



Pontifícia Universidade Católica de Goiás
Escola de Ciências Médicas, Farmacêuticas e Biomédicas
Programa de Mestrado Ciências Ambientais e Saúde

Jéssica Enocêncio Porto Ramos

**DISTRIBUIÇÃO GENOTÍPICA E PREVALÊNCIA DO PAPILOMAVÍRUS
HUMANO (HPV) EM MULHERES ATENDIDAS NA REDE PÚBLICA DE
GOIÂNIA**

Goiânia 2020

Jéssica Enocêncio Porto Ramos

**DISTRIBUIÇÃO GENOTÍPICA E PREVALÊNCIA DO PAPILOMAVÍRUS
HUMANO (HPV) EM MULHERES ATENDIDAS NA REDE PÚBLICA DE
GOIÂNIA**

Dissertação apresentada ao Programa de
Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde
da Pontifícia Universidade Católica de
Goiás, como requisito parcial para obtenção
do título de mestre.

Orientadora: Vera Aparecida Saddi

Goiânia 2020

R175d Ramos, Jessica Enocencio Porto

Distribuição genotípica e prevalência do Papilomavírus humano (HPV) em mulheres atendidas na rede pública de Goiânia / Jessica Enocencio Porto Ramos.-- 2020.

105 f.: il.

Texto em português, com resumo em inglês

Dissertação (mestrado) -- Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Escola de Ciências Médicas, Farmacêuticas e Biomédicas, Goiânia, 2020

Inclui referências: f. 80-97

1. Papillomavírus humano. 2. Genótipo. 3. Prevalência. I.Saddi, Vera Aparecida. II.Pontificia Universidade Católica de Goiás - Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Saúde - 2020. III. Título.

CDU: 578.5(043)



DISSERTAÇÃO DO MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE
DEFENDIDA EM 21 DE FEVEREIRO DE 2020 E CONSIDERADA
aprovada PELA BANCA EXAMINADORA:

1)

Profa. Dra. Vera Aparecida Saddi / PUC Goiás (Presidente)

2)

Profa. Dra. Megmar Aparecida dos Santos Carneiro / UFG (Membro Externo)

3)

Profa. Dra. Mariana Pires de Campos Telles / PUC Goiás (Membro)

4)

Profa. Dra. Flávia Melo Rodrigues / PUC Goiás (Suplente)

Dedico esse trabalho à minha mãe, ao meu pai (in memoriam), à minha irmã e ao meu marido Rodrigo, que com muito amor, carinho, e compreensão, jamais deixaram de incentivar os meus sonhos, estando sempre ao meu lado, principalmente nos momentos mais difíceis, me dando muita força e dedicação para que eu nunca desistisse e com isso tornasse momentos como esse possível.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente as instituições de ensino que permitiram e contribuíram para a realização deste trabalho. Agradeço a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) que financiou nosso projeto e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa que me manteve durante todo o mestrado.

A Deus que me deu saúde e força para que eu superasse os momentos difíceis, agradeço por me dar oportunidade de fazer um curso superior, abrindo tantas portas para que tornasse possíveis meus objetivos, agradeço o privilégio de conhecer e trabalhar com pessoas incríveis. A ele sempre serei grata por tudo.

À toda minha família, em especial aos meus pais, minha mãe Inês Enocência Porto Ramos e meu pai Leonardo Dias Ramos (in memória) que desde pequena sempre me incentivaram a estudar acima de tudo. Agradeço por todo o amor, cuidado, atenção, paciência que sempre tiveram comigo e minha irmã Joicy Enocencio Porto Ramos, pelo apoio incondicional que você me proporcionou, pela compreensão que teve nos momentos de ausência e impaciência. Agradeço a minha mãe, principalmente porque é por causa dela que estou aqui, deixou a vida dela para que eu pudesse fazer a minha. Obrigada mãe! Te amo acima de tudo.

Ao meu marido e companheiro Rodrigo Pereira Beloto, por sempre estar comigo, por ser meu alento nos momentos mais difíceis. Pela sua paciência e compreensão na minha ausência. Obrigada por ser meu namorado, meu melhor amigo, por estar sempre me dando muita força para que eu continue em frente e alcançando todos os meus sonhos.

A Prof. Dr^a. Vera Aparecida Saddi, pelo privilégio de sua orientação e amizade, pela dedicação e paciência a mim concedidas inúmeras vezes, durante o desenvolvimento do nosso trabalho e pelo apoio constante. Agradeço por ter aceitado uma aluna desconhecida, me proporcionando muitos anos de iniciação científica, me ensinando tanta coisa, tanto na vida quanto no laboratório, me tornando uma pessoa mais experiente. Obrigada por me passar um pouquinho do seu conhecimento e experiência. Obrigada por tudo!

A todas as pessoas que de alguma forma ajudaram e influenciaram para a conclusão desse trabalho. Em especial, às colegas Kelvia Cristina e Camila Lemes que foram imprescindíveis para o desenvolvimento desse trabalho. Obrigada! E um agradecimento especial a todas as pacientes que concordaram em participar da pesquisa.

RESUMO

O HPV é o agente etiológico mais prevalente das infecções do trato anogenital. Mais de 200 tipos de HPV já foram identificados e classificados em alto e baixo risco oncogênico. O HPV é detectado em 99,7% dos casos de câncer de colo uterino e os genótipos HPV 16 e 18 são detectados em 60-80% dos casos. No entanto, existem diferenças na prevalência da infecção por HPV e na distribuição dos genótipos de acordo com a região geográfica e as características da população estudada. A detecção e a genotipagem do HPV são fundamentais para avaliar o potencial oncogênico do vírus e a epidemiologia da infecção em todo o mundo, bem como a eficácia da vacina na população estudada. O objetivo do presente estudo foi estimar a prevalência da infecção por HPV e a distribuição dos genótipos em mulheres atendidas em ambulatório de ginecologia preventiva em Goiânia. Foram incluídas as participantes atendidas no ambulatório de ginecologia do Centro de Atendimento Integrado à Saúde (CAIS) da Chácara do Governador, em Goiânia-GO, que aceitaram participar da pesquisa e que foram submetidas à coleta de espécime cérvico-vaginal. Os dados foram coletados na admissão, por meio de entrevista com aplicação de questionário. A detecção e genotipagem de HPV foi realizada usando o kit INNO-LIPA HPV Genotyping Extra[®] (FujirebioEurope, Ghent, Bélgica). Foram incluídas no estudo 202 mulheres com idade entre 18 a 84 anos. A prevalência da infecção por HPV foi de 38,6% (78/202). As participantes que apresentaram alteração citológica apresentaram uma maior prevalência da infecção por HPV ($p=0,001$). Os genótipos mais prevalentes foram o HPV 52, 58, 18, 16, 70. A média das idades das pacientes foi de 43,2 anos. A prevalência de alterações citológicas foi de 6%, e as alterações mais prevalentes foram às lesões escamosas de baixo grau (LSIL) e lesões escamosas de alto grau (HSIL). A partir dos resultados obtidos, verificou-se uma alta prevalência da infecção por HPV na população analisada. Verificou-se que mulheres com alterações citológicas têm uma maior prevalência de HPV e os genótipos mais prevalentes na população estudada não são prevenidos pela vacina anti-HPV disponibilizada atualmente. Estes resultados enfatizam a necessidade de estudos mais amplos que avaliem a prevalência e a distribuição dos genótipos de HPV visando avaliar a eficácia da vacina anti-HPV, a médio e longo prazo.

ABSTRACT

HPV is the most prevalent etiological agent of infections of the anogenital tract. More than 200 types of HPV have been identified and classified as high and low oncogenic risk. HPV is detected in 99.7% of cases of cervical cancer and HPV genotypes 16 and 18 are detected in 60-80% of cases. However, there are differences in the prevalence of HPV infection and in the distribution of genotypes according to the geographic region and the characteristics of the studied population. The detection and genotyping of HPV are essential to assess the oncogenic potential of the virus and the epidemiology of infection worldwide, as well as the effectiveness of the vaccine in the population studied. The aim of the present study was to estimate the prevalence of HPV infection and the distribution of genotypes in women treated at a preventive gynecology clinic in Goiânia. Participants included in the gynecology outpatient clinic of the Integrated Health Care Center (CAIS) of Chácara do Governador, in Goiânia-GO, who agreed to participate in the research and who were submitted to the collection of cervical-vaginal specimen. Data were collected on admission, through interviews with a questionnaire. HPV detection and genotyping was performed using the INNO-LIPA HPV Genotyping Extra © kit (FujirebioEurope, Ghent, Belgium). 202 women aged 18 to 84 years were included in the study. The prevalence of HPV infection was 38.6% (78/202). Participants who presented cytological changes had a higher prevalence of HPV infection ($p = 0.001$). The most prevalent genotypes were HPV 52, 58, 18, 16, 70. The mean age of the patients was 43.2 years. The prevalence of cytological changes was 6%, and the most prevalent changes were low-grade squamous lesions (LSIL) and high-grade squamous lesions (HSIL). From the results obtained, there was a high prevalence of HPV infection in the analyzed population. It was found that women with cytological changes have a higher prevalence of HPV and the most prevalent genotypes in the studied population are not prevented by the anti-HPV vaccine currently available. These results emphasize the need for broader studies that assess the prevalence and distribution of HPV genotypes in order to evaluate the effectiveness of the anti-HPV vaccine in the medium and long term.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da partícula viral do HPV ⁵³	26
Figura 2. Representação esquemática do genoma do HPV. Adaptado de Sanjosé et al., 2018 ¹⁵	26
Figura 3. Representação esquemática da infecção por HPV e a expressão dos genes durante a progressão da infecção. Adaptado de Stanley, 2012 ⁶²	29
Figura 4. Representação esquemática do ensaio de captura híbrida II ⁹⁰	35
Figura 5. Gel de poliacrilamida da reação de GAPDH.	50
Figura 6. Distribuição dos genótipos de HPV encontrados na população analisada.....	61
Figura 7. Gráfico Forest Plot, comparação entre a infecção por HPV em mulheres com e sem alterações citológicas cervicais.	77
Figura 8. Distribuição dos genótipos do HPV em amostras cervicais no Brasil por região.	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características sócio-demográficas das participantes incluídas no estudo.	53
Tabela 2. Características comportamentais e clinicopatológicas das participantes incluídas no estudo.	55
Tabela 3. Associação entre as características sócio-demográficas com a infecção por HPV, com a infecção pelos os genótipos 16 e/ou 18 e com infecção simples ou múltiplas.	57
Tabela 4. Associações das características comportamentais e clinicopatológicas com a infecção geral por HPV, com a infecção pelos genótipos 16 e/ou 18 e com infecções simples e múltiplas.	59
Tabela 5. Frequência e classificação das alterações citológicas em amostras cervicais no período de 2003 a 2017.	74
Tabela 6. Prevalência da infecção por HPV em amostras cervicais com e sem alterações citológicas.	76

LISTA DE ABREVIACÕES

HPV – Papilomavírus humano

IST – Infecção Sexualmente Transmissível

OMS – Organização Mundial da Saúde

DNA – Ácido desoxirribonucleico

ASC – Célula escamosa atípica

LSIL – Lesão intraepiteliais escamosa de baixo grau

HSIL – Lesão intraepitelial escamosa de alto grau

ASCUS – Atipia de célula escamosa de significado indeterminado

ASCH – Atipia de célula escamosa que não pode excluir lesão de alto grau

NIC – Neoplasia Intraepitelial Cervical

nm – Nanómetro

KDA – Kilodalton

pb – Pares de bases

URF – Região reguladora *upstream*

LCR – Região Longa de Controle

ICTV – Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus

LC – Células de Langerhans

p53 – Proteína supressora de tumor p53

RB – Proteína Retinoblastoma

E2F – Fator de alongamento 2

ncRNAs – RNAs não codificadores

CCNA1 – *Cyclin 1*

CDK2 – *Cyclin Dependent Kinase 2*

DAPK – *Death-associated protein kinase*

mRNA – RNA mensageiro

miRNA – microRNA

PI3K – Fosfoinosítídeo-3-quinase

AKT – Proteína-quinase B

EGFR – Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico

VLPs - *Virus-like particles*

AS04 – *Adjuvant System 04*

MLP – 3-O-desacil-40-monofosforil Lipídeo A

LPS – Lipopolissacarídeo

TLR4 – Receptor tipo Toll 4

IgG – Imunoglobulina G

UFG – Universidade Federal de Goiás

ACCG – Associação de Combate ao Câncer em Goiás

CAIS – Centro de Atendimento Integrado à Saúde

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

GAPDH – *Glyceraldehyde 3 phosphatedehydrogenase*

Mg – Magnésio

dNTP - Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados

UNG – Uracil N-glicosilase

OR – Odds ratio

IC – Intervalo de Confiança

SUS – Sistema Único de Saúde

ASC-US – Alterações de células escamosas de significado indeterminado

ASC-H – Alterações de células escamosas que não pode excluir lesão de alto grau

LSIL – Lesão escamosa de baixo grau

HSIL – Lesão escamosa de alto grau

CA Invasivo – câncer invasivo

AGUS – Alterações de células glandulares de significado indeterminado

SUMÁRIO

I. Introdução.....	15
I. Referencial teórico.....	19
II.1 Epidemiologia da infecção por HPV no mundo, no Brasil e em Goiás.....	19
II.2 – Fatores de risco associados à infecção pelo HPV	21
II.3 - Alterações citopatológicas associadas à infecção pelo HPV	23
II.4 – Aspectos genéticos e genômicos do Papilomavírus humano	25
II.5 Regulação epigenética pelo HPV	31
II.6. Métodos de detecção do HPV em amostras biológicas.....	33
II.7 Vacinas profiláticas anti-HPV	39
IV – Objetivos	43
IV.1- Objetivo Geral	43
IV.2- Objetivos Específicos	43
V – Metodologia	44
V.1- Aspectos éticos da pesquisa.....	44
V.2 – Delineamento do estudo, local e amostragem.....	45
V.3 – Critérios de elegibilidade.....	45
V.4 – Coleta dos dados e de espécimes para exames laboratoriais.....	46
V.5 Ensaio moleculares	49
V.6 - Análises estatísticas.....	51
VI- Resultados.....	53
VI.1- Grupo de estudo – aspectos sócio-demográficos e comportamentais	53
VI.2 – Frequência de HPV nos casos estudados.....	56
VI.3 – Distribuição genotípica do HPV nos casos estudados	60
VII- Discussão	63
VIII - Conclusões e Perspectivas	68
IX. Prevalência do Papilomavírus Humano no Brasil - Revisão Sistemática e Metanálise	69
Critérios de Inclusão e Exclusão	69
Estratégia de Busca e Seleção.....	71
Extração dos Dados.....	71
Avaliação da Qualidade do Estudo.....	72
Análise Estatística	72

Resultados	72
Prevalência de alterações citológicas.....	72
Prevalência do HPV	75
Prevalência dos genótipos do HPV	78
X. Referências	80
Apêndice A	98
Apêndice B	103

I. Introdução

O Papilomavírus humano (HPV) causa a infecção sexualmente transmissível (IST) mais comum no mundo e está associado a inúmeras condições patológicas em homens e mulheres ¹⁻³. Estudos demonstram que cerca de 75-85% dos indivíduos sexualmente ativos entrarão em contato com algum genótipo do HPV durante a vida. A infecção pelo HPV pode ser transitória, assintomática e apresentar regressão espontânea em 90% dos casos ³.

O HPV é um vírus DNA (ácido desoxirribonucleico) de fita dupla classificado à família *Papillomaviridae* e já foram identificados mais de 200 genótipos virais ⁴. O HPV pode ser classificado de acordo com sua sequência genômica (classificação filogenética), de acordo com seu tropismo para pele ou mucosa, e também de acordo com seu potencial oncogênico (classificação epidemiológica) ⁴⁻⁶.

A infecção persistente com HPV de alto risco é considerada como o principal fator para a transformação maligna do epitélio do colo uterino. O HPV é detectado em 99,7% dos casos de câncer de colo uterino em todo o mundo, sendo os tipos HPV 16 e 18 mais prevalentes em 60-80% dos casos ^{1,3,6}.

A relação entre a infecção por HPV e o câncer de colo uterino já é bem estabelecida, no entanto, a infecção por HPV também está relacionada com o desenvolvimento de cânceres anais, penianos, vulvares e de orofaringe. Mundialmente, as infecções por HPV causam cerca de 4,5% de todos os casos novos de câncer, compreendendo 8,6% dos cânceres das mulheres e 0,9% dos cânceres dos homens ⁷.

Além disso, o HPV causa as chamadas verrugas genitais e a papilomatose laríngea recorrente (PLR), uma doença proliferativa do trato aéreo-digestivo superior,

adquirida principalmente por recém-nascidos durante o parto vaginal, mas também encontrada em adultos e jovens ⁸.

No Brasil, estima-se para os anos 2020-2022, 16.590 novos casos de câncer de colo uterino, com um risco estimado de 15,43 casos a cada 100 mil mulheres ⁹. Para a infecção por HPV estima-se que 10 a 12 milhões de pessoas estarão infectadas, com cerca de 700 mil novos casos por ano ¹⁰.

A prevalência e a distribuição dos genótipos de HPV variam nas diferentes regiões do Brasil e do mundo ¹⁰. Essa diferença pode ser de acordo com a faixa etária analisada, com a população estudada e com os diferentes fatores de risco investigados em cada estudo. No entanto, nota-se que os índices mais elevados da prevalência de HPV são encontrados em regiões geográficas menos desenvolvidas, em que as condições de básicas de saúde são precárias e insuficientes para um programa eficaz de prevenção e tratamento da infecção por HPV e doenças associadas ao vírus ¹¹.

