultados positivos e negativos para hrHPV com o grau das lesões cervicais, o cálculo da OR indicou associação considerável entre a presença de hrHPV e o diagnóstico de HSIL (OR= 3,517), com IC 95% de 1,235 - 10,78. O cálculo do Teste exato de Fisher ($p= 0,0417$) e Qui-quadrado ($p= 0,0254$) indicaram significância estatística dos resultados (Gráfico 6).

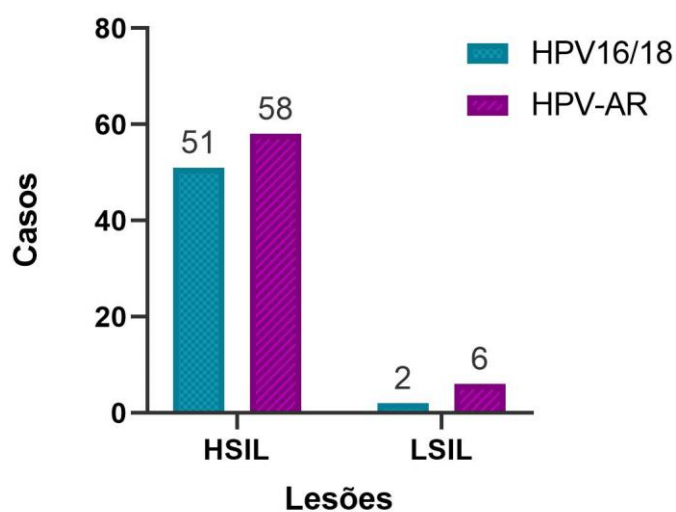
Gráfico 6. Distribuição dos diagnósticos de lesões do colo do útero de acordo com o status da infecção por hrHPV (presença ou ausência)



LEGENDA – Distribuição das lesões escamosas intraepiteliais de alto grau (HSIL) e baixo grau (LSIL) em pacientes positivas para HPV de alto risco (HPVhr) e pacientes negativas (NEG). A análise estatística mostrou uma diferença ($p < 0,05$), indicando associação entre a presença de HPVhr e o diagnóstico de HSIL. No grupo HSIL, foram incorporadas amostras NICs 2 e 3, e o grupo LSIL é representado por amostras NIC 1. HSIL (n= 199); LSIL (n= 16).

Já quando foi comparada a frequência de casos positivos para HPV 16 e/ou 18 e casos HPV-AR com o grau das lesões cervicais, não foram observadas diferenças estatísticas entre os resultados ($p = 0,289$) (Gráfico 7).

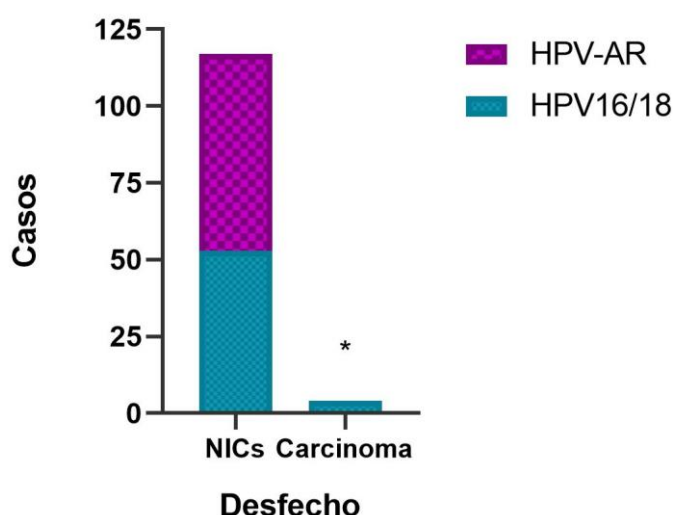
Gráfico 7. Distribuição dos diagnósticos de lesões do colo do útero em relação a presença de infecção por HPV-16/18 ou HPV-AR



LEGENDA – Distribuição das lesões escamosas intraepiteliais de alto grau (HSIL) e baixo grau (LSIL) em pacientes positivas para HPV-16 e/ou 18 e HPV-AR (HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-56, HPV-58, HPV-59, HPV-66 e HPV-68). HSIL (n= 109); LSIL (n= 8).

Ao ser avaliada a distribuição de infecção por HPV-16 e/ou 18 e HPV-AR em relação ao laudo de carcinoma invasivo, a presença de HPV-16/18 apareceu mais frequente nesses casos, com significância estatística pelo Teste exato de Fisher ($p=0,0465$) e Qui-quadrado ($p=0,0311$). Porém a associação não pode ser verificada pelo valor de OR (0,000) (Gráfico 5).

Gráfico 3. Distribuição de laudos em relação a presença de infecção por HPV-16/18 ou HPV-AR



LEGENDA – Associação entre os genótipos de HPV-AR e HPV-16/18 e os laudos para NICs e carcinoma invasor. Os resultados indicam que o HPV-16/18 aparece mais frequentemente em casos de carcinoma invasor, em comparação com outros HPV-AR ($p<0,05$). O diagnóstico de carcinoma invasor inclui laudos como: adenocarcinoma in situ, microcarcinoma invasor e carcinoma de células escamosas. NICs (n= 117, sendo HPV16/18: 53 e HPV-AR: 64); Carcinoma invasor (n= 4).

6 DISCUSSÃO

Nesse estudo, 3 métodos diferentes de extração foram utilizados para isolar o material genético. Todos os métodos foram capazes de isolar DNA com concentração e pureza suficientes para as amplificações por qPCR. Porém, das 6 amostras que falharam nas qPCRs, todas haviam sido extraídas por salting-out. Isso pode indicar uma contaminação por sal nessas amostras, que pode não ter sido bem

retirado durante as etapas de centrifugação. Estudos citam que o excesso de sais afeta a funcionalidade das DNA polimerases, o que pode ter sido o causador das falhas nas amplificações (Favre, N.; Rudin, W., 1996) (Davalieva, K., 2010). Para mitigar essa contaminação, as amostras poderiam ter sido purificados com a utilização de beads magnéticas após as extrações por salting-out, diminuindo a presença de contaminantes. As amostras não foram purificadas antes, pois os seus parâmetros de concentração e absorbância estavam similares às outras amostras que não falharam na qPCR, e purificar todas as amostras que foram extraídas por salting-out seria inviável.

Além disso, após a extração das amostras, 106 foram submetidas à amplificação para B-globina. Apesar de 44% das amostras não terem amplificado para B-globina, todas essas apresentaram amplificação na qPCR, com amplificação do CI e Ct dentro dos valores esperados. Isso demonstra a maior sensibilidade da reação de qPCR em relação à PCR convencional e que a amplificação por B-globina humana não é um bom controle interno para a reação do kit utilizado.

Durante o teste com o kit de detecção molecular por qPCR, uma amostra apresentou resultados divergentes em relação aos resultados anteriores para HPV. Apesar dos testes moleculares terem sido realizados com amostras da mesma paciente, foram amostras coletadas e armazenadas em dois tubos diferentes – uma extraída e amplificada em 2012, e outra extraída e amplificada em 2024. Com isso, pode ser que essa amostra específica tenha apresentado menor carga viral e com isso, não tenha sido detectada na qPCR. Outra hipótese possível é a detecção mais acurada dos genótipos presentes na amostra pela maior sensibilidade da qPCR, e o resultado anterior ser decorrente de um falso positivo devido às falhas na técnica pelas sondas utilizadas na primeira testagem. Ambas as técnicas apresentam limitações, as quais devem ser levadas em conta no momento da comparação dos testes: a detecção feita em 2012 foi realizada a partir da técnica de *nested* PCR, com a utilização de um conjunto de primers sintetizados *in-house* (Sotlar, K. et al, 2004) (Gillio-Tos, A., 2012), não sendo utilizados primers comerciais como os do estudo atual; e ambas as técnicas apresentam a limitação dos reagentes utilizados na reação multiplex, pois um genótipo de HPV mais predominante nas amostras pode consumir mais reagentes, afetando a amplificação de outros.

As análises da prevalência de genótipos de HPV na população estudada apresentaram como mais prevalente a infecção por HPV-AR, que inclui os tipos HPV-

31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68, seguido por infecções pelo HPV-16. Apesar de estudos epidemiológicos globais indicarem o HPV-16 como o hrHPV mais prevalente (Bruni, L., et al, 2023) (Araldi, R., P., et al, 2018), no Brasil, um estudo recente indicou o HPV-52 como o de maior prevalência, seguido do HPV-16 (Wendland, E., M., et al, 2020). Como o kit de detecção molecular utilizado diferencia apenas HPV-16 e 18, não podemos definir exatamente os HPVs detectados dentro do grupo HPV-AR, porém, de qualquer forma, os resultados de prevalência encontrados neste estudo estão de acordo com os encontrados em outros artigos citados, levando em conta as variações na prevalência de acordo com a área geográfica (Araldi, R., P., et al, 2018) (Wendland, E., M., et al, 2020) (González-Yebra, B. et al., 2022) .