No Brasil, prevalências mais baixas de infecção pelo HPV são encontradas na região Sul e Sudeste, onde a população apresenta melhor nível socioeconômico, maior acesso às informações e onde os programas de prevenção e tratamento são mais eficazes ¹². No entanto, uma revisão feita pelo nosso grupo identificou que as regiões Sul e Norte apresentaram as menores taxas da infecção por HPV. Nas regiões Norte e Nordeste, os programas de atenção básica à saúde tem se mostrado menos eficientes e os índices de infecção pelo HPV são mais altos em relação a outras regiões do país. Os programas de prevenção contra o HPV são baseados no rastreamento da infecção por meio do exame preventivo de Papanicolaou e mais recentemente na implantação de vacinas profiláticas que conferem imunidade contra genótipos específicos de HPV ¹³.

As vacinas profiláticas anti-HPV foram introduzidas gradualmente em todo mundo, desde 2006. Atualmente, três tipos de vacinas estão disponíveis

comercialmente, incluindo a bivalente, a tetravalente e a nonavalente ⁷. Todas as três vacinas contém VLP (*virus like particles*) dos HPV's 16 e 18. A vacina quadrivalente contém ainda VLPs do HPV6 e 11, e a nonavalente, apresenta também VLPs de HPV's 31, 33, 45, 52 e 58 ⁷. Ensaios clínicos randomizados e estudos clínicos licenciados já comprovam a eficácia, a efetividade e a segurança das vacinas na prevenção de infecções virais relacionadas aos genótipos contidos nas vacinas, na redução da incidência de verrugas genitais e na prevenção de lesões precursoras do câncer ¹⁴.

Atualmente, a maior prioridade nos diferentes países é implantação dos programas de vacinação contra o HPV em seus calendários nacionais e a garantia de altas taxas de cobertura vacinal ^{7,14}. Entretanto, o impacto da vacina anti-HPV também deve ser avaliado, por meio da determinação da prevalência tipo-específica do HPV e da detecção das lesões precursoras do câncer de colo uterino nas diferentes populações ¹⁴.

Desde a introdução das vacinas contra o HPV, houve um aumento no impacto e eficácia das vacinas nas diferentes populações, traduzidos pela redução da incidência dos genótipos virais de alto risco, da prevalência de verrugas genitais e de lesões anogenitais associadas ao HPV. Esses dados são consistentes em diferentes regiões mundiais e não há evidências de que as vacinas contra o HPV funcionarão de maneira diferente em diferentes regiões ¹⁴. Entretanto, o monitoramento da eficácia da vacina deverá ocorrer continuamente durante alguns anos, a fim de assegurar as melhores taxas de cobertura e possíveis variações na distribuição genotípica do vírus em populações vacinadas ¹⁴.

Monitorar o progresso da eficácia da vacina anti-HPV em diferentes níveis, de acordo com a capacidade de cada país é fundamental para monitorar circulação do vírus. A partir dessas evidências, o presente estudo teve o objetivo de avaliar a prevalência e a distribuição genotípica do HPV em mulheres atendidas em um ambulatório de

ginecologia preventiva em Goiânia-GO, como início de um projeto de monitoramento da infecção por HPV no município de Goiânia, Goiás.

I. Referencial teórico

II.1 Epidemiologia da infecção por HPV no mundo, no Brasil e em Goiás

A infecção por HPV é frequente no trato anogenital de homens e mulheres com ou sem sintomatologia. A associação do HPV com o câncer de colo uterino já é bem estabelecida e há evidências crescentes da associação do HPV com outros cânceres anogenitais ¹⁵. O HPV também é responsável por outras doenças como a papilomatose respiratória juvenil recorrente e as verrugas anogenitais, ambas causadas pelos genótipos 6 e 11 ¹⁰.

A prevalência global da infecção por HPV é estimada em 11,7% (intervalo de confiança (IC) de 95%: 11,6 – 11,7%), no entanto a prevalência de HPV pode variar nas diferentes regiões do mundo. A incidência mais alta da infecção por HPV é observada no continente Africano, que pode chegar a uma prevalência de 22,1% (IC de 95%: 20,9% - 23,4%). Existe uma forte associação entre a incidência da infecção por HPV e o nível de desenvolvimento da região. Nos países em que os programas de prevenção e tratamento são mais eficazes, as taxas de incidência parecem diminuir consistentemente em aproximadamente 2% ^{10,16}.

No Brasil, a prevalência da infecção por HPV pode variar de 2,3% a 55,4% na população geral. Há uma variabilidade considerável nas taxas de prevalência da infecção por HPV quando analisados outros sítios anatômicos como epitélio peniano e cavidade oral ⁵. Os dados sobre a prevalência da infecção por HPV nas diferentes regiões do Brasil ainda são escassos e são necessários mais estudos que avaliem a detecção e distribuição dos genótipos na diferentes regiões do país ¹⁰.

Em todos os lugares do mundo, as estimativas da infecção por HPV foram mais altas em mulheres com menos de 34 anos de idade e a incidência diminuiu no grupo de 35 a 44 anos de idade ¹⁰. A maior prevalência da infecção por HPV encontrada em todo

o mundo é em mulheres jovens. Os altos índices de infecção verificados na adolescência e juventude refletem o início precoce da atividade sexual, a multiplicidade de parceiros sexuais, tornando a infecção sexualmente transmissível mais comum no mundo ¹⁰.

A prevalência da infecção por HPV varia nos diferentes estágios das lesões precursoras ¹⁷. A prevalência da infecção por HPV é encontrada praticamente em 100% dos casos de câncer de colo uterino ¹⁷. De forma global, os genótipos mais prevalentes são os genótipos 16 e 18, que contribuem com mais de 70% de todos os casos de câncer de colo uterino e entre 41-67% das lesões de alto grau e 16-32% das lesões de baixo grau ¹⁸. Depois dos genótipos 16 e 18, os genótipos mais prevalentes são os HPV 31, 33, 35, 45, 52 e 58, que são responsáveis por cerca de 20% dos casos de câncer de colo uterino em todo o mundo ¹⁸.

Um estudo realizado em Goiás, no ano de 2013, avaliou a prevalência da infecção por HPV em mulheres jovens com idade entre 15-19 anos, demonstrando uma prevalência de 44,6% da infecção por HPV e os genótipos mais prevalentes foram os HPV16, 51, 31, 52 e 18 ¹⁹. Em 2015, na região metropolitana de Goiânia, foi realizado um estudo que avaliou a prevalência da infecção por HPV em neoplasias cervicais e foi encontrada uma prevalência de 87% da infecção por HPV ²⁰.

Um estudo multicêntrico desenvolvido pelo Ministério da Saúde e o Hospital de Moinhos de Ventos (Rio Grande do Sul) com o objetivo de determinar a prevalência da infecção por HPV e seus genótipos nas diferentes regiões do Brasil avaliou 28 Unidades Básicas de Saúde (UBS) em toda a região Centro-Oeste. Para o município de Goiânia foi encontrada uma prevalência de 54,1% da infecção por HPV ²¹. Estudos que avaliam a infecção por HPV na população geral de Goiás ainda são insuficientes para descrever com precisão a prevalência de HPV em Goiás, bem como a distribuição genotípica.

II.2 – Fatores de risco associados à infecção pelo HPV

A infecção pelo HPV é um dos principais problemas de saúde pública no mundo. Dentre os fatores de risco relacionados à infecção, a multiplicidade de parceiros sexuais representa um relevante fator de risco ¹¹. Aproximadamente 75-85% dos indivíduos sexualmente ativos são infectados pelo HPV durante a vida. O comportamento sexual é o fator de risco que mais contribui para a infecção ^{11,22}.

Os sinais e sintomas da infecção por HPV não são visíveis ¹¹. O sistema imunológico em condições normais pode combater a infecção e resolvê-la de forma eficiente ^{11,23}. Porém o sistema imunológico reage contra um genótipo específico de HPV, e uma mesma pessoa pode ser infectada com outro genótipo ou com uma variante do mesmo genótipo em diferentes eventos durante a vida. Assim, pessoas que já foram infectadas pelo HPV devem ser incentivadas a realizar prevenção primária por meio de uso de preservativos e vacinas ^{11,24}.

Uma variedade de fatores pode afetar o risco de infecção por HPV. Estudos sobre os fatores de risco para a infecção pelo HPV indicam que esses fatores associados podem ser classificados em três domínios: individuais, comportamentais e psicossociais ¹¹.

Os fatores de risco como, idade, classe social, renda, estado civil e número de partos são classificados como fatores de risco individuais ¹¹. Vários estudos relacionaram a idade com a infecção por HPV ²⁵⁻³². A maioria dos estudos que investigou a relação da idade com a infecção por HPV demonstrou uma associação significativa da infecção com as faixas etárias ≥ 25 anos ^{25-28,31}.

Investigações sobre a associação da infecção por HPV com classe social e renda relataram que há uma maior chance de infecção por HPV em indivíduos de baixa renda ^{11,25,32,33}. A cobertura vacinal é maior em pessoas com poder aquisitivo mais alto e os

comportamentos de prevenção são mais frequentes em classes sociais mais elevadas ^{25,32,33}.

Em relação ao estado civil, mulheres casadas apresentam um fator protetor contra a infecção por HPV, provavelmente em função do menor número de parceiros sexuais ^{11,25,26,30,32}. A literatura também relata que o número de gestações e partos também é um fator de risco para a infecção por HPV e que mulheres com um maior número gestações e partos apresentam maior incidência da infecção ^{25,32}.

O tabagismo, a idade do início da atividade sexual e a poligamia são fatores de risco classificados como comportamentais ¹¹. O tabagismo foi descrito como fator de risco para a infecção por HPV, no entanto alguns apresentaram resultados conflitantes ^{25,30,34,35}.

A idade precoce do início da atividade sexual é considerada um importante fator de risco para a infecção pelo HPV e para o desenvolvimento do câncer de colo uterino ¹¹. Estudos também relatam maior prevalência de verrugas anogenitais em mulheres que iniciaram a atividade sexual antes dos 16 anos de idade ¹¹. O atraso no início da atividade sexual é considerado um fator protetor contra a infecção por HPV e mulheres que tiveram a primeira relação sexual com menos de 15 anos de idade apresentaram maior risco de exposição ao HPV ^{25,29,33,34}.

Como fatores psicossociais, a vergonha, o medo do exame, o medo de sentir dor, além do medo saber que tem uma infecção por HPV são barreiras contra a prevenção e tratamento contra a infecção por HPV ^{11,36}. Entre os autores que investigam os fatores psicossociais associados à infecção por HPV são observadas várias discordâncias, por esta razão são necessários mais estudos que investiguem a relação desses fatores com a infecção por HPV ^{24,36-39}.

A infecção pelo HPV é a IST mais comum no mundo, e em homens está associado ao câncer de ânus e de pênis, além do câncer de cavidade oral ⁴⁰. Vários fatores de risco para a infecção por HPV em homens estão associados a baixas condições de higiene e de prevenção ⁴¹. Estudos indicam que os homens podem contribuir como um reservatório para a transmissão da infecção pelo HPV para as mulheres, devido sua natureza assintomática, contribuindo para a persistência da infecção e favorecendo o desenvolvimento de cânceres associados ao HPV ⁴¹.

II.3 - Alterações citopatológicas associadas à infecção pelo HPV

O rastreamento do câncer de colo uterino na maioria dos países atende aos pré-requisitos exigidos pela Organização Mundial da Saúde, conforme recomendado para o programa de rastreamento em massa ⁴². O teste de Papanicolaou foi introduzido na década de 1940, por George Papanicolaou, e é baseado na avaliação da morfologia das células cervicais esfoliadas ^{42,43}. Os programas baseados na triagem pelo método de Papanicolaou têm sido bem sucedidos na redução da incidência e mortalidade do câncer de colo uterino. Ao longo dos anos foi estabelecido que a infecção pelo HPV é necessária para o desenvolvimento câncer de colo uterino, resultando em grande número pesquisas concentradas na detecção do DNA do HPV como método alternativo de triagem para lesões precursoras deste tipo de câncer ⁴⁴.

De acordo com sistema de Bethesda “Célula escamosa atípica” (ASC) é um termo citológico proposto para descrever a citologia anormal de células escamosas, que geralmente indica inflamação mais intensa, alterações reativas intensas e/ou lesões pré-cancerosas causadas pela persistência da infecção por HPV ⁴⁵.

De acordo com o sistema de Bethesda, existem duas formas de lesões intraepiteliais, as de baixo grau (LSIL) e as de alto grau (HSIL) e ainda existem duas

subcategorias de ASC, célula escamosa atípica de significado indeterminado (ASC-US), quando os resultados se assemelham a lesão de baixo grau, mas não atendem os critérios de LSIL e células escamosas atípicas que não podem excluir lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (ASC-H) ^{45,46}.

O ASC-US é a anormalidade citológica mais frequente, variando de 1,6-9% em todos os exames realizados ⁴⁷. Os resultados com ASC-US raramente causam alguma preocupação, pois na maioria dos casos cursam com regressão espontânea da lesão e menos de um terço dessas alterações é positiva para infecção pelo HPV ^{45,48}.

A infecção persistente da mucosa do colo uterino por genótipos de HPV de alto risco é necessária para o desenvolvimento do câncer de colo uterino, no entanto, somente a infecção por HPV parece não ser suficiente para a progressão deste câncer, sendo necessária a presença de cofatores adicionais ⁴⁹. A maioria das infecções por HPV desaparece espontaneamente, mas em uma pequena porção de mulheres a infecção pode persistir e são essas mulheres que apresentam maior risco de desenvolver alterações citológicas ou neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC). Durante um período de 30 anos, as NIC II e III que não tratadas adequadamente podem progredir para doença invasiva em aproximadamente 25-30% dos casos ^{42,49}.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) as mulheres com idades entre 25 e 65 anos são convidadas a fazer o teste de Papanicolaou a cada três anos e em casos de esfregaços negativos, o teste pode ser repetido a cada cinco anos ^{49,50}. Além da questão da baixa sensibilidade, existem outras preocupações sobre o teste de Papanicolaou. O estabelecimento de um programa de rastreamento baseado no intervalo ideal envolve infraestrutura, uma equipe treinada e equipamentos, o que pode ser uma barreira na implementação desses testes em países de baixa e média renda.

Mesmo em países desenvolvidos, uma grande porção das mulheres alvo ainda não é alcançada, formando um grupo de alto risco para o desenvolvimento do câncer de colo uterino ^{42,51}.

Além disso, a triagem de mulheres menores de 25 anos de idade pode estar associada ao aumento de ansiedade, excesso de tratamentos desnecessários e custos infundados. Com o levantamento dessas questões surgiram preocupações sobre a qualidade do teste de Papanicolaou como um método ideal na prevenção do câncer de colo uterino ⁴².

Com o avanço das pesquisas, foi proposto que os testes baseados na detecção do DNA do HPV fossem usados na prevenção do câncer de colo uterino e realizados em mulheres com mais de 30 anos, como teste de triagem, em função do seu custo-benefício ^{42,52}. Isso se justifica pelo fato de que a maioria das infecções por HPV e lesões citológicas em mulheres jovens regride espontaneamente ^{42,53}.

Portanto, a triagem do câncer de colo uterino é feita pelo exame citológico de Papanicolaou e pela detecção do DNA do HPV sendo esta última mais específica e mais sensível do que a triagem realizada pela detecção de alterações citológicas ⁴².

II.4 – Aspectos genéticos e genômicos do Papilomavírus humano

Os papilomavirus são pequenos vírus não envelopados, com diâmetro em torno de 55 nanômetros (nm), quando observados por microscopia eletrônica ⁵⁴. O capsídeo proteico dos papilomavírus mede aproximadamente 2nm de espessura é composto por 72 capsômeros são dispostos em simetria icosaédrica (figura 1). Os capsômeros são pentâmeros da proteína estrutural L1 (54 kDa) ^{54,55}.

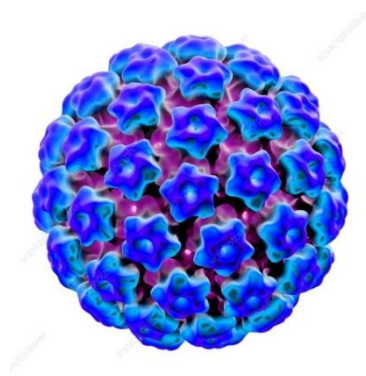


Figura 1. Representação esquemática da partícula viral do HPV ⁵³.

O genoma do HPV apresenta cerca de 8.000 pares de bases (pb), é um vírus que apresenta DNA de fita dupla estruturado em uma região longa de controle (LCR), que contém a origem de replicação (ORI) , a maioria dos promotores de transcrição além das sequencias codificantes ¹⁵. As regiões codificantes são divididas em sequências precoces e tardias. A região precoce (E – *early*) codifica proteínas envolvidas na replicação do DNA viral e transformação celular, das quais se destacam E6 e E7. A região tardia (L – *Later*) codifica as proteínas do capsídeo (L1 e L2) (figura 2) ¹⁵.

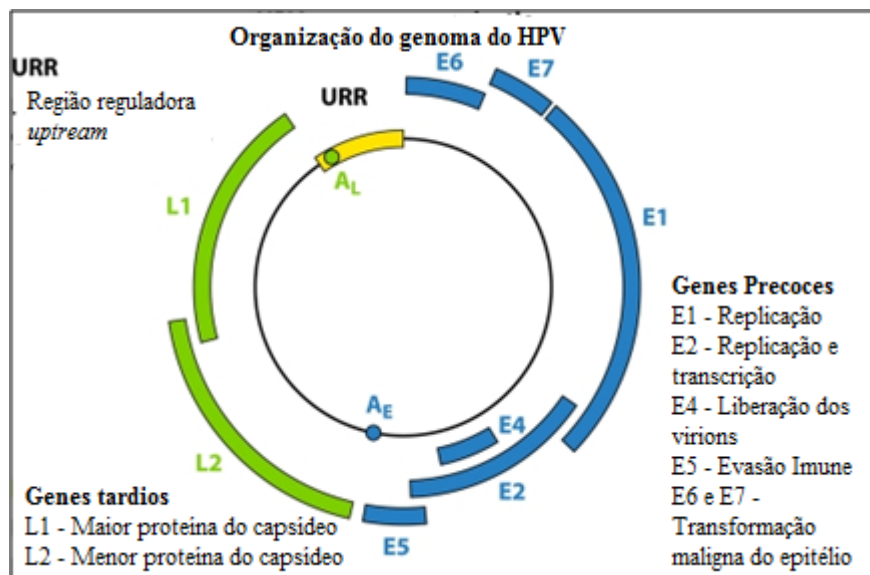


Figura 2. Representação esquemática do genoma do HPV. Adaptado de Sanjosé et al., 2018 ¹⁵.

Os papilomavírus pertencem à família *Papillomaviridae* e causam uma ampla gama de doenças, lesões benignas e tumores invasivos. Existem cinco principais gêneros conhecidos de HPV: *Alfa*, *Beta*, *Gamma*, *Mu* e *Nu* ^{56,57}. A classificação dos HPVs é baseada na sequência de nucleotídeos que codifica a proteína de capsídeo (L1).

De acordo com Comitê de Nomenclatura do Papilomavírus, um novo genótipo de HPV é definido por uma variação da sequência de nucleotídeos superior a 10% em comparação com um genótipo já conhecido. Os genótipos de HPV pertencentes a gêneros diferentes têm cerca de 60% de similaridade baseado na região L1. Diferentes espécies virais dentro de um mesmo gênero compartilham de 60 a 70% de similaridade. Um novo tipo de HPV apresenta cerca de 90% semelhança com qualquer outro tipo de HPV ^{56,57}. A variação de 2 a 10% na região L1 classifica os subtipos, enquanto as variantes intratipos variam em 2% na sequência da região L1 ^{56,58}.

A nomenclatura dos papilomavírus é determinada pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) ^{56,57,59}. Quando um novo genótipo de HPV é encontrado, o genoma do novo tipo de HPV é depositado no Centro Internacional de Referência do HPV e recebe um número específico, que passa a ser a identificação desse genótipo ^{56,57}. O sistema atual de designação do número do HPV é baseado apenas nas sequências de L1, fato que foi consolidado no *Papillomavirus Workshop* realizado em *Quebec* (Canadá) em 1995 ^{60,61}.

Carcinogênese induzida pelo Papilomavírus humano

Os papilomavírus são espécies que apresentam tropismo pelas células da pele e mucosa. O tipo de lesão que o vírus induz está associado ao genótipo viral ¹⁵. Por exemplo, os HPVs 1, 2 e 4 causam geralmente verrugas comuns nas mãos e nos pés. Os HPVs 6 e 11 causam verrugas genitais e os HPVs 16 e 18 são encontrados nas NIC, em carcinomas anogenitais e de orofaringe ⁶².

Os eventos que ocorrem na transformação celular maligna induzida pelo HPV estão relacionados ao descontrole do ciclo celular ⁵⁴. O ciclo infeccioso do vírus é bastante complexo e pode explicar a duração de uma infecção pelo HPV. O vírus infecta primeiro queratinócitos na camada basal do epitélio, como a consequência de um microtrauma, resultando na abrasão do epitélio que expõe a membrana basal e as células basais (figuras 3 e 4) ⁶³. Nos compartimentos proliferativos do epitélio, há uma fase de manutenção, o vírus e a célula se replicam juntos e o número de cópias virais é mantido em cerca de 50 a 100 cópias por célula filha. Para os genótipos oncogênicos, em particular, a expressão gênica viral é fortemente controlada durante esta fase. Enquanto a célula estiver se dividindo, os HPVs de alto risco controlam a expressão de suas proteínas virais. Nesta fase, os oncogenes E6 e E7 são expressos em níveis muito baixos ⁶³. Quando a divisão da célula hospedeira é interrompida e a célula começa a se diferenciar em um queratinócito maduro, este evento fornece um sinal ao vírus para ativar todos os seus genes e aumentar o número de cópias do genoma viral para milhares ⁶³.

No caso de transformação maligna, o controle da expressão de E6 e E7 é perdido e a expressão gênica na célula se torna desregulada ⁶⁴. Nas camadas superiores do epitélio, todos os genes virais, incluindo os que codificam as proteínas L1 e L2, são expressos e milhares de genomas virais são montados nos capsídeos, no interior das células como partículas infecciosas de vírus ⁶⁴. O tempo decorrido entre a infecção e a geração das partículas infecciosas de vírus é de pelo menos três semanas. No epitélios, as zonas de transição epitelial, como as junções endo / ectocérvice e anorectal, são as regiões mais suscetíveis à carcinogênese por genótipos de HPV de alto risco (figura 3)

^{63,64}.

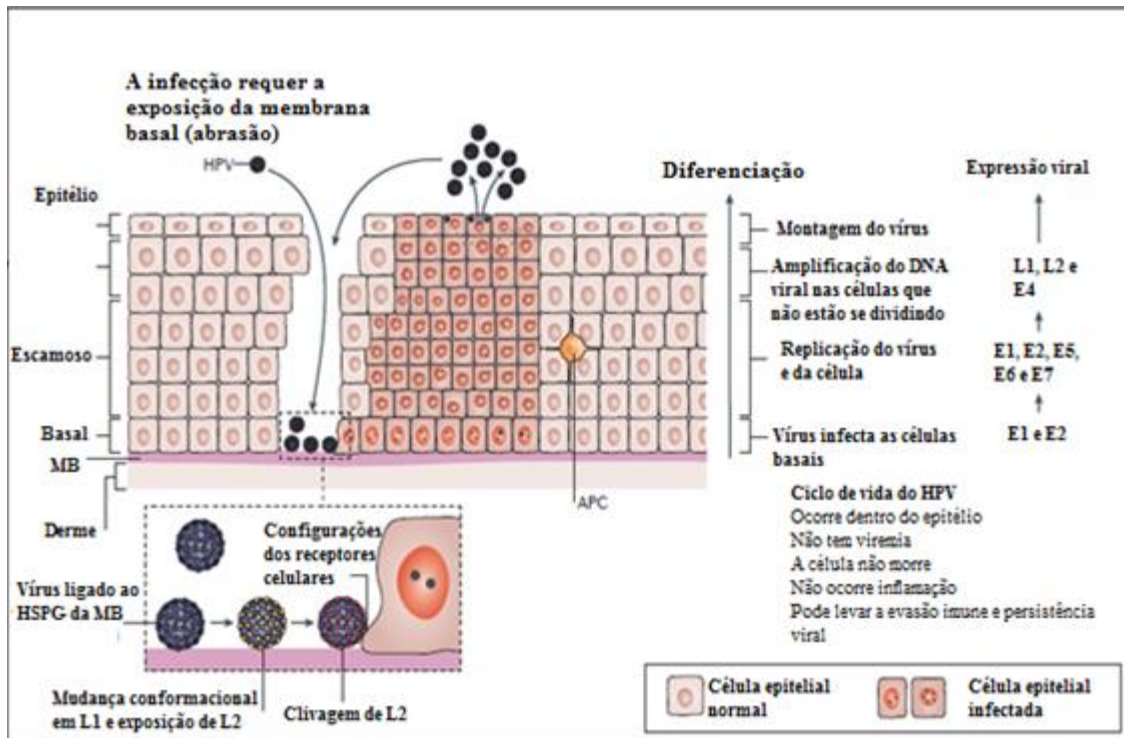


Figura 3. Representação esquemática da infecção por HPV e a expressão dos genes durante a progressão da infecção. Adaptado de Stanley, 2012 ⁶².

O potencial oncogênico dos genótipos de alto risco está associado à sequência e atividade das oncoproteínas E6 e E7 ⁶⁵. Os tipos de HPV de alto risco evoluíram com vários mecanismos para evitar a resposta imune do hospedeiro, o que torna importante a persistência viral e a progressão para doenças neoplásicas associadas ao vírus ⁴. O HPV apresenta ciclo viral exclusivamente intraepitelial, impedindo, portanto, efeitos pró-inflamatórios. Como resultado, o recrutamento de células apresentadoras de antígenos, como as células de Langerhans (LC) e a liberação de citocinas que medeiam a resposta imune estão ausentes ou escassas após a infecção natural pelo HPV ⁶⁵. O processo carcinogênico, iniciado com a ativação de E6 e E7 precisa ser complementado pelo acúmulo de alterações adicionais ao genoma do hospedeiro para levar ao fenótipo tumoral invasivo ⁶⁵.

As oncoproteínas E6 e E7 tem diversos alvos celulares que favorecem a carcinogênese ⁶⁵. No entanto, os alvos mais estudados são p53 e pRb (proteína Retinoblastoma), que interagem respectivamente com as oncoproteínas E6 e E7. A proteína E6 promove a proliferação celular estimulando a degradação de p53, através da formação de um complexo trimérico compreendendo E6, p53 e a enzima de ubiquitinação celular E6-AP ⁶⁶. A degradação estimulada por E6 interfere com as funções biológicas de p53, levando ao descontrole do ciclo celular e consequentemente um aumento do crescimento das células tumorais. A proteína E7 se liga a pRb que apresenta os chamados “domínios de bolso” ^{65,66}. As sequências de “domínio de bolso” de pRb são essenciais para sua função supressora de tumor. A proteína E7 interrompe a interação de pRb com a família E2F, resultando na liberação dos fatores E2F em suas formas ativas. Essa conversão de E2F mediada por E7, estimula a transcrição de vários genes envolvidos na replicação e na divisão celular ^{65,66}.

A infecção de uma célula com HPV pode causar diversas alterações celulares e com os avanços nas pesquisas foi possível identificar outros alvos celulares de E6 e E7, diferentes de p53 e pRb ⁶⁵. Os mecanismos que envolvem a associação de E6 e E7 com outros alvos celulares ainda precisam ser melhores elucidados. No entanto, as consequências dessas interações podem levar à progressão do ciclo celular, evasão à apoptose, dano no DNA e supressão da resposta imune ⁶⁵.

II.5 Regulação epigenética pelo HPV

Estudos recentes indicam que a regulação epigenética pode ser uma via fundamental na patogênese de inúmeras doenças, incluindo os cânceres. As alterações epigenéticas não estão associadas a alterações na sequência do gene, mas aos mecanismos que controlam a expressão gênica, como metilação do DNA, modificações de histonas e da cromatina, remodelação de proteínas associadas ao DNA e silenciamento RNA mensageiro (mRNA) por RNAs não codificadores (ncRNAs) ^{67,68}.

Os cânceres associados ao HPV apresentam sistemas exclusivos que levam à carcinogênese ⁶⁹. As oncoproteínas E6 e E7 podem interagir com várias proteínas do hospedeiro e afetar os fatores de transcrição, alterando a expressão gênica celular ⁷⁰. A oncoproteína E7 pode alterar a capacidade transcripcional das células infectadas, afetando mecanismos do controle epigenético. Estudos demonstram que alterações na metilação do DNA, modificações das histonas e regulação de microRNA (miRNA) são frequentemente encontrados em tumores associados à infecção pelo HPV ⁷¹⁻⁷³.

A metilação do DNA é realizada por uma família de metiltransferases de DNA que catalisam a adição de um grupo metil na posição 5' de citosinas localizadas nas "ilhas de CpG" ⁷⁴. A metilação específica de algumas ilhas de CpG pode representar um mecanismo pelo qual o HPV influencia a transformação maligna das células ^{72,74}. Já foram observados padrões específicos de metilação em diferentes tumores associados à infecção por HPV ⁷¹. Os genes mais afetados por metilação são os genes supressores tumorais e os oncogenes. Estudos relatam que E6 e E7 podem silenciar p53 e pRb por meio de mecanismos de metilação ⁷². Outros genes também foram encontrados metilados em infecções por HPV como P16INK4, *Cyclin 1* (CCNA1) e *Cylin Dependent Kinase 2* (CDK2) que estão relacionados com o ciclo celular e a *Death-associated protein kinase* (DAPK) que está associado com a apoptose ⁷².

As proteínas E6 e E7 dos HPVs de alto risco já foram associadas à regulação da expressão de muitos miRNAs, que podem influenciar nas funções de p53 e pRb ⁷⁵⁻⁷⁷. Os miRNA são pequenos RNA não codificadores que funcionam no silenciamento de RNAs mensageiros (mRNA) específicos e na regulação pós-transcricional da expressão gênica ⁷⁸.

O perfil de assinaturas de miRNA em todo o genoma indica que alterações nos níveis de expressão (aumento ou diminuição) de miRNAs é comum na maioria dos tumores ^{79,80}. Além de regular progressão do ciclo celular, proliferação, diferenciação, apoptose e senescência, os miRNAs foram associados à etiologia, progressão, metástase e prognóstico do câncer ⁷⁵.

Foi observado que a infecção pelo HPV de alto risco leva à redução da expressão do miR-34a ⁷⁵. O miR-34a é um alvo transcricional direto de p53 e sua expressão pode ser transativada pela ligação de p53 na região promotora miR-34a ⁸¹⁻⁸³. Estudos observaram que a degradação de p53 mediada por E6 e a inativação de pRB mediada por E7 leva à redução da expressão de miR-34a em infecções por genótipos de HPV de alto risco ⁸¹⁻⁸³.

A expressão das oncoproteínas E5, E6 e E7 do HPV pode alterar vias de sinalização que levam ao desenvolvimento de câncer. E6 pode inativar p53 enquanto estimula a via da fosfoinositídeo-3-quinase (PI3K), proteína-quinase B (AKT), Wnt e Notch ⁸⁴. Tanto E6 como o E7 podem desregular a expressão de miRNAs celulares que alteram as vias de sinalização celular. E5 pode sensibilizar o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e aumentar a ativação das vias PI3K-AKT. Essas vias de sinalização alteradas podem ser críticas para o início e manutenção dos cânceres associados à infecção por HPV. ^{84,85}.

II.6. Métodos de detecção do HPV em amostras biológicas

A relação entre a infecção por HPV e o desenvolvimento de câncer cervical já é bem estabelecida e com o passar dos anos as pesquisas relacionadas com HPV vem aumentando, com o objetivo principal de estabelecer estratégias primárias e secundárias para prevenção do câncer cervical ⁸⁶.

Os testes baseados na citopatologia reduziram as taxas de incidência e mortalidade do câncer cervical, no entanto, os testes de citopatológicos possuem baixa especificidade, bem como uma variabilidade significativa no diagnóstico de lesões pré-cancerosas. A alta relação do HPV com o desenvolvimento de diversos tipos de câncer, estimularam o desenvolvimento de técnicas moleculares baseadas na identificação do DNA/RNA do HPV ⁸⁷.

A presença da infecção viral permite o diagnóstico precoce e tratamento de lesões pré-cancerosas. A *American Society for Colposcopy and Cervical Pathology* propõe que as mulheres com teste citopatológico negativo, mas com resultado do teste de detecção de HPV positivo deve ser submetida a genotipagem do HPV. Considera-se que a identificação de HPV 16 e 18 em amostras clínicas fornecem informações para a realização da colposcopia, pois mulheres positivas para HR-HPV apresentam maior risco de desenvolver displasias mais graves ⁸⁷.

Atualmente existem pelo menos 193 testes moleculares distintos que são comercialmente disponíveis no mercado global para detecção de HPV em espécimes cervicais. Dos 193 testes disponíveis, 110 (57%) tem pelo menos uma publicação em literatura revisada por pares, mas apenas 69 (35,7%) são apoiados por dados analíticos/clínicos publicados. Existem vários métodos moleculares disponíveis aprovados pela FDA, validados clinicamente usando os critérios de Meijer, no entanto, existem diferenças importantes entres esses métodos ⁸⁸.

Como testes baseados na detecção do DNA do HPV utilizando o sinal de amplificação, uma das metodologias mais utilizadas é o ensaio de Captura Híbrida 2 (HC2), que foi desenvolvido pela *Digene Corporation (Gaithersburg, MD)* que é agora comercializado pela *Qiagen (Germantown, MD)*. O teste de HC2 foi aprovado pela FDA em 1999 e substituiu o ensaio de Captura Híbrida original, aprovado em 1995. O teste de HC2 foi inicialmente aprovado com resultados de citologia para ASC-US e posteriormente foi expandindo para incluir conjuntamente com a citologia de rotina em mulheres acima de 30 anos ^{88,89}.

O ensaio envolve uma série de procedimentos, em que o espécime é tratado para desnaturar o DNA alvo, é adicionado sondas de RNA multigênicas específicas para os respectivos genótipos de HPV. As sondas combinam com os seus respectivos genótipos se presente na amostra e os híbridos DNA-RNA resultantes são capturados por um anticorpo monoclonal para híbridos DNA-RNA. Um segundo anticorpo monoclonal conjugado com fosfatase alcalina é adicionado, o que se liga aos híbridos capturados. A fosfatase alcalina desfosforila um substrato quimioluminescente que produz luz (figura 4). A luz é medida em unidades relativas de luz (RLU), em um luminômetro. Uma medida RLU igual ou maior que o valor de corte indica a presença de DNA de HPV ^{88,89}.

ENSAIO DE CAPTURA HÍBRIDA 2

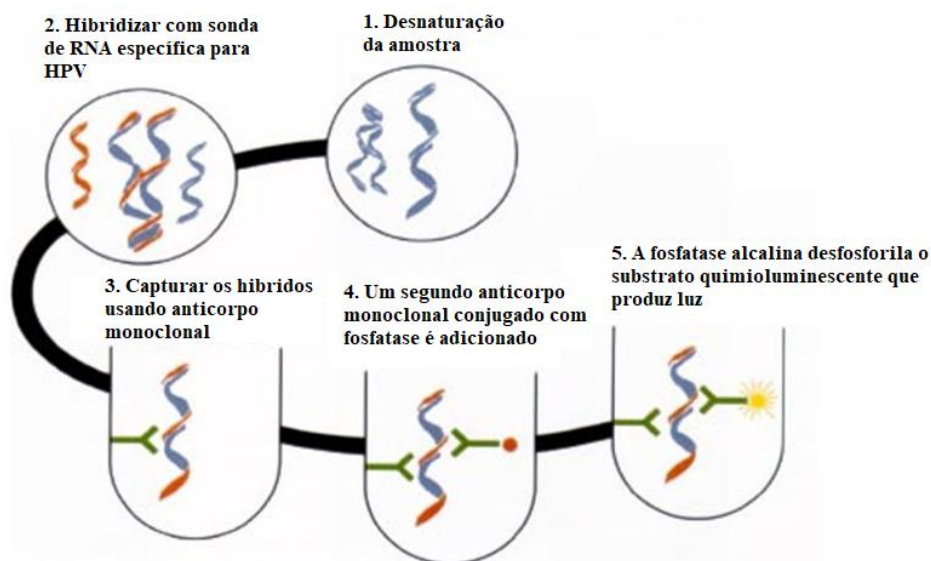


Figura 4. Representação esquemática do ensaio de captura híbrida II ⁹⁰.