A coorte utilizada no estudo em questão foi composta por mulheres não vacinadas, por se tratarem de amostras coletadas entre os anos 2010 e 2012. Por isso, a análise da prevalência de HPV nessa coorte apresenta valor histórico, ao auxiliar na compreensão da distribuição base dos genótipos de HPV antes da introdução das vacinas. Assim, esses dados fornecem um ponto de comparação para avaliar o impacto direto das campanhas de vacinação em termos de redução da prevalência de genótipos de hrHPV incluídos na vacina quadrivalente, como HPV-16 e 18. Não só é interessante observar a diferença na prevalência de tipos de infecção pós-vacina, como também a correlação com alterações clínicas, como NIC e câncer, pois isso poderia fornecer informações sobre o impacto da vacinação com a associação às lesões relacionadas ao HPV.

Os resultados demonstraram associação entre hrHPV e HSIL, o que condiz com a história natural de progressão dos hrHPVs (Loopik, D. L. et al, 2021) (De Martel, C., 2017) (Bosch F. X. et al, 2002). Além disso, a distribuição dos genótipos HPV-16/18 e HPV-AR (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59,66 e 68) se apresentou de forma semelhante nas lesões de alto grau. Já, quando comparado com a associação com o câncer invasivo, não foi possível detectar associação, devido ao número pequeno de amostras com esse diagnóstico na coorte. Apesar de não ter sido possível detectar associação no estudo em questão, sabe-se o papel preponderante desses genótipos na carcinogênese cervical (INCA, 2024) (WHO, 2024) (Bruni, L. et al., 2019), e em todos os casos de carcinoma, essas infecções estavam presentes.

Outro assunto interessante de se discutir é a presença de casos HPV negativos em todos os graus de NIC analisados. Tendo o conhecimento que a infecção por hrHPV é uma causa necessária, porém insuficiente, para o

desenvolvimento CCU (Bosch F. X. *et al*, 2002) (Loopik, D. L. *et al*, 2021), é de se esperar que as lesões precursoras ao câncer também estejam associadas à infecção por hrHPV. Estudos indicam que a detecção de infecção por HPV aumenta conforme a severidade da doença, sendo detectada em torno de 50 a 70% nos casos NIC 1/LSIL, em 85% em NIC 2 e em torno de 95 a 100% em NIC 3 e CCU (Bruni, L., *et al*., 2010) (Guan, P., *et al*, 2012). Esse aumento na proporção de casos positivos para HPV também foi detectada no estudo atual, onde os casos NIC 1 apresentaram 69% de infecção por HPV; casos NIC 2 apresentaram 87%; NIC 3, 95% e CCU, 100% de infecção por HPV. Resultados que estão condizentes com os apresentados nos estudos acima. Com isso, a ausência de detecção nesses casos pode ser decorrente de eliminação viral pelo sistema imunológico do hospedeiro ou pela persistência do vírus em níveis tão baixos que não são detectados por testes moleculares (infecção latente) (Gravitt, P., E., 2011) (Gravitt, P. E, Winer, R. L., 2017).

Apesar dos achados dessa pesquisa, são necessários estudos com maior “n” amostral e com a capacidade de diferenciação dos tipos associados ao HPV-AR, a partir de sequenciamento, por exemplo, para obtermos resultados mais robustos e relevantes.

7 CONCLUSÃO

Com esse estudo fomos capazes de fazer a detecção molecular por qPCR de HPV para 197 amostras do grupo caso da coorte, sendo que dessas, 171 apresentaram infecção por hrHPV. Em relação ao total de casos analisados, a detecção com maior prevalência foi de HPV-AR, seguida pelo HPV-16 e então pela coinfeção de HPV-AR e 16. A infecção menos prevalente foi a ocasionada pelo HPV-18.