O teste *Cervista HPV HR* ((*Third Wave Technologies, Madison, WI*[now *Hologic/Gen-Probe, San Diego, CA*]) foi aprovado pela FDA 2009. Este teste utiliza um sinal químico para amplificação de sinal para detectar o DNA de HPV. Esse teste pode detectar 14 genótipos de HPV de alto risco (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68), no entanto não identifica o HPV individualmente ^{88,91}.

Outro teste baseado na detecção do DNA do HPV é o teste de *cobas 4800* (*Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, CA*), foi aprovado pela FDA em 2011, mas está disponível no mercado europeu desde 2009. O teste *cobas 4800* utiliza PCR multiplex em tempo real e hibridização de ácidos nucleicos com quatro sondas fluorescente diferentes, que detectam simultaneamente o gene L1 do HPV 16 e 18 individualmente e identifica 14 genótipos de HPV de alto risco como resultado agrupado ^{88,92}. Um gene de *Beta-globina* é incluído como controle de extração e amplificação. Controles positivos e negativos também são incluídos para validar cada reação. O teste é automatizado usando um sistema *cobas 4800* com é necessário o

envolvimento manual apenas para carregar e descarregar a placa de micropoços. O sistema consiste em dois instrumentos separados, com o *cobas z 480* para extração automatizada de ácido nucleico e o *cobas x 480* para amplificação por PCR e reações de detecção em um único microtubo ⁸⁸.

O sistema é projetado para processar até 280 amostras em um dia e pode ser conectado as informações do sistema do laboratório. A sensibilidade analítica do teste *cobas 4800* é de 150 cópias de DNA/ml para HPV 45, 300 cópias de DNA/ml para os HPV31, 33, 39, 51 e 59, 600 cópias de DNA/ml para os HPV 16, 18, 35, e 58, 1.200 cópias de DNA/ml para HPV 56, 66 e 65 e 2.400 cópias de DNA/ml para HPV52. Estudos de validação comparando o *cobas 4800* com o teste de HC2 observaram que o teste *cobas 4800* tem mais sensibilidade clínica, uma maior sensibilidade e um nível menor de reação cruzada comparado com o ensaio de HC2 ^{88,92}.

Outro método utilizado para detecção do DNA do HPV é a metodologia de transcriptase reversa que detecta mRNA de E6 e E7. A detecção da superexpressão de mRNA de E6/E7 pode estar diretamente associado com a progressão da doença. O único teste que foi aprovado pela FDA que detecta mRNA de E6/E7 é o *APTIMA HPV16 18/45 genotype assay (Hologic Gen-Probe, Inc., San Diego, CA)* ^{88,93}. O *Aptima HPV* permite a detecção de transcritos de mRNA de E6 / E7 de 14 genótipos de HPV de alto risco (HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68), mas não discrimina entre os genótipos de HPV. Uma transcrição de RNA de uma amostra não infecciosa serve como um controle de processo extrínseco. O ensaio *Aptima* é realizado em um único tubo e utiliza oligonucleotídeos complementares para isolar o mRNA de HPV em micropartículas magnéticas. O mRNA alvo é amplificado utilizando amplificação mediada por transcrição (TMA) e os produtos de amplificação são detectados por ensaio de proteção de hibridização (HPA) usando marcadores

quimioluminescentes. O teste é totalmente automatizado no sistema *Panther* ou sistema *Tigris DST*^{88,94}.

A capacidade do instrumento *Panther* é de até 275 testes em oito horas e até 750 testes em 16 horas. O instrumento *Tigris* pode processar aproximadamente 450 amostras em oito horas até 1.000 amostras em cerca de 13,5 horas. Uma vantagem do teste *Aptima HPV* é que este não apresenta reatividade cruzada com quaisquer genótipos de HPV de baixo risco testados (HPV6, 11, 42, 43, 44, 53, 61, 71 e 81) ou com flora normal ou organismos oportunistas que podem ser encontrados em amostras cervicais⁹⁴. O teste *Aptima* mostra alta sensibilidade analítica, com um limite de detecção de 24 a 488 cópias por reação. E também foi observado que o teste *Aptima HPV* mostrou uma especificidade maior para detecção de lesão de alto grau do que o teste de HC^{88,94-96}.

A maioria desses testes são projetados para detectar os ácidos nucleicos de 12 genótipos de HPV classificados pelo IARC como grupo 1 (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59). Testes de genotipagem que distinguem genótipos individuais como os HPV 16 e 18 também estão disponíveis para triagem de mulheres com resultado de detecção de HPV positivo⁸⁸.

Em março de 2011, o teste *cobas HPV* (*Roche Molecular Systems, Inc., Pleasanton, CA*) foi aprovado pela FDA com uma indicação adicional como teste de triagem para câncer cervical para mulheres acima de 25 anos⁸⁶. Os testes aprovados pela FDA utilizam os mesmos dispositivos de coleta que são usados para coletar o teste citopatológico, para que uma única amostra possa ser processada para citologia e para o teste de HPV. Os testes de HPV, conforme aprovados pela FDA, são realizados em um volume de amostra aleatória, este fato é importante pois as amostras podem conter uma ou todas as três frações possíveis que o HPV pode ser detectado, nomeadamente, (i) *free virions*, (ii) descamação das células contendo novas partículas virais induzidas pela

produção de HPV (*Desquamating cells with new virions from the productive HPV-induced pathway, and*), (iii) divisão das células contendo o DNA do HPV, através da transformação induzida pela HPV (*dividing cells containing HPV DNA from the transforming HPV-induced pathway*) ^{91,97}.

Atualmente os dispositivos de coleta aprovados pela FDA, são os dispositivos do tipo *Broom* ou *Cytobrush/Spatula* para *Thin-Prep PreservCyt Solution* para coleta do teste citopatológico e para coleta dos testes de HPV simultaneamente. O fluido preservativo *SurePath* (*Becton, Dickinson e Company, Franklin Lakes, NJ*), é aprovado para citologia líquida e para testes de amplificação do DNA de *Chlamydia* e *Neisseria gonorrhoeae*, mas não para testes de HPV nos Estados Unidos ^{88,98,99}.

O FDA em conjunto com o fabricante (*ProbeTec CT / GC Qx* (*Becton, Dickinson e Company, Franklin Lakes, NJ*), emitiu uma carta de advertência em junho de 2012 indicando que o teste para detecção do DNA do HPV por meio de HC2 usando *SurePath* pode produzir um número alto de resultados falsos-negativos ^{88,98}. A preocupação é que resultados de HPV falso-negativos podem ocorrer devido a interligação entre proteínas e ácidos nucleicos gerados ao longo do tempo quando preservados no fluido *SurePath*. Mesmos os testes com alta sensibilidade analítica que detectam cerca de 10 a 400 cópias de DNA de HPV por reação, ainda é possível não ser sensível o suficiente para detectar todas as possíveis lesões existentes ^{88,98,99}.

Novos testes, novos marcadores e novas evidências melhorarão a capacidade de diferenciar a infecção insignificante por HPV de lesões pré-cancerosas. O objetivo fundamental é ter um sistema simples, robusto e um sistema de baixo custo que oferecerá melhor atendimento aos pacientes ⁸⁸.

II.7 Vacinas profiláticas anti-HPV

Desde 2006, a OMS recomenda a inclusão da vacina contra a infecção por HPV nos programas de imunização nacionais dos países em que o câncer de colo uterino é um problema de saúde pública ⁷. Como as vacinas contra o HPV não conferem imunidade contra todos os genótipos virais, a OMS sugere que a introdução da vacina faça parte de uma ação coordenada que abrange o controle do câncer de colo uterino, incluindo a prevenção, principalmente de meninas e meninos de 9 a 14 anos, antes da exposição e aquisição de algum genótipo de HPV, prevenção secundária através da triagem pelo método de Papamicolaou, tratamento de mulheres com lesões pré-cancerosas e cuidados terciários e paliativos para mulheres com câncer de colo uterino ⁷.

As vacinas contra o HPV atualmente licenciadas podem diminuir a incidência e mortalidade por câncer de colo uterino, prevenindo a infecção por vários genótipos de HPV ^{7,100}. As vacinas são mais eficazes quando administradas antes da exposição ao HPV. As vacinas não são terapêuticas e não são recomendadas para tratamento de lesões ou de câncer de colo uterino ou infecção por HPV ^{100,101}. Atualmente, três vacinas contra o HPV são comercializadas ^{7,100,102}:

1. A vacina bivalente (Cervarix®, produzida pela GlaxoSmithKline) - que protege contra dois tipos de HPV 16 e 18 que causam a maioria dos cânceres cervicais.
2. A vacina quadrivalente (GARDASIL® / Silgard®, produzida pela Merck & Co5) - que protege contra genótipos 16 e 18, bem como 6 e 11, responsáveis por verrugas anogenitais.
3. A vacina nonavalente (GARDASIL®9) – que protege contra os genótipos 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58 ¹⁰².

As vacinas licenciadas são preparadas a partir da proteína L1 purificada, a principal proteína do capsídeo viral, que se auto-organiza para formar partículas

semelhantes ao vírus (VLPs) específicas de cada genótipo, que são combinadas com um *Adjuvant System 04 (AS04)* ¹⁰³. O AS04 é composto por 3-O-desacil-40-monofosforil lipídeo A (MPL) adsorvido no sal de alumínio ¹⁰³⁻¹⁰⁵. Por sua vez, o MPL é um derivado desintoxicado do lipopolissacarídeo (LPS) isolado da bactéria *Salmonella minnesota* cepa R595 ¹⁰⁴ reconhecido por um receptor tipo *Toll 4* (TLR4). Essas VLPs se assemelham à superfície dos vírions do HPV, no entanto, não contém DNA viral e portanto não são infecciosas ¹⁰³.

Os estudos que investigam os mecanismos imunológicos que desencadeiam a ação da vacina contra o HPV, sugerem que esses mecanismos são mediados pelas células B, células T, monócitos e células dendríticas ¹⁰³. Até o momento, acredita-se que a vacina contra o HPV funcione da seguinte forma: (i) desencadeando uma resposta imune desempenhada por anticorpos IgG virais específicos para cada antígeno e anticorpos neutralizantes de vírus ¹⁰⁶⁻¹⁰⁸; (ii) induzindo uma resposta imune caracterizada por proliferação e ativação das células T CD4+ específicas para o antígeno; e (iii) ativando células dendríticas para aumentar a imunidade adaptativa contra o vírus ^{107,109}.

A implementação das vacinas ainda está longe de ser universal ou equitativa ¹⁴. A implementação da vacina para meninas e mulheres vulneráveis enfrenta várias barreiras que incluem altos custos, infraestrutura inadequada de entrega e falta de envolvimento da comunidade para gerar conscientização sobre o câncer de colo uterino e sobre ferramentas de rastreamento precoce ¹⁴. Para que as vacinas contra o HPV funcionem como uma solução de saúde pública, é preciso melhorar a acessibilidade às vacinas e associá-las à uma capacidade reforçada de educação e rastreamento em saúde com base na comunidade ¹⁴.

III - Justificativa

O teste de detecção do DNA do HPV surgiu como uma alternativa para complementar a citologia convencional e prevenir o desenvolvimento do câncer de colo uterino ¹¹⁰. Nos países com programas nacionais de vacinação, os testes de HPV também podem ser uma importante ferramenta como estratégia para avaliar eficácia da vacina à longo prazo ^{110,111}.

As vacinas anti-HPV disponibilizadas atualmente abrangem somente alguns genótipos específicos de HPV e conhecer a prevalência da infecção por HPV e os genótipos prevalentes em determinada população é importante para avaliar a eficácia da vacina na população estudada ¹⁴. No entanto para avaliar o impacto da vacina contra o HPV no câncer de colo uterino na população em geral, ainda são necessários vários anos de pesquisa, devido ao pouco tempo de implementação da vacina nos programas nacionais de vacinação, uma vez que a infecção persistente por HPV de alto risco requer vários anos para levar à transformação carcinogênica, ^{14,112}.

O monitoramento dos resultados relacionados ao HPV não é um pré-requisito para introdução das vacinas anti-HPV, mas em algumas situações em que há uma confirmação do impacto da vacina na população estudada pode ajudar a manter a sustentabilidade dos programas de vacinação e melhorar a cobertura vacinal, além disso pode auxiliar na escolha do tipo de vacina é mais eficaz para cada região ^{14,113,114}.

Poucos estudos avaliaram a prevalência da infecção pelo HPV em mulheres da região metropolitana de Goiânia. Diante disso, é de extrema importância realizar a detecção e genotipagem do HPV para obter dados epidemiológicos da infecção nessa região, ampliando o conhecimento sobre a relação de tipos específicos quanto a gravidade das lesões cervicais detectadas, além de traçar estratégias adequadas para melhor cobertura e rastreio e oferecer dados que possam ser usados futuramente para

avaliar a eficácia da vacina a médio e longo prazo, beneficiando a população e o Sistema Único de Saúde.

IV – Objetivos

IV.1- Objetivo Geral

- Estimar a prevalência e os fatores associados à infecção pelo HPV em mulheres adultas atendidas em ambulatório de ginecologia no Centro de Atendimento Integral à Saúde Chácara do Governador, em Goiânia, Goiás.

IV.2- Objetivos Específicos

- Descrever as características sócio-demográficas e comportamentais da população estudada.
- Estimar a prevalência da infecção por HPV e de anormalidades citológicas nas participantes incluídas.
- Avaliar a associação entre as anormalidades citológicas e a infecção pelo HPV.
- Identificar os fatores sócio-demográficos, comportamentais e obstétricos associados às anormalidades citológicas e à infecção pelo HPV.
- Realizar uma revisão sistemática e metanálise sobre a prevalência da infecção por HPV em mulheres com e sem alterações citológicas.

V – Metodologia

O presente estudo faz parte do projeto intitulado “Prevalência, fatores associados e desempenho de testes diagnósticos para detecção de vaginose bacteriana e infecções genitais em mulheres atendidas em ambulatório de ginecologia preventiva”. O referido estudo teve como objetivos (1) estimar a prevalência da vaginose bacteriana e das infecções por *Candida albicans*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis* e Papilomavírus Humano (HPV); (2) identificar os fatores associados às infecções genitais investigadas e (3) avaliar o desempenho de testes diagnóstico para vaginose bacteriana e infecções genitais.

V.1- Aspectos éticos da pesquisa

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da PUC Goiás com o parecer 2.548.190 (Anexo A), da Universidade Católica de Goiás (UFG) com parecer 2.203.272 (Anexo B) e da Associação de Combate ao Câncer de Goiás (ACCG) com o parecer 2.322.218 (Anexo C), em conformidade com todas as recomendações éticas exigidas pela Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde, Ministério da Saúde. Na abordagem das participantes da pesquisa, as pesquisadoras responsáveis leram e explicaram todos os procedimentos a serem realizados e aquelas que concordaram em participar da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Foram realizados entrevistas e exame ginecológico que foram executados em local privado e por profissionais especializados. Os resultados dos exames citopatológicos foram entregues às enfermeiras do Centro de Atenção Integrado à Saúde (CAIS) da Chácara do Governador, responsáveis pela entrega dos resultados e encaminhamento das pacientes para tratamento em casos necessários.

V.2 – Delineamento do estudo, local e amostragem

Estudo de corte transversal realizado em ambulatório de ginecologia preventiva do CAIS Chácara do Governador, localizado na região norte de Goiânia, Goiás, no período de março a junho de 2018. Para o cálculo do tamanho da amostra foi utilizada a fórmula referenciada por Andrade e Zicker (1997), levando em consideração a infecção por *Neisseria gonorrhoeae*, considerada pela literatura como a de menor prevalência dentre as investigadas no estudo, com taxa aproximada de 2% ¹¹⁵, erro alfa de 5% e erro beta de 20%, o que resultou em um total de 200 participantes.

O ambulatório do CAIS Chácara do Governador caracteriza-se por fornecer atendimento ginecológico preventivo às mulheres assintomáticas do município e da região metropolitana de Goiânia. A população assistida pelo CAIS Chácara do Governador é uma população de baixa renda, que apresenta carências sobre informações básicas no âmbito de saúde preventiva. No CAIS Chácara do Governador, além dos atendimentos ginecológicos, são realizados outros procedimentos ambulatoriais como atendimentos pediátricos, serviço social, programa de vacinação uma parte de atendimentos de urgência e emergência 24 horas. O CAIS Chácara do Governador tem uma representatividade muito importante para região abrangente, pois é o único na região que oferece os atendimentos básicos e necessários para a população que reside nessa área do município.

V.3 – Critérios de elegibilidade

Foram consideradas elegíveis as mulheres reguladas para consulta ginecológica no referido CAIS, não grávidas, sabidamente não imunodeprimidas e que não usaram antibióticos nos últimos 15 dias antes da consulta. Foram incluídas as participantes maiores de 18 anos que concordaram em participar do estudo e assinaram o TCLE e que

concordaram em responder o questionário e coletar os espécimes necessários para o exame ginecológico e para os testes moleculares.

V.4 – Coleta dos dados e de espécimes para exames laboratoriais

As participantes foram entrevistadas pelas pesquisadoras, que foram treinadas especificamente para este projeto. O questionário foi desenvolvido especificamente para o presente estudo e foi aplicado em local privado e adequado (Apêndice A). O questionário foi dividido em grupos de questões contendo dados sócio-demográficos, escolaridade, situação funcional, renda, hábitos comportamentais, tabagismo e etilismo.