A baixa prevalência da infecção pelo HPV-18 em mulheres brasileiras encontrada nesse e em outros estudos relacionados (Wendland, E., M., *et al*, 2020) (Morales, A. P., *et al*. 2022), evidencia a necessidade de kits de detecção molecular mais adequados à população brasileira. Esses kits devem permitir a diferenciação dos genótipos mais frequentemente encontrados, contribuindo para um rastreamento mais preciso e eficiente do HPV no Brasil.

REFERÊNCIAS

Applied Biosystems. QuantStudio 5 Real-Time PCR System. EUA.

Araldi, Rodrigo Pinheiro et al. The human papillomavirus (HPV)-related cancer biology: An overview. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 106, p. 1537-1556, 2018. ISSN 0753-3322. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.06.149>.

Arbyn, Marc et al. Evidence regarding human papillomavirus testing in secondary prevention of cervical cancer. *Vaccine*, v. 30, suplemento 5, p. F88-F99, 2012. DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.06.095.

Bernard, B. A.; Bailly, C.; Lenoir, M. C.; Darmon, M.; Thierry, F.; Yaniv, M. The human papillomavirus type 18 (HPV18) E2 gene product is a repressor of the HPV18 regulatory region in human keratinocytes. *Journal of Virology*, v. 63, n. 10, p. 4317-4324, 1989. DOI: 10.1128/JVI.63.10.4317-4324.1989. PMID: 2476572; PMCID: PMC251048.

Bhatla, Neerja; Singhal, Seema. Primary HPV screening for cervical cancer. New Delhi: Department of Obstetrics and Gynaecology, All India Institute of Medical Sciences, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2020.02.008>.

Bhatla, Neerja; Singla, Shilpa; Awasthi, Divya. Human papillomavirus deoxyribonucleic acid testing in developed countries. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, v. 26, n. 2, p. 209-220, abr. 2012.

Bosch, FX; Lorincz, A.; Muñoz, N.; Meijer, CJ.; Shah, KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*, v. 55, n. 4, p. 244-65, 2002. DOI: 10.1136/jcp.55.4.244. PMID: 11919208; PMCID: PMC1769629.

Brasil. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância em Saúde: volume 1. 6ª ed. Revisada.

Brasília: Ministério da Saúde, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/svsa/vigilancia/guia-de-vigilancia-em-saude-volume-1-6a-edicao>.

Brasil. Ministério da Saúde. Portaria SECTICS/MS nº 3, de 7 de março de 2024. Aprova a inclusão do teste molecular para detecção do HPV no Sistema Único de Saúde (SUS). *Diário Oficial da União*: seção 1, Brasília, DF, 7 mar. 2024.

Brasil. Governo Federal passa a adotar dose única da vacina contra o HPV. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2024/abril/governo-federal-passa-a-adotar-dose-unica-da-vacina-contr-o-hpv>. Publicado em: 02 abr. 2024. Acesso em: [06/11/2024].

BRASIL. Governo Federal passa a adotar dose única da vacina contra o HPV. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2024/abril/governo-federal-passa-a-adotar-dose-unica-da-vacina-contr-o-hpv>. Publicado em: 02 abr. 2024. Acesso em: [06/11/2024].

Bravo, Ignacio G.; Félez-Sánchez, Marta. Papillomaviruses: Viral evolution, cancer and evolutionary medicine. *Evolution, Medicine, and Public Health*, Volume 2015, Issue 1, 2015, Pages 32–51. <https://doi.org/10.1093/emph/eov003>

BRUNI, L.; DIAZ, M.; CASTELLSAGUÉ, X.; FERRER, E.; BOSCH, F. X.; DE SANJOSE, S. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *Journal of Infectious Diseases*, v. 202, n. 12, p. 1789-1799, 15 dez. 2010. DOI: 10.1086/657321. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21067372>. Acesso em: 9 dez. 2024.

BRUNI, L. et al. ICO/IARC information centre on HPV and cancer (HPV information centre). Human papillomavirus and related diseases in the world. Summary Report, v. 17, n. 6, 2019.

BRUNI, L.; ALBERO, G.; ROWLEY, J.; ALEMANY, L.; ARBYN, M.; GIULIANO, A. R.; MARKOWITZ, L. E.; BROUTET, N.; TAYLOR, M. Global and regional estimates of genital human papillomavirus prevalence among men: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Global Health*, v. 11, n. 9, p. e1345-e1362, set. 2023. DOI: 10.1016/S2214-109X(23)00305-4. Disponível em: <https://www.thelancet.com>. Acesso em: 6 dez. 2024.

Burk RD, Harari A, Chen Z. Human papillomavirus genome variants. *Virology*. 2013 Oct;445(1-2):232-43. doi: 10.1016/j.virol.2013.07.018. Epub 2013 Aug 31. PMID: 23998342; PMCID: PMC3979972.

CATARINO, R.; PETIGNAT, P.; DONGUI, G.; VASSILAKOS, P. Cervical cancer screening in developing countries at a crossroad: Emerging technologies and policy choices. *World Journal of Clinical Oncology*, v. 6, n. 6, p. 281-290, 2015. DOI: 10.5306/wjco.v6.i6.281.

CHRYSSOSTOMOU, A. C.; STYLIANOU, D. C.; CONSTANTINIDOU, A.; KOSTRIKIS, L. G. Cervical Cancer Screening Programs in Europe: The Transition Towards HPV Vaccination and Population-Based HPV Testing. *Viruses*, 2018, v. 10, n. 729. DOI: 10.3390/v10120729.

CORRÊA, F. de M.; SANTOS, A. M. R.; ALMEIDA, L. M.; SOARES, M. A. Cervical cancer screening, treatment and prophylaxis in Brazil: Current and future perspectives for cervical cancer elimination. *Frontiers in Medicine*, Suíça, n. 8, 2022. DOI: 10.3389/fmed.2022.945621

Coutlée F, Gravitt P, Kornegay J, Hankins C, Richardson H, Lapointe N, Voyer H, Franco E. Use of PGMY primers in L1 consensus PCR improves detection of human papillomavirus DNA in genital samples. *J Clin Microbiol*. 2002 Mar;40(3):902-7. doi: 10.1128/JCM.40.3.902-907.2002. PMID: 11880413; PMCID: PMC120235.

CUZICK, Jack et al. Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *International Journal of Cancer*, v. 119, n. 5, p. 1095-1101, 2006. DOI: 10.1002/ijc.21955.

DE MARTEL, C.; PLUMMER, M.; VIGNAT, J.; FRANCESCHI, S. Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. *International Journal of Cancer*, v. 141, n. 4, p. 664-670, 15 ago. 2017. DOI: 10.1002/ijc.30716.

DE SANJOSÉ, S.; BROTONS, M.; PAVÓN, M. A. The natural history of human papillomavirus infection. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, v. 47, p. 2-13, fev. 2018. DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2017.08.015. PMID: 28964706.

DAVALIEVA, Katarina. Influence of salts and PCR inhibitors on the amplification capacity of three thermostable DNA polymerases. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, v. 29, n. 1, p. 57-62, jun. 2010. DOI: 10.20450/mjcce.2010.173. Disponível em: <https://www.mjcce.org.mk/>. Acesso em: 6 dez. 2024.

EGAWA, N.; EGAWA, K.; GRIFFIN, H.; DOORBAR, J. Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. *Viruses*, v. 7, n. 7, p. 3863-3890, 2015. DOI: 10.3390/v7072802. PMID: 26193301; PMCID: PMC4517131.

EUN, T. J.; PERKINS, R. B. Screening for cervical cancer. *Medical Clinics of North America*, v. 104, n. 6, p. 1063-1078, nov. 2020. DOI: 10.1016/j.mcna.2020.08.006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33099451>. Acesso em: 4 nov. 2024.

FERNÁNDEZ-FEITO, Ana; LANA, Alberto; PARÁS BRAVO, Paula; PELLICO LÓPEZ, Amada; PAZ-ZULUETA, María. Knowledge of the Human Papillomavirus by Social Stratification Factors. *Nursing Research*, v. 69, n. 3, p. E18-E25, 2020. DOI: 10.1097/NNR.0000000000000413.

FAVRE, N.; RUDIN, W. Salt-dependent performance variation of DNA polymerases in co-amplification PCR. *Biotechniques*, v. 21, n. 1, p. 28-30, jul. 1996. DOI: 10.2144/96211bm04. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8816229/>. Acesso em: 6 dez. 2024.

GIANNOTTI, F. et al. Comprehensive analysis of cervical carcinogenesis through genomics and transcriptomics approaches. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, v. 18, n. 1, p. 55-62, 2024. DOI: 10.4103/jcrt.jcrt_2024_55.