As variáveis foram categorizadas pelas idades das pacientes (<30 anos ou ≥ 30 anos), escolaridade (até o ensino fundamental e ensino superior), renda (< um salário e \geq um salário), estado civil (casada ou solteira), tabagismo (sim ou não), etilismo (sim ou não), prática de exercícios físicos (sim ou não), idade do início da atividade sexual (>16 anos e ≥ 16 anos), número de parceiros sexuais (1 e ≥ 2), vida sexual ativa no momento do estudo (sim ou não), uso de preservativo (sim ou não), uso de anticoncepcional oral (sim ou não), higiene após a relação sexual (sim ou não), uso de ducha vaginal (sim ou não) e exame preventivo (nunca fez e fez alguma vez).

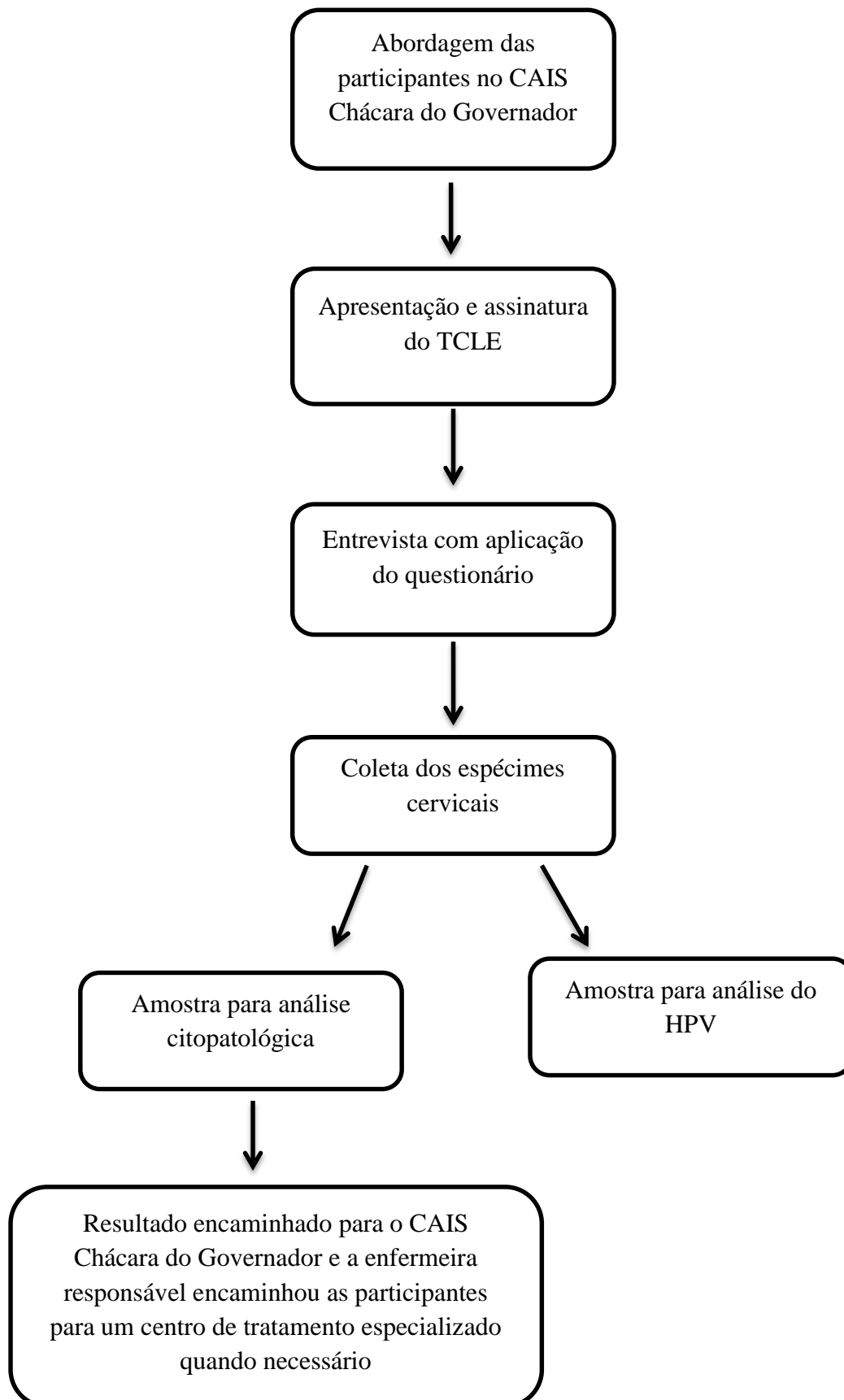
Após a entrevista com aplicação do questionário, as participantes foram submetidas a exame ginecológico, com coleta de espécime cervical para exames citopatológicos e para detecção de HPV. Na confecção do esfregaço citológico foram coletadas secreções da ectocérvice e endocérvice com espátula de Ayre e escovas de cerdas plásticas. O material foi imediatamente transferido para lâmina e fixado em solução de álcool a 90%. As amostras foram encaminhadas para o Centro de Análises Clínicas Rômulo Rocha da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás (UFG). Todos os esfregaços foram submetidos a um rigoroso controle de qualidade,

adotado pelo referido laboratório, realizado através da revisão rápida de todos os casos negativos para anormalidades citológicas cervicais. Os resultados de adequabilidade das amostras e grau de anormalidades cervicais foram interpretados de acordo com o Sistema de Bethesda ¹¹⁶.

Todos resultados obtidos foram enviados para o ambulatório de ginecologia do CAIS Chácara do Governador, em Goiânia-GO e às enfermeiras das respectivas unidades do Programa de Saúde da Família, foram responsáveis pela entrega dos resultados às pacientes e aconselhamento.

A detecção molecular de HPV foi feita a partir de células cervicais coletadas com escova apropriada tipo *cytobrush*, que logo em seguida era acondicionada em solução tampão UCM (*Universal Collection Medium QIAGEN Sample & Ensaio Technologies® - UCM*). As amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Biodiversidade da Pontifícia Universidade Católica de Goiás e congeladas a -20°C até a realização das análises (fluxograma 1).

Fluxograma 1. Representação esquemática da coleta de dados e coleta dos espécimes cervicais.



V.5 Ensaios moleculares

Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada utilizando o kit *PureLink-Invitrogen* de acordo com as especificações do fabricante. Em seguida as amostras de DNA foram submetidas a uma reação de PCR para controle de qualidade da amostra extraída, utilizando os *primers* específicos para a amplificação do gene constitutivo humano, *Glyceraldehyde 3 phosphatedehydrogenase* (GAPDH). Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram *forward* 5'CGC TCT CTG CTC CTC CTG TT3' e o *reverse* 5'CCA TGG TGT CTG AGC GAT GT3', que amplificam um fragmento de aproximadamente 99pb, seguindo um protocolo já padronizado pelo Laboratório de Biodiversidade da Pontifícia Universidade Católica de Goiás.

Para cada reação preparou-se um mix em câmara de fluxo laminar, usando tampão 5X, 1,0 µM Mg Cl₂, 0,2 µM de dNTP, 0,25u de Taq Polimerase, 0,1 µM dos oligonucleotídeos iniciadores *forward* e *reverse*. Em seguida, os microtubos contendo as amostras foram colocados em um termociclador com as seguintes configurações de ciclagem: 95 °C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos à 95 °C por 30 segundos, 59 °C por 1 minuto, 72 °C por 60 segundos. Os produtos obtidos amplificados foram analisados em gel de poliacrilamida a 8% corado com nitrato de prata (Apêndice B). A amplificação do GAPDH foi necessária para assegurar a qualidade do DNA extraído e a ausência de inibidores inespecíficos da reação de PCR (figura 5).

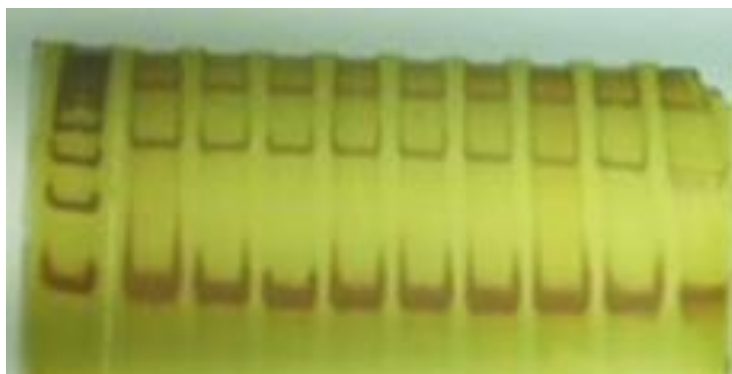


Figura 5. Gel de poliacrilamida da reação de GAPDH.

Análise molecular de detecção e genotipagem do HPV

A detecção e genotipagem do HPV foram realizadas utilizando o Kit comercial INNO-LIPA HPV *Genotyping Extra*[®] (FujirebioEurope, Ghent, Bélgica), de acordo com as instruções do fabricante. O conjunto de oligonucleotídeos iniciadores utilizado no *INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II Amp* amplifica um fragmento de 65 pb específico para a região L1 do genoma do HPV, de pelo menos 54 genótipos diferentes. O *INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II Amp*, utiliza oligonucleotídeos iniciadores SPF10 biotinizados, de maneira a produzir amplicons marcados. Os amplicons marcados são subsequentemente hibridizados em uma membrana reagente contendo 28 linhas com sondas de DNA específicas para diferentes tipos de HPV e quatro linhas para controles da reação.

A genotipagem do DNA do HPV foi feita com o kit comercial INNO-LIPA HPV *Genotyping Extra*[®] (FujirebioEurope, Ghent, Bélgica), um ensaio de hibridização reversa, projetado para identificação de 28 diferentes genótipos de HPV por meio da detecção de sequências específicas da região L1 do genoma do viral. O ensaio utilizado permite a detecção de genótipos conhecidos atualmente como HPV de alto risco ou provável alto risco (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82), bem como genótipos de HPV de baixo risco (6, 11, 40, 43, 44, 54, 70) e alguns tipos

adicionais (69, 71, 74). Controles positivos e negativos foram usados em todas as etapas da análise molecular. Além disso, um conjunto de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação do gene HLA-DPB1 humano faz parte da reação, a fim de monitorar a qualidade das amostras de DNA extraídas. A adição de uracil-N-glicosilase (UNG) à mistura de amplificação é usada como uma medida preventiva de contaminação.

Na análise dos genótipos virais foram consideradas infecções simples as amostras que apresentaram um único genótipo do HPV e consideradas infecções múltiplas as amostras que apresentaram mais de um genótipo de HPV. Nos casos de infecções múltiplas por HPV, com pelo menos um genótipo de alto risco, o resultado foi considerado como HPV de alto risco. Nos casos que continham apenas genótipos de baixo risco, a amostra foi considerada como HPV de baixo risco.

Todo o procedimento laboratorial, desde a manipulação das amostras até a detecção e genotipagem do HPV seguiu as normas de padronização internacional para testes de HPV do manual de laboratório da Organização Mundial de Saúde ¹¹⁷.

V.6 - Análises estatísticas

Os dados sóciodemográficos e comportamentais foram coletados em fichas apropriadas e transferidos para planilhas, do Microsoft Excel, versão 2013. O banco de dados foi digitado por duas pesquisadoras independentemente e os dados comparados para verificação de inconsistências e limpeza do banco. Os dados foram transferidos para o programa estatístico Epi Info Versão 7.2.3.1 e analisados por estatística descritiva, a fim de gerar estimativas de prevalência com os respectivos intervalos de confiança.

Para idade do grupo foi calculada a média e o desvio padrão. Para avaliar as possíveis associações entre as variáveis analisadas, foi realizada a análise uni e multivariada considerando o nível de significância $p < 0,05$ e teste exato de Fisher. Para avaliar as associações existentes entre os resultados obtidos para detecção do HPV e as demais variáveis analisadas, foi empregada a análise de regressão logística com o cálculo do odds ratio (OR) com intervalo de confiança (IC) 95% e nível de significância de 5%.

VI- Resultados

VI.1- Grupo de estudo – aspectos sócio-demográficos e comportamentais

Foram coletadas 202 amostras biológicas das pacientes provenientes do ambulatório de ginecologia e obstetrícia do CAIS Chácara do Governador em Goiânia-GO. Os dados sócio-demográficos incluindo idade, escolaridade, estado civil, tabagismo, etilismo e atividade física estão representados na tabela 1. A média das idades das pacientes foi de 43,2 anos com desvio padrão de $\pm 13,7$; a maioria das pacientes era casada e o tabagismo e etilismo foram relatados em 11,4% e 33,2% das pacientes, respectivamente (tabela 1).

Tabela 1. Características sócio-demográficas das participantes incluídas no estudo.

Variáveis	N (%)
Idade	
<30 anos	21 (10,4%)
≥ 30 anos	181 (89,6%)
Escolaridade	
Analfabeta	5 (2,5%)
Nível Fundamental	49 (24,3%)
Nível médio	109 (54,0%)
Nível Superior	39 (19,3%)
Renda	
< um salário	51 (25,2%)
\geq um salário	151 (74,8%)
Estado Civil	
Casada	108 (53,5%)
Solteira	94 (46,5%)
Tabagismo	
Sim	23 (11,4%)
Não	179 (88,6%)
Etilismo	
Sim	67 (33,2%)
Não	139 (68,8%)
Atividade Física	
Sim	66 (32,7%)
Não	136 (67,3%)

A maioria das pacientes iniciou a atividade sexual depois dos 16 anos de idade (78,2%), e relatou não usar nenhum método contraceptivo oral no momento da coleta

(74,8%). Entre as participantes, 80,2% relataram não usar preservativo durante a relação sexual. Quando questionadas sobre o número de parceiros sexuais, 72,3% das pacientes relataram ter tido um parceiro sexual durante toda a vida. A prevalência das alterações citopatológicas foi de 6% (12/202) e as alterações mais frequentes foram a LSIL (2%) e HSIL (2%) (tabela 2).

Tabela 2. Características comportamentais e clínicopatológicas das participantes incluídas no estudo.

Variáveis	N (%)
Idade do Início da Atividade Sexual	
<16 anos	44 (21,8%)
≥ 16 anos	158 (78,2%)
Vida Sexual Ativa	
Sim	158 (78,2%)
Não	44 (21,8%)
Uso de anticoncepcional oral	
Sim	51 (25,2%)
Não	151 (74,8%)
Número de abortos	
Nenhum	146 (72,3%)
≥ 1	56 (27,7%)
Uso de preservativo	
Sim	40 (19,8%)
Não	162 (80,25%)
Número de Parceiros Sexuais	
1	146 (72,3%)
≥2	56 (27,7%)
Higiene antes e/ou depois da relação	
Sim	186 (92,0%)
Não	16 (8,0%)
Uso de ducha vaginal	
Sim	39 (19,3%)
Não	163 (80,7%)
Exame Preventivo	
Nunca Fez	8 (4,0%)
Fez alguma vez	194 (96,0%)
Alteração Citológica	
Nenhuma anormalidade	190 (94,1%)
ASC-US	3 (1,5%)
ASC-H	1 (0,5%)
LSIL	4 (2,0%)
HSIL	4 (2,0%)
AGUS	0 (0,0%)

VI.2 – Frequência de HPV nos casos estudados

A prevalência do DNA do HPV para o grupo avaliado foi de 38,6% (78/202) (IC95% 32.17 - 45.48). A tabela 3 mostra as associações investigadas entre as características sócio-demográficas e a infecção por HPV, bem como com infecção pelos genótipos 16 e/ou 18 e presença de infecções simples e múltiplas. Mulheres com idade superior a 30 anos de idade apresentaram uma chance de se infectar por HPV duas vezes mais que as mulheres com idade inferior a 30 anos (OR: 2,0 (0,99-4,41) $p=0,03$). O estado civil casada foi um fator protetor contra a infecção por HPV (OR: 0,40 (0,22-0,71) $p=0,0001$). As pacientes que relataram ser etilistas apresentaram maior prevalência de HPV (OR: 1,7 (0,97-3,21) $p=0,04$).

O estado civil solteira foi um fator de risco para a infecção com os genótipos 16 e/ou 18 (OR: 0,28 (0,10-0,76) $p=0,008$). Não foram encontradas associações entre as infecções simples ou múltiplas e as características sócio-demográficas das participantes (tabela 3).

Tabela 3. Associação entre as características sócio-demográficas com a infecção por HPV, com a infecção pelos os genótipos 16 e/ou 18 e com infecção simples ou múltiplas.

Variáveis	HPV +	HPV -	OR (IC95%)	<i>p</i>	HPV 16/18	HPV 16/18	OR (IC95%)	<i>p</i>	HPV Inf. Simples	HPV Inf. Múltipla	OR (IC95%)	<i>p</i>
Idade												
<30	11 (52,3%)	10 (47,7%)	2,0 (0,99-4,41)	0,03	3 (7,9%)	35 (92,1%)	0,65 (0,18-2,33)	0,37	12 (63,2%)	7 (36,8%)	0,93 (0,31-2,79)	0,55
≥30	67 (37,0%)	114 (63,0%)			19 (11,6%)	145 (88,4%)			33 (64,7%)	18 (35,3%)		
Escolaridade												
Até o ensino fundamental	20 (36,3%)	35 (63,6%)	0,87 (0,46-1,66)	0,4	6 (10,9%)	49 (89,1%)	1,00 (0,37-2,70)	0,58	11 (64,7%)	6 (35,3%)	1,02 (0,32-3,21)	0,60
Ensino, médio e ensino superior	58 (39,4%)	89 (60,5%)			16 (10,9%)	131 (89,1%)			34 (64,2%)	19 (35,8%)		
Renda												
< um salário	22 (43,1%)	29 (56,9%)	1,2 (0,67-2,45)	0,27	6 (11,8%)	45 (88,2%)	1,12 (0,41-3,04)	0,49	9 (50,0%)	9 (50,0%)	0,44 (0,14-1,32)	0,11
≥ um salário	56 (37,0%)	95 (63,0%)			16 (10,6%)	135 (89,4%)			36 (69,2%)	16 (30,8%)		
Estado Civil												
Casada	31 (28,7%)	77 (71,3%)	0,40 (0,22-0,71)	0,0001	6 (5,6%)	102 (94,4%)	0,28 (0,10-0,76)	0,008	20 (76,9%)	6 (23,1%)	2,53 (0,85-7,53)	0,07
Solteira	47 (50,0%)	47 (50,0%)			16 (17,0%)	78 (83,0%)			25 (56,8%)	19 (43,2%)		
Tabagismo												
Sim	10 (43,5%)	13 (56,5%)	1,2 (0,52-3,0)	0,38	2 (8,7%)	21 (91,3%)	0,75 (0,16-3,47)	0,52	8 (88,9%)	1 (11,1%)	5,18 (0,60-44,16)	0,09
Não	68 (58,0%)	111 (62,0%)			20 (11,2%)	159 (88,8%)			37 (36,7%)	24 (39,4%)		
Étilismo												
Sim	32 (47,8%)	35 (52,2%)	1,7 (0,97-3,21)	0,04	10 (14,9%)	57 (85,1%)	1,79 (0,73-4,40)	0,14	20 (69,0%)	9 (31,0%)	1,42 (0,51-3,89)	0,33
Não	46 (33,0%)	89 (67,0%)			12 (8,9%)	123 (91,1%)			25 (61,0%)	16 (39,0%)		
Prática de Exercício Físico												
Sim	26 (39,3%)	40 (60,7%)	1,0 (0,57-1,91)	0,49	9 (13,6%)	57 (86,7%)	1,49 (0,60-3,69)	0,25	16 (66,7%)	8 (33,3%)	1,17 (0,41-3,31)	0,48
Não	52 (38,2%)	84 (61,8%)			13 (9,6%)	123 (90,4%)			29 (63,0%)	17 (37,0%)		

Quando as associações entre as características comportamentais e clínicopatológicas e a infecção por HPV foram avaliadas, observou-se que o uso de anticoncepcional oral conferiu maior risco para a infecção por HPV (OR: 1,7 (0,93-3,38) $p= 0,05$). Pacientes com alterações citológicas apresentaram maior prevalência de infecção por HPV (OR: 8,9 (1,90-42,1) $p= 0,001$). As pacientes que relataram não usar preservativos, apresentaram maior risco de infecção pelos genótipos 16 e/ou 18 do que as mulheres que relataram o uso de preservativo (OR: 3,32 (1,30-8,46) $p= 0,01$) (tabela 4).

Tabela 4. Associações das características comportamentais e clinicopatológicas com a infecção geral por HPV, com a infecção pelos genótipos 16 e/ou18 e com infecções simples e múltiplas.

Variáveis	HPV +	HPV -	OR (IC95%)	p	HPV 16/18	HPV 16/18	OR (IC95%)	p	HPV Inf. Simples	HPV Inf. Múltipla	OR (IC95%)	p
Início da Atividade Sexual												
< 16 anos	15 (34,0%)	29 (65,9%)	0,78 (0,38-1,57)	0,24	3 (6,8%)	41 (93,2%)	0,53 (0,15-1,89)	0,24	12 (63,2%)	7 (36,8%)	0,93 (0,31-2,79)	0,55
≥ 16 anos	63 (39,9%)	95 (60,1%)			19 (12,0%)	139 (88,0%)			33 (64,7%)	18 (35,3%)		
Vida Sexual Ativa												
Sim	62 (39,3%)	96 (60,7%)	1,13 (0,56-2,25)	0,43	16 (10,1%)	142 (89,9%)	0,71 (0,26-1,94)	0,33	37 (66,1%)	19 (33,9%)	1,46 (0,44-4,82)	0,37
Não	16 (36,4%)	28 (63,6%)			6 (13,6%)	38 (86,4%)			8 (57,1%)	6 (42,9%)		
Uso de anticoncepcional oral												
Sim	25 (49,0%)	26 (51,0%)	1,7 (0,93-3,38)	0,05	7 (13,7%)	44 (86,3%)	1,44 (0,55-3,76)	0,30	15 (65,2%)	8 (34,8%)	1,06 (0,37-3,01)	0,56
Não	53 (35,0%)	98 (65,0%)			15 (9,9%)	136 (90,1%)			30 (63,8%)	17 (36,2%)		
Número de Abortos												
Nenhum	57 (39,0%)	89 (61,0%)	1,0 (0,56-2,0)	0,48	15 (10,3%)	131 (89,7%)	0,80 (0,30-2,08)	0,40	32 (62,8%)	19 (37,2%)	0,77 (0,25-2,38)	0,44
≥ 1	21 (37,5%)	35 (62,5%)			7 (12,5%)	49 (87,5%)			13 (68,4%)	6 (31,6%)		
Uso de preservativo												
Sim	20 (50,0%)	20 (50,0%)	1,79 (0,89-3,60)	0,07	9 (22,5%)	31 (77,5%)	3,32 (1,30-8,46)	0,01	12 (63,2%)	7 (36,8%)	0,93 (0,31-2,79)	0,55
Não	58 (36,0%)	104 (64,0%)			13 (8,0%)	149 (92,0%)			33 (64,7%)	18 (35,3%)		
Número de parceiros sexuais												
1	61 (41,8%)	85 (58,2%)	1,64 (0,85-3,17)	0,09	17 (11,6%)	129 (88,4%)	1,34 (0,47-3,83)	0,39	35 (64,8%)	19 (35,2%)	1,10 (0,34-3,51)	0,54
≥ 2	17 (30,4%)	39 (69,6%)			5 (8,9%)	51 (91,1%)			10 (62,5)	6 (37,5%)		
Higiene antes e/ou depois da relação												
Sim	74 (39,8%)	112 (60,2%)	1,98 (0,61-6,38)	0,18	19 (10,2%)	167 (89,8%)	0,49 (0,12-1,88)	0,24	42 (63,6%)	24 (36,4%)	0,58 (0,05-5,92)	0,54
Não	4 (25,0%)	12 (75,0%)			3 (18,8%)	13 (81,2%)			3 (75,0%)	1 (25,0%)		
Uso de ducha vaginal												
Sim	18 (46,2%)	21 (53,8%)		0,18	7 (18,0%)	32 (82,0%)	2,15 (0,81-5,72)	0,10	11 (68,8%)	5 (31,2%)	1,29 (0,39-4,26)	0,45
Não	60 (36,9%)	103 (63,1%)			15 (9,2%)	148 (90,8%)			34 (63,0%)	20 (37,0%)		
Exame Preventivo												
Nunca Fez	1 (12,5%)	7 (87,5%)	0,21 (0,02-1,79)	0,11	0 (0,0%)	8 (100,0%)	-	0,39	1 (100,0%)	0 (0,0%)	-	0,64
Fez alguma vez	77 (39,6%)	117 (60,3%)			22 (11,3%)	172 (88,7%)			44 (63,8%)	25 (36,2%)		
Alteração Citológica												
Com alteração	10 (83,3%)	2 (16,7%)	8,9 (1,90-42,1)	0,001	4 (33,3%)	8 (66,7%)	4,77 (1,30-17,43)	0,02	7 (70,0%)	3 (30,0%)	1,35 (0,31-5,76)	0,48
Sem alteração	68 (35,8%)	122 (64,2%)			18 (9,5%)	172 (90,5%)			38 (63,3%)	22 (36,7%)		
Alteração citológica de alto grau												
Sim	4 (80,0%)	1 (20,0%)	6,64 (0,72-60,62)	0,07	2 (40,0%)	3 (60,0%)	5,9 (0,92-37,44)	0,09	2 (50,0%)	2(50,0%)	0,53 (0,07-4,04)	0,45
Não	74 (37,6%)	123 (62,4%)			20 (10,2%)	177 (89,8%)			43 (65,2%)	23 (34,8%)		
Alteração citológica de baixo de grau												
Sim	6 (85,7%)	1 (14,3%)	10,25 (1,20-86,85)	0,01	2 (28,6%)	5 (71,4%)	3,5 (0,63-19,23)	0,16	5 (83,3%)	1 (16,7%)	3,0 (0,33-27,23)	0,29
Não	72 (36,9%)	123 (63,1%)			20 (10,3%)	175 (89,7%)			40 (62,5%)	24 (37,5%)		

VI.3 – Distribuição genotípica do HPV nos casos estudados

Entre as amostras positivas para o DNA do HPV, 10,2% não foi possível determinar o genótipo e 32% apresentaram infecção por múltiplos genótipos. Os genótipos mais prevalentes foram o HPV 52, 58, 18, 16, 70 (figura 6).

Entre as amostras positivas para o HPV, foram encontrados genótipos que são classificados como de alto risco ou provável alto risco, incluindo o HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 73 e 82, genótipos classificados como de baixo risco, incluindo HPV 6, 11, 42, 43, 44, 70 e 83. As amostras com alterações citopatológicas, os genótipos mais prevalentes foram os HPV 16 e 52 (Gráfico 1).

Figura 6. Distribuição dos genótipos de HPV encontrados na população analisada.

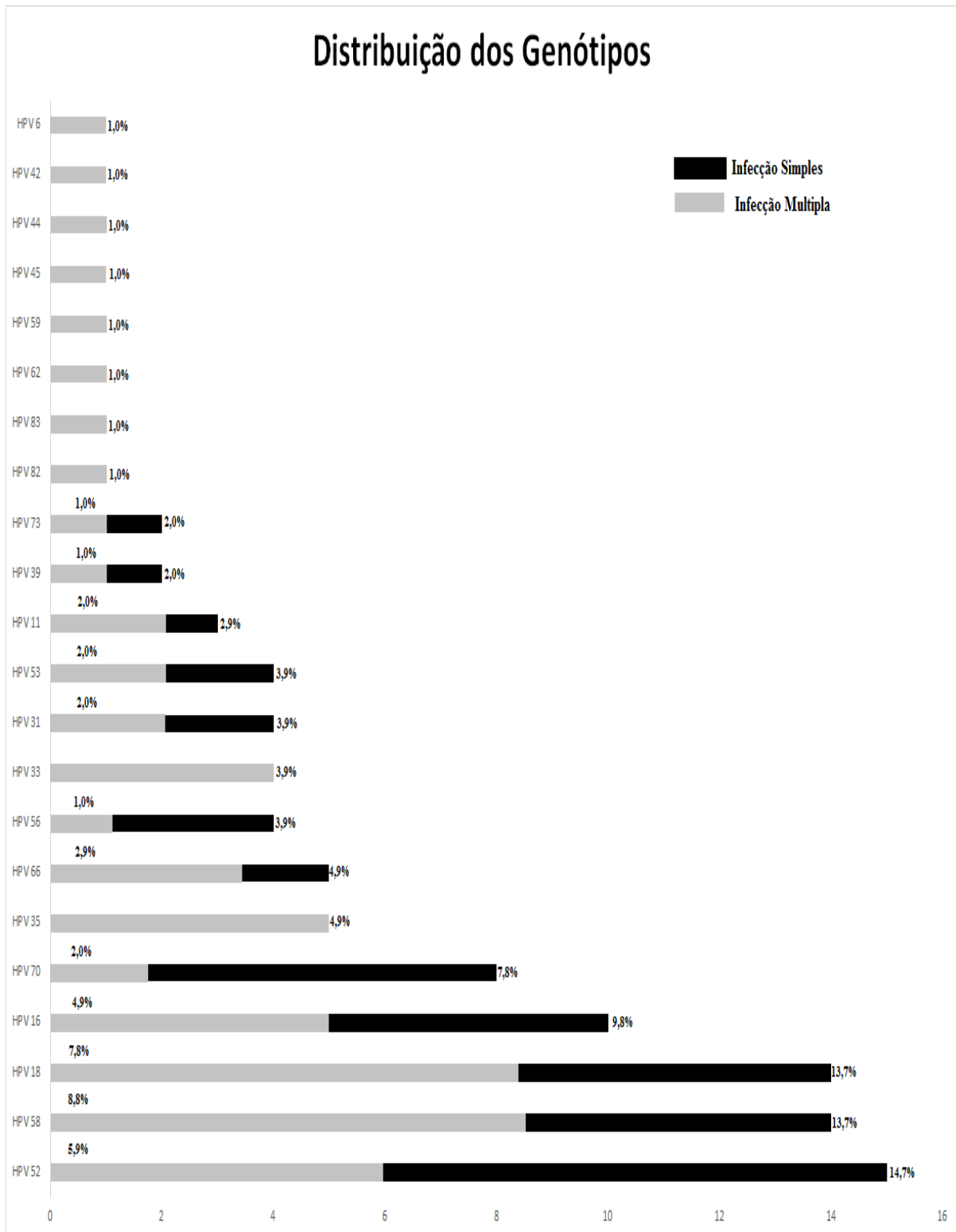
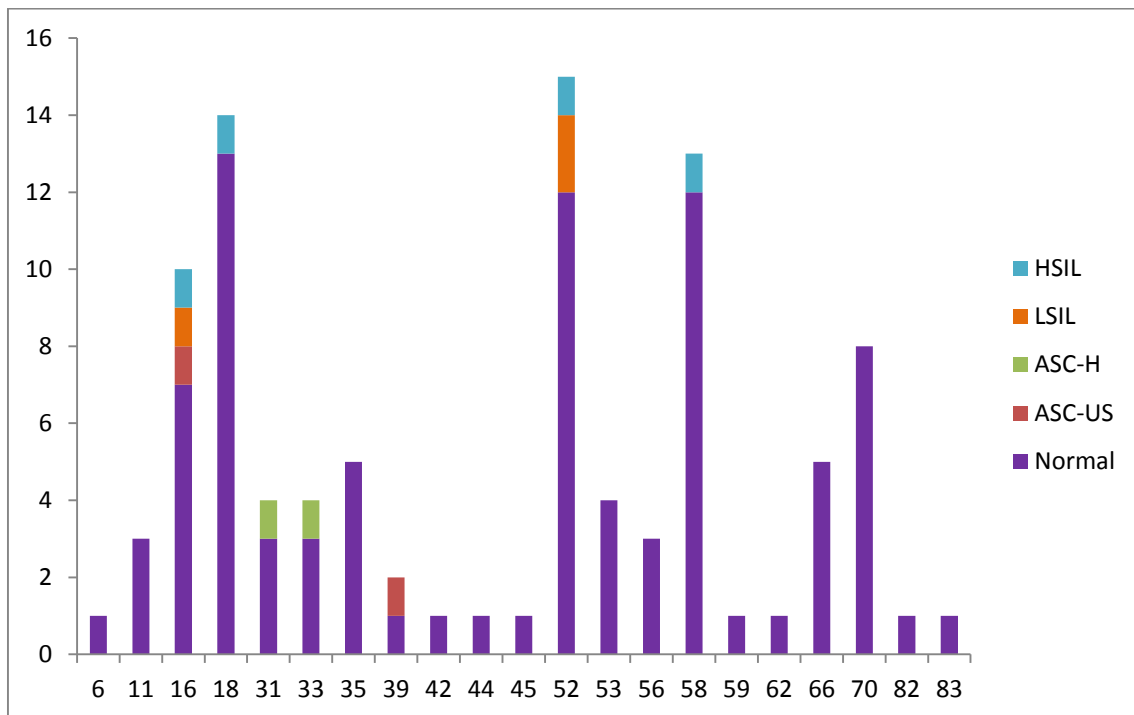


Gráfico 1. Relação da prevalência dos genótipos com alterações citopatológicas.



VII- Discussão

Este é o primeiro estudo que avaliou a prevalência e distribuição dos genótipos de HPV em mulheres assintomáticas, atendidas em um ambulatório de ginecologia preventiva em Goiânia. Os genótipos mais prevalentes encontrados na região analisada não estão inclusos na vacina disponibilizada atualmente pelo Ministério da Saúde do Brasil. A prevalência da infecção por HPV na região analisada foi de 38,6%, enquanto a idade média das pacientes foi de 43,2 anos. Considerando a faixa etária analisada, a prevalência da infecção por HPV foi alta. Estudos relatam que nessa faixa etária a prevalência da infecção por HPV está em torno de 6% para mulheres com citologia normal^{12,118}.

A infecção por HPV em mulheres mais velhas parece ser resultado de infecções persistentes, causadas por falha na eliminação do vírus pelo sistema imunológico^{119,120}. Entretanto, nos anos mais recentes, é comum mulheres mais velhas iniciarem novas relações sexuais e serem expostas ao HPV pela primeira vez e, portanto, permanecerem vulneráveis à infecção por HPV e ao desenvolvimento de doenças associadas ao vírus^{119,121}.

Neste estudo, 6% das participantes apresentaram algum tipo de alteração citológica. As alterações mais prevalentes foram LSIL (2,0%) e HSIL (2,0%), seguida de ASC-US com 1,5% e ASC-H com 0,5%. Outros estudos relataram uma maior prevalência de alterações citológicas de baixo grau¹²².

Quando a infecção por HPV foi investigada em relação às alterações citológicas, observou-se que a prevalência do HPV foi maior em mulheres que apresentaram algum tipo de alteração citológica ($p=0,001$). Houve uma associação entre a infecção por HPV e as alterações citológicas de baixo grau ($p=0,01$). As participantes com alterações citológicas apresentaram uma associação com genótipos de alto risco 16 e 18 ($p=0,02$).

O aparecimento de alterações citológicas está relacionado com persistência e progressão da infecção pelo HPV ¹²³. Estudos relatam que a persistência da infecção por HPV leva à transformação do epitélio cervical, em um intervalo de tempo de aproximadamente sete anos e essas lesões cervicais podem manifestar-se clinicamente ¹²³. A infecção persistente por genótipos de alto risco favorece a transformação maligna do epitélio, uma vez que as oncoproteínas E6 e E7 dos genótipos de alto risco favorecem o curso da infecção e conseqüentemente a transformação do epitélio ^{65,123}.