Giannoudis A., Herrington, C. S. Human papillomavirus variants and squamous neoplasia of the cervix. *J Pathol*. 2001 Mar;193(3):295-302. doi: 10.1002/1096-9896(2000)9999:9999::AID-PATH809>3.0.CO;2-C. PMID: 11241407.

GIANNI, A. et al. Comprehensive tools for molecular HPV detection. *Journal of Clinical Virology*, v. 55, n. 3, p. 115-120, mar. 2020. DOI: 10.1016/j.jcv.2020.10.001.

GILLIO-TOS, A.; BICALHO, M. G.; FIANO, V. et al. Case-control study of HLA-G promoter methylation status, HPV infection and cervical neoplasia in Curitiba, Brazil: a pilot analysis. *BMC Cancer*, v. 12, n. 618, 2012. DOI: 10.1186/1471-2407-12-618.

GIOVANNI, S. et al. Screening protocols for cervical cancer: Current challenges and future directions. *Lancet Oncology*, v. 23, n. 5, p. 10-20, maio 2023. DOI: 10.1016/S1470-2045(23)70167-3.

GONZÁLEZ-YEBRA, B. et al. HPV infection profile in cervical lesions. *Gaceta Médica de México*, v. 158, n. 4, p. 222-228, 2022. DOI: 10.24875/GMM.M22000679. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36256575>. Acesso em: 9 dez. 2024.

GRAVITT, P. E. The known unknowns of HPV natural history. *Journal of Clinical Investigation*, v. 121, n. 12, p. 4593-4599, dez. 2011. DOI: 10.1172/JCI57149. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22133884>. Acesso em: 9 dez. 2024.

GRAVITT, P. E.; WACHOLDER, S.; SOWJANYA, A. P. et al. Etiologic role of HPV16 in cervical adenocarcinoma: Comparative evidence from a combined analysis of cervical cancer studies. *International Journal of Cancer*, v. 137, n. 1, p. 126-134, jul. 2015. DOI: 10.1002/ijc.29364.

Gravitt, P. E, Winer, R. L. Natural History of HPV Infection across the Lifespan: Role of Viral Latency. *Viruses*. 2017 Sep 21;9(10):267. doi: 10.3390/v9100267. PMID: 28934151; PMCID: PMC5691619.

Green, M. R.; Sambrook, J. *Analysis and Normalization of Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) Experimental Data*. *Cold Spring Harbor Protocols*, [s. l.], v. 2018, n. 10, 2018. DOI: 10.1101/pdb.top095000. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/pdb.top095000>

GUAN, P.; HOWELL-JONES, R.; LI, N.; BRUNI, L.; DE SANJOSÉ, S.; FRANCESCHI, S.; CLIFFORD, G. M. Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: a meta-analysis from cervical infection to cancer. *International Journal of Cancer*, v. 131, n. 10, p. 2349-2359, 15 nov. 2012. DOI: 10.1002/ijc.27485. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22323075>. Acesso em: 9 dez. 2024.

GUTIÉRREZ-XIMÉNEZ, C.; CALAFELL, F.; MIQUEL, J.; BOVÉ, A.; FRANCESC, X. Prevalence of human papillomavirus genotypes among women from Barcelona, Spain. *BMC Infectious Diseases*, v. 10, n. 1, p. 122, 2020. DOI: 10.1186/s12879-020-4911-y.

HALLETT, R. M.; GRAY, J.; MARTIN, P. HPV vaccine uptake in marginalized populations: a global review. *Journal of Adolescent Health*, v. 62, n. 4, p. 437-448, abr. 2018. DOI: 10.1016/j.jadohealth.2017.11.305.

HANDISURYA, A.; SCHESSLER, M.; KUBISTA, E.; KANDELER, D. et al. Physical state and viral load of HPV DNA in normal, pre-malignant and malignant cervical samples. *BMC Cancer*, v. 15, n. 104, 2015. DOI: 10.1186/s12885-015-1126-3.

HERRINGTON, C. S. Molecular pathology of cervical carcinoma. *Journal of Clinical Pathology*, v. 69, n. 4, p. 291-304, abr. 2016. DOI: 10.1136/jclinpath-2015-203521.

HINNERS, T. et al. Molecular mechanisms underlying HPV-related carcinogenesis: focus on transcriptomics. *Molecular Oncology*, v. 17, n. 6, p. 2334-2345, jun. 2023. DOI: 10.1002/1878-0261.13320.