Resultados falsos negativos e insatisfatórios dos exames citológicos levaram ao desenvolvimento de novas tecnologias empregadas na detecção da infecção pelo HPV e das lesões cervicais associadas ao vírus ¹²⁴. Atualmente existem evidências científicas que apoiam o uso de testes de DNA do HPV como principal método de triagem para mulheres com mais de 30 anos de idade ¹²⁴. A triagem para a prevenção do câncer de colo uterino, realizada pela detecção do DNA do HPV apresenta alta sensibilidade e antecipa o diagnóstico de NIC II e III, mesmo quando realizada em um intervalo de cinco anos ¹²⁴.

A principal limitação dos testes baseados no DNA do HPV é baixa especificidade, ou seja, resultados positivos quando não há lesão. O uso inapropriado dos testes de detecção do DNA do HPV leva a um número excessivo de mulheres encaminhadas para a colposcopia ¹²⁴. Entretanto, a triagem com testes baseados em DNA do HPV pode ser vantajosa em mulheres com mais de 30 anos de idade, seguida de triagem com citologia, para que apenas aquelas com atípias citológicas sejam encaminhadas para colposcopia ¹²⁴.

Apesar dos estudos mostrarem repetidamente a superioridade dos testes de DNA sobre a citologia convencional, os testes de detecção do DNA do HPV não são

disponibilizados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e são de difícil acesso mesmo para as pessoas com planos de saúde particulares.

Quando avaliado os fatores de risco relacionados à infecção por HPV, verificou-se que as participantes com mais de 30 anos apresentaram maior prevalência de HPV ($p=0,03$); o estado civil casada foi fator protetor contra a infecção por HPV (OR: 0,40 (0,22-0,71) $p= 0,001$) e as participantes que relataram ser etilistas apresentaram maior prevalência da infecção ($p=0,04$). Além disso, foi encontrada uma associação entre a infecção por HPV com o uso de anticoncepcional. As associações entre a infecção por HPV com a idade, estado civil, etilismo e uso de anticoncepcional também foram relatadas em outros estudos ^{11,25,26,30,125}.

A história de vários parceiros sexuais é um fator de risco para a infecção por HPV porque aumenta a probabilidade de contato com outras pessoas infectadas pelo vírus ¹²⁶. Outro fator é a violência durante o ato sexual, que favorece o aparecimento de microtraumas, facilitando a entrada do HPV para a camada basal do epitélio ¹²⁶. Pesquisas relatam que a associação do consumo de álcool com a infecção por HPV pode estar relacionada com o aumento na desinibição sexual e com comportamento mais promíscuo ¹²⁷. Além disso, estudos demonstraram que o consumo de álcool pode afetar o sistema imunológico, aumentando a suscetibilidade a várias doenças infecciosas ¹²⁷⁻¹³⁰.

O uso de anticoncepcional é considerado por alguns autores como fator de risco para a infecção por HPV ^{125,131,132}. Acredita-se que o uso de contraceptivos baseados em estrogênio pode estimular a proliferação celular no epitélio cervical, favorecendo o curso da infecção por HPV ^{125,132}. Conhecer a prevalência da infecção por HPV em determinada população é importante para planejar ações voltadas para atenção básica à

saúde, ou seja, rastrear e prevenir doenças associadas ao vírus como verrugas anogenitais e câncer de colo uterino.

Na análise da distribuição dos genótipos, os mais prevalentes na população analisada foram o HPV 52, 58, 18 e 16. Estes genótipos são considerados de alto risco e estão envolvidos na maioria dos cânceres associados a infecção por HPV ⁶⁵. A principal forma de prevenção contra a infecção por HPV é a vacina profilática ¹³³. Uma vez que as vacinas são eficazes somente para alguns genótipos virais, o conhecimento dos diferentes genótipos em uma dada população é importante para avaliar a eficácia da vacina na região analisada ¹⁴.

Desde a introdução das vacinas contra a infecção por HPV, houve a necessidade de investigar sua eficácia em diferentes populações. Os resultados dessa pesquisa revelam importantes achados, uma vez que os genótipos mais prevalentes na população analisada são genótipos de alto risco que não estão inclusos na vacina disponibilizada atualmente pelo Ministério da Saúde do Brasil. O impacto de ter uma região em que a vacina disponibilizada não cobre os genótipos mais prevalentes reflete um grande problema de saúde pública, pois a vacina não terá uma boa efetividade nesta população.

Devido à falha na cobertura da vacina disponibilizada na região analisada, é necessária a intensificação de outras medidas de prevenção contra a infecção por HPV. Além disso, há uma necessidade de programar campanhas educativas que alcancem a população geral sobre o risco da infecção por HPV e das doenças associadas ao vírus.

A efetividade da vacina é avaliada por mudanças na prevalência da infecção e no aparecimento de doenças associadas ao vírus, que devem ser monitoradas por meio de análises de populações vacinadas e não vacinadas, com conhecimento seguro dos dados de vacinação contra o HPV, incluindo o número de doses administradas, tempo desde a vacinação e tipo de vacina administrada ^{14,112}. Este é o primeiro estudo que

avaliou a prevalência dos genótipos de HPV em uma população comum de uma região da cidade de Goiânia, que encontrou achados relevantes que forneceram informações para a avaliação da eficácia da vacina nessa população.

Uma meta-análise realizada por Drolet et al.,¹¹² incluiu 65 estudos desenvolvidos em 14 países, totalizando 60.000 indivíduos num período de oito anos de seguimento pós-vacina¹¹². Os resultados da meta-análise de Drolet et al., demonstraram uma redução de 80% na prevalência de infecções por HPV 16 e HPV18; uma redução de 70% na detecção de verrugas genitais; e uma redução significativa de lesões precursoras (NIC2)¹¹².

A principal observação dos dados gerais de Drolet et al. foi que o maior impacto e o maior efeito de imunidade coletiva foram observados em países que vacinaram indivíduos de múltiplas faixas etárias, com maior cobertura vacinal, comparados àqueles com um programa mais restrito e/ou com baixa cobertura vacinal¹¹². Efeito-rebanho ou imunidade coletiva são termos que descrevem a redução da infecção ou doença em uma população não vacinadas como resultado de uma proporção da população vacinada¹³⁴.

A implementação da vacina em meninas e mulheres vulneráveis enfrenta várias barreiras que incluem alto custo das vacinas, infraestrutura inadequada na entrega das vacinas e falta de envolvimento da comunidade para adquirir informações e conscientização sobre o câncer de colo uterino¹⁴. Para que a vacina contra o HPV funcione é necessário que as autoridades de saúde superem esses obstáculos para garantir a entrega da vacina e planejar atividades integradas na educação e rastreamento em saúde com base na comunidade.

A principal limitação deste estudo é que as mulheres investigadas pertenciam a uma única região do município, vez que eram atendidas em uma mesma unidade de saúde. Estudos incluindo mulheres de outras regiões e diferentes unidades de saúde

poderiam traduzir de forma mais fiel a distribuição dos genótipos no município de Goiânia. Nossos resultados enfatizam a necessidade de estudos mais amplos que avaliem a prevalência e a distribuição do HPV em mulheres vacinadas e não vacinadas, visando avaliar a eficácia da vacina anti-HPV à longo prazo.

VIII - Conclusões e Perspectivas

- A partir dos resultados obtidos, verificou-se uma alta prevalência da infecção por HPV na população analisada.
- As mulheres com alterações citológicas apresentaram uma maior prevalência de HPV e os genótipos mais prevalentes na população estudada não são prevenidos pela vacina anti-HPV disponibilizada atualmente pelo SUS.
- Estes resultados enfatizam a necessidade de estudos mais amplos que avaliem a prevalência e a distribuição dos genótipos de HPV visando avaliar a eficácia da vacina anti-HPV, a médio e longo prazo.

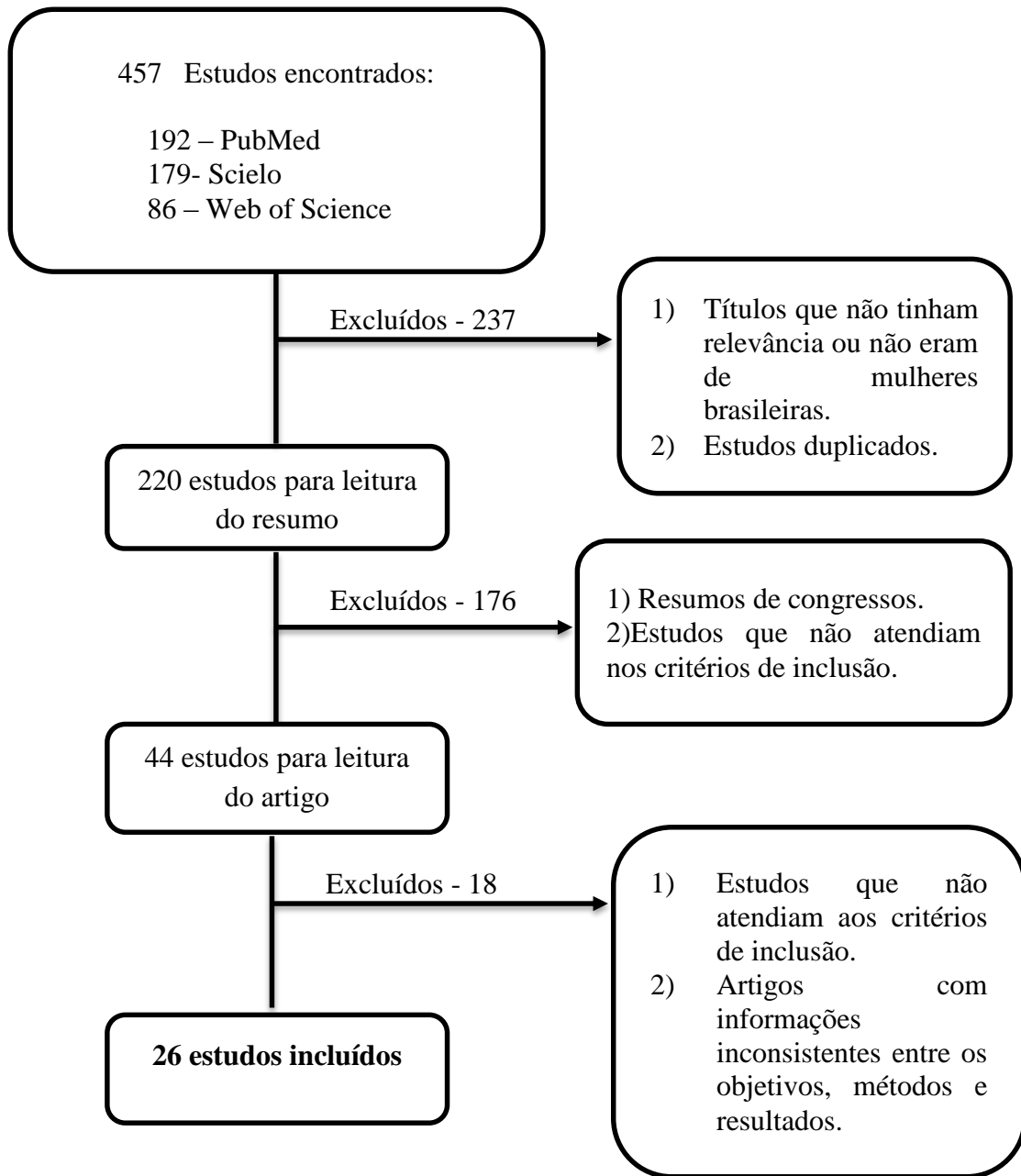
IX. Prevalência do Papilomavírus Humano no Brasil - Revisão Sistemática e Metanálise

Realizou-se uma revisão sistemática e metanálise de estudos que estimaram a prevalência do HPV e de seus genótipos em mulheres brasileiras assintomáticas ou não que realizaram exames citológicos. A busca e coleta dos dados foi realizada por meio de protocolo de busca, elaborado pelos autores e não registrado nas bases de dados específicas para revisão sistemática e metanálise.

Critérios de Inclusão e Exclusão

Foram incluídos artigos completos que avaliaram a prevalência do HPV em amostras cervicais de mulheres brasileiras com e sem alterações citológicas, que utilizaram o método de Reação da Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção do HPV e que apresentavam metodologia claramente descrita. Foram excluídos: estudos de revisões; relatos de caso; estudos com pacientes imunodeprimidos; estudos que não estavam disponíveis para análise; resumo de congresso; artigos com dados inconsistentes (fluxograma 2).

Fluxograma 2. Fluxograma de busca e seleção dos artigos incluídos no estudo.



Estratégia de Busca e Seleção

O estudo incluiu trabalhos indexados nas bases *Medical Literature Analysis and Retrieval System Online* (MEDLINE), consultado por meio do *PubMed*; *Cochrane e Scientific Electronic Library Online* (SciELO); *Web Of Science*. Não foram utilizados filtros e não houve delimitação por período. Foram utilizados os seguintes termos MESH: “HPV”, “detection”, “cervical”, “Brazil”. A busca foi realizada no mês de abril de 2018, a coleta e análise dos dados foi feita entre os meses de maio e junho de 2018.

Não foi realizado contato com pesquisadores clínicos para verificar possíveis pesquisas em andamento. As publicações em duplicatas foram removidas manualmente.

Extração dos Dados

A partir de cada estudo incluído, foram extraídos os seguintes dados: autor, ano de publicação, região do estudo, tamanho da amostra testada para o DNA do HPV, prevalência das alterações citológicas diagnosticadas, lesões citológicas diagnosticadas, prevalência global do HPV em mulheres com e sem alterações citológicas e os genótipos encontrados, quando disponíveis nos estudos.

Foram incluídas como alterações citológicas de acordo com o sistema de Bethesda, as lesões diagnosticadas como alterações de células escamosas de significado indeterminado (ASC-US), alterações de células escamosas que não pode excluir lesão de alto grau (ASC-H), lesão escamosa de baixo grau (LSIL), lesão escamosa de alto grau (HSIL), alteração de células glandulares de significado indeterminado (AGUS). Como alterações histológicas foram incluídas NICI, NIC II, NICIII, câncer invasivo (CA invasivo) e adenocarcinoma

Avaliação da Qualidade do Estudo

Na avaliação da qualidade, foi utilizado um instrumento de avaliação composto de uma adaptação dos 17 itens dos critérios propostos pelo PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analyses). Esta avaliação objetivou identificar a pertinência dos artigos para a elaboração de um painel em que as informações coletadas pudessem ser facilmente identificadas e interpretadas, a fim de propor recomendações para estudos futuros ¹³⁵.

Análise Estatística

A tabulação dos dados utilizou o programa *Microsoft Excel for Windows 2016*. Para avaliar as possíveis associações entre as variáveis analisadas foi empregado o teste de qui-quadrado (X^2) considerando o nível de significância $p < 0,05$ e empregada a análise de regressão logística *odds ratio*, utilizando o software *SPSS - Statistical Package for Social Science (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)* versão 22.0. Para a realização do gráfico de *Forest Plot* também foi utilizado o programa *SPSS - Statistical Package for Social Science (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)* versão 22.0.

Resultados

Os artigos incluídos foram publicados entre os anos de 2003 a 2017. Os 26 artigos representaram estudos das quatro regiões do país e a região Sudeste apresentou a maior quantidade de estudos publicados (46,2%), seguida da região Nordeste (23,1%), Centro-Oeste (15,4%), Sul (11,5%) e Norte (3,8%).

Prevalência de alterações citológicas

No total foram analisadas 5804 amostras cervicais, das quais 2511 (48,7%) apresentaram anormalidades citopatológicas, sendo o LSIL a alteração mais prevalente com 1044 casos (41,6%), seguida de ASC-US (13%), CA invasivo (10,7%), HSIL

(4,5%), NIC I (3,2%), NIC II (2,2%), NIC III (2,2%), AGUS (0,5%) e ASC-H (0,2%)
(Tabela 5).

Tabela 5. Frequência e classificação das alterações citológicas em amostras cervicais no período de 2003 a 2017.

Autor	Ano	Casuística	Alt. Cito. Geral		Prevalência das Alterações em Amostras Cervicais																Sem. Alt				
			ASCUS		ASCH		LSIL		HSIL		NIC I		NIC II		NIC III		CA invasivo		AGUS						
			n	f(%)	n	f(%)	n	f(%)	n	f(%)	n	f(%)	n	f(%)	n	f(%)	n	f(%)	n	f(%)	n	f(%)			
Rabelo-Santos ¹³⁶	2003	86	86	100,0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--			
Coelho ¹³⁷	2004	31	24	77,4	--	--	--	--	--	--	--	--	5	20,8	3	12,5	9	37,5	7	29,2	--	--	7	29,2	
Rabelo-Santos ¹³⁸	2005	92	83	90,2	3	3,3	--	--	63	68,5	17	18,5	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	9	9,8	
Paula ¹³⁹	2006	250	75	30,0	13	5,2	--	--	31	12,4	27	10,8	--	--	--	--	--	--	4	1,6	--	--	175	70,0	
Campus ¹⁴⁰	2007	57	57	100,0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
Calil ¹⁴¹	2010	86	86	100,0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
Furtado ¹⁴²	2010	47	27	57,4	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	20	42,6	
Ribeiro	2010	198	158	79,8	--	--	--	--	--	--	--	--	66	33,3	39	19,7	44	22,2	9	4,5	--	--	40	20,2	
Siegel ¹⁴³	2010	643	643	100,0	--	--	--	--	643	100,0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
Fernandes ¹⁴⁴	2011	158	48	30,4	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	48	30,4	--	--	110	69,6	
Barros ¹⁴⁵	2012	131	131	100,0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
Nomelini ¹⁴⁶	2012	81	81	100,0	81	100,0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
Carestiato ¹⁴⁷	2013	141	113	80,1	--	--	--	--	35	24,8	49	34,8	--	--	--	--	--	--	29	20,6	--	--	28	19,9	
Fidelis ¹⁴⁸	2013	40	40	100,0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
Oliveira ¹⁴⁹	2013	172	172	100,0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	172	100,0	--	--	--	--	--	
Augusto ¹⁵⁰	2014	351	9,1	2,6	5	1,4	--	--	3	0,9	1	0,3	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	342	97,4	
Krambeck ¹⁵¹	2014	97	25	25,8	--	--	--	--	--	--	--	--	9	9,3	13	13,4	3	3,1	--	--	--	--	72	74,2	
Magalhães ¹⁵²	2014	1006	128	12,7	80	8,0	--	--	48	4,8	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	878	88,7	
Nunes ¹⁵³	2014	97	97	100,0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
Caixeta ¹⁵⁴	2015	251	24	9,6	12	4,8	1	0,4	7	2,8	3	1,2	--	--	--	--	--	--	--	--	--	1	0,4	227	90,4
Peres ¹⁵⁵	2015	673	23	3,4	4	0,6	--	--	11	1,6	8	1,2	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	650	96,6	
Possati-Resende ¹⁵⁶	2015	201	201	100,0	96	47,8	--	--	105	52,2	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
Silveira ¹⁵⁷	2015	40	40	100,0	--	--	--	--	40	100,0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
Wohlmeister ¹⁵⁸	2016	169	18	10,7	4	2,2	1	0,6	10	5,9	3	1,8	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	151	89,9	
Batista ¹⁵⁹	2017	353	25	7,1	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	328	92,9	
Duarte ¹⁶⁰	2017	353	97	27,5	28	7,9	3	0,8	48	13,6	6	1,7	--	--	--	--	--	--	--	--	12	3,4	256	72,5	
Total		5804	2511	48,7	326	13	5	0,2	1044	41,6	114	4,5	80	3,2	55	2,2	56	2,2	269	10,7	13	0,5	3293	56,7	

Alt.Cito – Alterações citológicas; Sem. Alt. – Sem alterações citológicas. (--) O artigo não avaliou a variável.