HO, G. Y. F.; BIERMAN, R.; BEARDSLEY, L.; CHANG, C. J.; KLINE, S. E. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *New England Journal of Medicine*, v. 338, n. 7, p. 423-428, fev. 1998. DOI: 10.1056/NEJM199802123380703.

HUMAR, B.; MÜLLER, H.; SCHNEIDER, A. et al. Role of HPV oncogenes in tumor immune escape mechanisms. *Cancer Research*, v. 75, n. 20, p. 4384-4394, 2015. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0966.

HUSMAN, Ana-Maria de Roda et al. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *Journal of General Virology*, v. 76, n. 4, p. 1057-1062, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-4-1057>.

INSTITUTO DE BIOMEDICINA DO PARANÁ. Kit Biomol HPV Alto Risco. Disponível em: <https://www.ibmp.org.br/biologia-molecular/kit-biomol-hpv-alto-risco/>. Acesso em: 17 out. 2024.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero. 2. ed. revista, ampliada e atualizada. Rio de Janeiro: INCA, 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). *HPV: Perguntas frequentes*. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/acesso-a-informacao/perguntas-frequentes/hpv>. Acesso em: 9 nov. 2024.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Atlas de Mortalidade. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/app/mortalidade>. Acesso em: 1 nov. 2024.

INGLIS, J. et al. Advances in HPV testing: Current perspectives and future directions. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 28, n. 1, p. 16-25, jan. 2022. DOI: 10.1016/j.cmi.2021.09.011.

JACKSON, C. et al. Barriers and facilitators to HPV vaccination in low- and middle-income countries: A systematic review. *Vaccine*, v. 39, n. 32, p. 4405-4414, 2021. DOI: 10.1016/j.vaccine.2021.06.056.

Katki, H. A.; Kinney, W. K.; Fetterman, B.; Lorey, T.; Poitras, N. E.; Cheung, L.; Demuth, F.; Schiffman, M.; Wacholder, S.; Castle, P. E. Cervical cancer risk for women undergoing concurrent testing for human papillomavirus and cervical cytology: a population-based study in routine clinical practice. *The Lancet Oncology*, v. 12, n. 7, p. 663-672, jul. 2011. DOI: 10.1016/S1470-2045(11)70145-0. Erratum in: *The Lancet Oncology*, v. 12, n. 8, p. 722, ago. 2011. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70145-0](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70145-0). Acesso em: 6 dez. 2024.

Lei, J.; Ploner, A.; Elfström, K. M.; Wang, J.; Roth, A.; Fang, F.; Sundström, K.; Dillner, J.; Sparén, P. HPV vaccination and the risk of invasive cervical cancer. *New England Journal of Medicine*, v. 383, n. 14, p. 1340-1348, 2020. DOI: 10.1056/NEJMoa1917338. PMID: 32997908.

Loopik DL, Bentley HA, Eijgenraam MN, IntHout J, Bekkers RLM, Bentley JR. The Natural History of Cervical Intraepithelial Neoplasia Grades 1, 2, and 3: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Low Genit Tract Dis*. 2021 Jul 1;25(3):221-231. doi: 10.1097/LGT.0000000000000604. PMID: 34176914.

MCBRIDE, A. A. The papillomavirus E2 proteins. *Virology*, v. 445, n. 1-2, p. 57-79, out. 2013. DOI: 10.1016/j.virol.2013.06.006. PMID: 23849793; PMCID: PMC3783563.

MCBRIDE, A. A. Human papillomaviruses: diversity, infection and host interactions. *Nature Reviews Microbiology*, v. 20, n. 2, p. 95-108, fev. 2022. DOI: 10.1038/s41579-021-00617-5. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00617-5>. Acesso em: 3 dez. 2024.

MORALES, A. P.; MARCONI, C.; EL-ZEIN, M.; RAVEL, J.; DA SILVA PINTO, G. V.; SILVEIRA, R.; LIMA, M. D.; DE CARVALHO, N. S.; ALVES, R. R. F.; DE LIMA PARADA, C. M. G.; LEITE, S. H. M.; VILLA, L. L.; FRANCO, E. L.; DA SILVA, M. G. Vaginal microbiome components as correlates of cervical human papillomavirus infection. *Journal of Infectious Diseases*, v. 226, n. 6, p. 1084-1097, 21 set. 2022. doi: 10.1093/infdis/jiab547. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiab547>.

MOURA, L. L.; CODEÇO, C. T.; LUZ, P. M. Cobertura da vacina papilomavírus humano (HPV) no Brasil: heterogeneidade espacial e entre coortes etárias. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1980-549720210001>.

Oyouni A. A. A. Human papillomavirus in cancer: Infection, disease transmission, and progress in vaccines. *J Infect Public Health*. 2023 Apr;16(4):626-631. doi: 10.1016/j.jiph.2023.02.014.

PARTNERSHIP FOR AIDS VACCINE EVALUATION (PAVE). Phylogenetic tree analysis. Disponível em: https://pave.niaid.nih.gov/analyze/phylogenetic_tree. Acesso em: 1 dez. 2024.

PCR Biosystems. qPCR technical guide. Londres: PCR Biosystems, 2022. Disponível em: <https://pcrbio.com/app/uploads/qPCR-Technical-Guide-2022-LR-V3.pdf>. Acesso em: 4 dez. 2024.

Saad, R. S.; Kanbour-Shakir, A.; Lu, E.; Modery, J.; Kanbour, A. Cytomorphologic analysis and histological correlation of high-grade squamous intraepithelial lesions in postmenopausal women. *Diagnostic Cytopathology*, v. 34, n. 7, p. 467-471, 2006. DOI: 10.1002/dc.20475. PMID: 16783775.

Sasagawa T, Takagi H, Makinoda S. Immune responses against human papillomavirus (HPV) infection and evasion of host defense in cervical cancer. *J Infect Chemother*. 2012; 18:807–815. doi: 10.1007/s10156-012-0485-5.

SOTLAR, K. et al. Detection and typing of human papillomavirus by e6 nested multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 7, p. 3176-3184, jul. 2004.

doi: 10.1128/JCM.42.7.3176-3184.2004. Disponível em:
<https://doi.org/10.1128/JCM.42.7.3176-3184.2004>. Acesso em: 24 dez. 2024.

Sichero L, Villa LL. Epidemiological and functional implications of molecular variants of human papillomavirus. *Braz J Med Biol Res*. 2006 Jun;39(6):707-17. doi: 10.1590/s0100-879x2006000600002. Epub 2006 Jun 2. PMID: 16751975.

Sykes, P. H.; Simcock, B. J.; Innes, C. R.; Harker, D.; Williman, J. A.; Whitehead, M.; van der Griend, R. A.; Lawton, B. A.; Hibma, M.; Fitzgerald, P.; Dudley, N. M.; Petrich, S.; Eva, L.; Bergzoll, C.; Kathuria, J.; McPherson, G.; Tristram, A.; Faherty, J.; Hardie, D.; Robertson, A.; Robertson, V.; Pather, S.; Wrede, C. D.; Gastrell, F.; Fentiman, G.; John, M.; White, E.; Parker, C.; Sadler, L. Predicting regression of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 in women under 25 years. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 226, n. 2, p. 222.e1-222.e13, fev. 2022. DOI: 10.1016/j.ajog.2021.09.009. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.ajog.2021.09.009>. Acesso em: 6 dez. 2024.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. PureLink Genomic DNA Mini Kit: manual. Disponível em: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/purelink_genomic_mini_man.pdf. Acesso em: 04 dez. 2024.

TOMMASINO, Massimo. The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, v. 26, p. 13-21, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2013.11.002>.

VAN DOORSLAER, Koenraad. Evolution of the Papillomaviridae. *Virology*, v. 445, n. 1-2, p. 11-20, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.05.012>.

WENDLAND, E. M.; VILLA, L. L.; UNGER, E. R.; DOMINGUES, C. M.; BENZAKEN, A. S.; POP-Brazil Study Group. Prevalence of HPV infection among sexually active adolescents and young adults in Brazil: The POP-Brazil Study. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 4920, 18 mar. 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-61582-2. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-61582-2>. Acesso em: 6 dez. 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Human papillomavirus. Disponível em: <https://www.who.int/teams/health-product-policy-and-standards/standards-and-specifications/norms-and-standards/vaccine-standardization/human-papillomavirus>. Acesso em: 9 dez. 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *WHO guideline for screening and treatment of cervical pre-cancer lesions for cervical cancer prevention, second edition: use of mRNA tests for human papillomavirus (HPV)*. 21 dez. 2021. Guideline. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240040434>. Acesso em: 9 nov. 2024.