Prevalência do HPV

O DNA do HPV foi detectado em 42,7% (2476) das amostras analisadas. Das 2511 amostras com alterações citológicas, o DNA do HPV esteve presente em 1655 casos (65,9%) e 95,5% das pacientes com CA invasivo apresentaram infecção por HPV. Das 3293 amostras que não apresentaram alterações citológicas, 21,1% (694) apresentaram o DNA do HPV (Tabela 6). Mulheres com alterações citológicas apresentaram uma maior prevalência de HPV, comparadas com as mulheres que não apresentaram nenhuma alteração citopatológica ($p=0,001$).

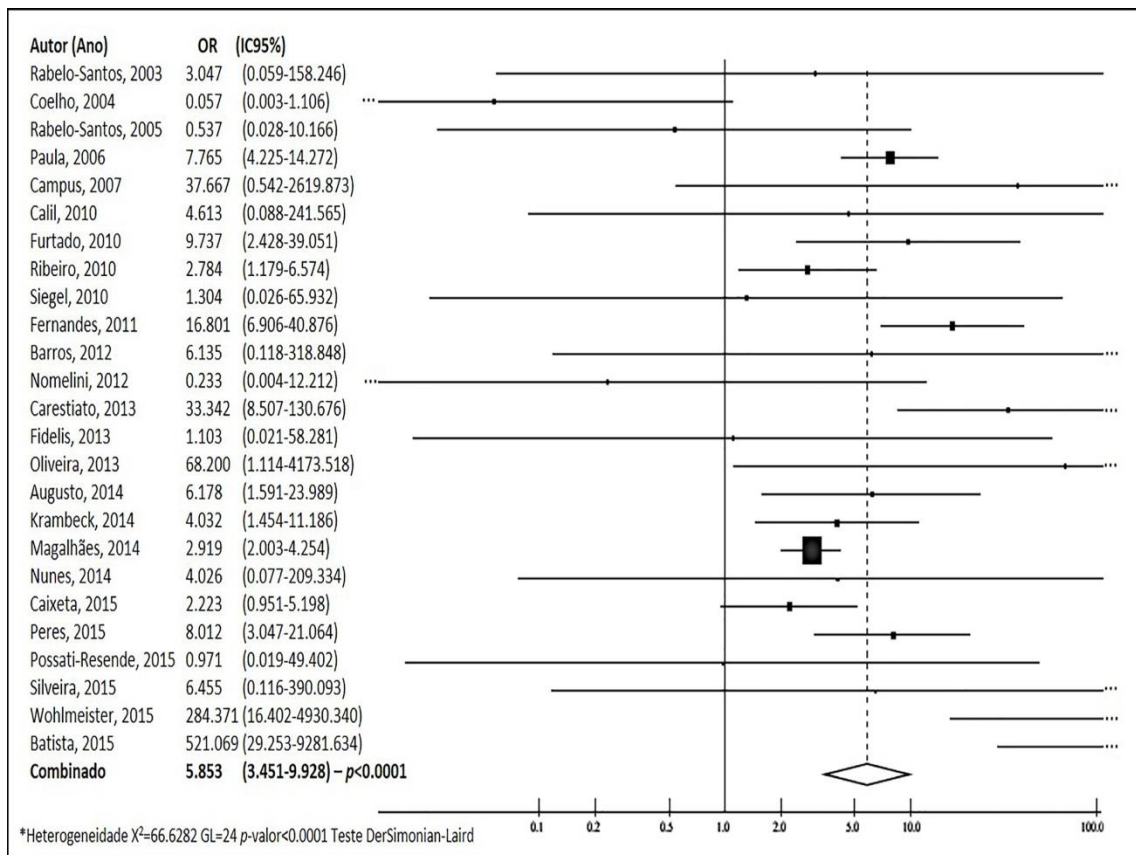
A infecção pelo HPV foi mais prevalente na região Sudeste (44,2%), seguida da região Nordeste (27,2%), Centro-Oeste (18,1%), Sul (5,4%) e Norte (5,1%).

Tabela 6. Prevalência da infecção por HPV em amostras cervicais com e sem alterações citológicas.

Autor	Ano	Casuística	Prevalência de HPV		HPV Baixo Risco		HPV Alto Risco		Prevalência do HPV nas Amostras Cervicais por alteração																					
			Prevalência de HPV		HPV Baixo Risco		HPV Alto Risco		Alt.Cito		ASCUS		ASCH		LSIL		HSIL		NIC I		NIC II		NIC III		CA Invasivo		AGUS		Sem Alt.	
			N	f(%)	N	f(%)	n	f(%)	n	f(%)	n	f(%)	n	f(%)	n	f(%)	n	f(%)	n	f(%)	n	f(%)	n	f(%)	n	f(%)	n	f(%)	n	f(%)
Rabelo-Santos ¹³⁶	2003	86	65	76,0	--	--	--	--	65	75,6	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	
Coelho ¹³⁷	2004	24	11	45,8	--	--	--	--	11	45,8	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	5	71,4	--	--	7	100,0	
Rabelo-Santos ¹³⁸	2005	92	85	92,4	--	--	--	--	76	91,6	3	100,0	--	--	57	90,0	16	94,1	--	--	--	--	--	--	--	--	--	9	100,0	
Paula ¹³⁹	2006	250	100	40,0	--	--	--	--	55	57,9	9	69,2	--	--	22	71,0	20	74,1	--	--	--	--	--	4	100,0	--	--	45	25,7	
Campus ¹⁴⁰	2007	57	56	98,2	--	--	--	--	56	98,2	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--		
Calil ¹⁴¹	2010	86	71	83,0	--	--	--	--	71	82,6	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--		
Furtado ¹⁴²	2010	47	21	44,7	--	--	--	--	18	66,7	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	3	15,0		
Ribeiro	2010	198	171	86,4	9	5,3	166	97,1	141	89,2	--	--	--	--	--	--	--	56	84,8	36	92,3	40	90,9	9	100,0	--	--	30	75,0	
Siegel ¹⁴³	2010	643	364	56,6	116	31,9	248	68,1	364	56,6	--	--	--	--	364	56,6	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--		
Fernandes ¹⁴⁴	2011	158	68	43,0	--	--	--	--	41	85,4	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	41	85,4	--	--	27	24,5		
Barros ¹⁴⁵	2012	131	113	86,3	--	--	--	--	113	86,3	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--		
Nomellini ¹⁴⁶	2012	81	15	18,5	--	--	--	--	15	18,5	15	18,5	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--		
Carestiati ¹⁴⁷	2013	141	88	62,4	7	8,0	69	78,4	86	76,1	--	--	--	--	21	60,0	37	75,5	--	--	--	--	--	28	96,6	--	--	2	7,1	
Fidelis ¹⁴⁸	2013	40	21	52,5	--	--	--	--	21	52,5	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--		
Oliveira ¹⁴⁹	2013	172	170	99,0	--	--	--	--	170	98,8	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	170	98,8	--	--	--		
Augusto ¹⁵⁰	2014	351	31	8,8	--	--	--	--	3	33,0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	27	8,0		
Krambeck ¹⁵¹	2014	97	29	29,9	16	55,2	10	34,5	10	40,0	--	--	--	--	--	--	--	2	22,2	6	46,2	2	66,7	--	--	--	10	17,5		
Magalhães ¹⁵²	2014	1006	324	32,2	--	--	--	--	65	50,8	30	37,5	--	--	35	72,9	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	229	25,7		
Nunes ¹⁵³	2014	97	78	80,4	--	--	--	--	78	80,4	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--		
Caixeta ¹⁵⁴	2015	251	111	44,2	99	89,2	12	10,8	15	62,5	6	50,0	1	100,0	5	71,4	3	100,0	--	--	--	--	--	--	--	0	0,0	96	42,3	
Peres ¹⁵⁵	2015	673	210	31,2	--	--	--	--	18	78,3	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	192	29,5		
Possati-Resende ¹⁵⁶	2016	201	99	49,3	--	--	--	--	99	49,3	26	27,1	--	--	73	69,7	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--		
Silveira ³³	2015	40	35	87,5	--	--	--	--	35	87,5	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--		
Wohlmeister ¹⁵⁸	2015	40	35	87,5	--	--	--	--	35	87,0	--	--	--	--	35	87,5	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--		
Batista ¹⁵⁹	2015	169	35	20,7	--	--	35	100,0	18	10,7	--	--	--	--	3	28,6	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	17	11,2		
Duarte ¹⁶⁰	2017	353	46	13,0	10	21,7	36	78,3	11	44,0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--		
Total		5804	2476	42,7	257	15,3	576	31,1	1655	65,9	89	27,3	1	20	615	58,9	76	66,7	58	72,5	42	76,4	42	75	257	95,5	0	0,0	694	21,7

Quando avaliado o risco relativo (OR), mulheres com infecção por HPV apresentam um risco cerca de seis vezes maior, em desenvolver algum tipo de alteração citopatológica, comparadas com mulheres que não apresentaram a infecção por HPV (OR: 5.853 $p=0.0001$) (figura 7).

Figura 7. Gráfico Forest Plot, comparação entre a infecção por HPV em mulheres com e sem alterações citológicas cervicais.



Conhecer a prevalência do HPV em uma determinada população é importante para planejar ações voltadas para a atenção básica à saúde, ou seja, rastrear e prevenir doenças associadas ao vírus, como verrugas genitais e câncer cervical. A associação do HPV com o câncer não restringe somente ao câncer cervical, mas inclui também cânceres anais, penianos, vulvares, vaginais, colorretais e orofaringe¹⁶¹.

X. Referencias

1. Beyazit F, Silan F, Gencer M, Aydin B, Paksoy B, Unsal MA, et al. The prevalence of human papillomavirus (HPV) genotypes detected by PCR in women with normal and abnormal cervico-vaginal cytology. *Ginekol Pol* [Internet]. 2018;89(2):62–7. Available from: https://journals.viamedica.pl/ginekologia_polska/article/view/56162
2. Zhang L, Bi Q, Deng H, Xu J, Chen J, Zhang M, et al. Human papillomavirus infections among women with cervical lesions and cervical cancer in Eastern China: Genotype-specific prevalence and attribution. *BMC Infect Dis*. 2017;17(1):1–9.
3. Mateos-Lindemann ML, Pérez-Castro S, Rodríguez-Iglesias M, Pérez-Gracia MT. Microbiological diagnosis of human papilloma virus infection. *Enfermedades Infecc y Microbiol Clin (English ed)* [Internet]. 2017;35(9):593–602. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2529993X1730240X>
4. Doorbar J. Model systems of human papillomavirus-associated disease. *J Pathol*. 2016;238(2):166–79.
5. Schiffman M, Doorbar J, Wentzensen N, Monk BJ, Stanley MA, Franceschi S. Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nat Rev*. 2016;2:1.
6. Doorbar J. Host control of human papillomavirus infection and disease. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* [Internet]. 2018;47:27–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2017.08.001>
7. World Health Organization. Introducing Hpv Vaccine Into National. *World Heal Organ* [Internet]. 2016;104. Available from: www.who.int/immunization/documents
8. Omland T, Lie KA, Akre H, Sandlie LE, Jebsen P, Sandvik L, et al. Recurrent respiratory papillomatosis: HPV genotypes and risk of high-grade laryngeal neoplasia. *PLoS One*. 2014;9(6):1–7.
9. Ministério da Saúde, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva - INCA. Incidência de Câncer no Brasil - Estimativa 2020. 2020. 1–122 p.

10. ICO/IACR - Information Centre on HPV and Cancer. Human Papillomavirus and Related Diseases Report [Internet]. 2019. Available from: <https://www.hpvcentre.net/statistics/reports/XWX.pdf>
11. Pourmohsen M, Simbar M, Nahidi F, Fakor F, Majd HA. HPV risk factors and prevention behaviours: A review. *J Clin Diagnostic Res*. 2018;12(12):LE01–5.
12. HPV Information Centre. Human Papillomavirus and Related Diseases Report - BRAZIL [Internet]. 2018. Available from: www.hpvcentre.com
13. Stanley C, Senter M, Chauvin S, Selk A. HPV vaccination in male physicians: A survey of gynecologists and otolaryngology surgeons' attitudes towards vaccination in themselves and their patients. *Papillomavirus Res* [Internet]. 2018;5(October 2017):89–95. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S240585211730071X>
14. de Sanjose S, Brotons M, LaMontagne DS, Bruni L. Human papillomavirus vaccine disease impact beyond expectations. *Curr Opin Virol* [Internet]. 2019;39:16–22. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2019.06.006>
15. de Sanjosé S, Brotons M, Pavón MA. The natural history of human papillomavirus infection. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2018;47:2–13.
16. Thorsteinsson K, Storgaard M, Katzenstein TL, Ladelund S, Rønsholt FF, Johansen IS, et al. Prevalence and distribution of cervical high-risk human papillomavirus and cytological abnormalities in women living with HIV in Denmark - the SHADE. *BMC Cancer* [Internet]. 2016;16(1):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-016-2881-1>
17. Schiffman M, Wentzensen N. Human papillomavirus (HPV) infection and the multi-stage carcinogenesis of cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2014;22(4):1–14. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3711590/pdf/nihms-449612.pdf>
18. Clifford G, Franceschi S, Diaz M, Muñoz N, Villa LL. Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine*. 2006;24(SUPPL. 3):26–34.
19. Figueiredo Alves RR, Turchi MD, Santos LE, De Britto Guimarães EM, Garcia MMD, Seixas MSC, et al. Prevalence, genotype profile and risk factors for multiple human papillomavirus cervical infection in unimmunized female adolescents in Goiânia, Brazil: A community-based study. *BMC Public Health*.

- 2013;13(1).
20. Ribeiro AA, Costa MC, Alves RRF, Villa LL, Saddi VA, Carneiro MADS, et al. HPV infection and cervical neoplasia: Associated risk factors. *Infect Agent Cancer* [Internet]. 2015;10(1):1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13027-015-0011-3>
 21. Associação Hospitalar Moinhos de Vento e Ministerio da Saúde. Estudo epidemiológico sobre a prevalência nacional de infecção pelo hpv. 2017. 120 p.
 22. Shepherd JP, Frampton GK, Harris P. Europe PMC Funders Group Interventions for encouraging sexual behaviours intended to prevent cervical cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;1(3):1–185.
 23. Markowitz LE, Dunne EF, Saraiya M, Chesson HW, Curtis CR, Gee J, et al. Human papillomavirus vaccination: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm reports Morb Mortal Wkly report Recomm reports* [Internet]. 2014;63(RR-05):1–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25167164>
 24. Sheaves C. Evaluating changes in knowledge, beliefs, and behaviors associated with HPV following an educational intervention among women. *Diss Abstr Int Sect B Sci Eng* [Internet]. 2016;76(12-B(E)):No-Specified. Available from: http://gateway.proquest.com/openurl?url_ver=Z39.88-2004&rft_val_fmt=info:ofi/fmt:kev:mtx:dissertation&res_dat=xri:pqm&rft_dat=xri:pqdiss:3718561%5Cnhttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=psyc12&NEWS=N&AN=2016-21252-014
 25. Zhang R, Shi TY, Ren Y, Lu H, Wei ZH, Hou WJ, et al. Risk factors for human papillomavirus infection in Shanghai suburbs: A population-based study with 10,000 women. *J Clin Virol* [Internet]. 2013;58(1):144–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2013.06.012>
 26. Wilson KL, Cowart CJ, Rosen BL, Pulczinski JC, Solari KD, Ory MG, et al. Characteristics Associated with HPV Diagnosis and Perceived Risk for Cervical Cancer Among Unmarried, Sexually Active College Women. *J Cancer Educ*. 2018;33(2):404–16.
 27. Shafaghi B, Jarollahi A, Yousefzadeh B, Ameri A, Moghadam S, Mostafavi M. Human Papilloma Virus Prevalence and Types among Iranian Women Attending Regular Gynecological visits. *Reports Radiother Oncol*. 2013;1(2):73–9.

28. Shahramian I, Heidari Z, Mahmoudzadeh-Sagheb HR, Moradi A, Forghani F. Prevalence of HPV infection and high risk HPV genotypes (16, 18), among monogamous and polygamous women, in Zabol, Iran. *Iran J Public Health*. 2011;40(3):113–21.
29. Bacopoulou F, Karakitsos P, Kottaridi C, Stefanaki C, Deligeoroglou E, Theodoridou K, et al. Genital HPV in Children and Adolescents: Does Sexual Activity Make a Difference? *J Pediatr Adolesc Gynecol* [Internet]. 2016;29(3):228–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpag.2015.08.010>
30. Manga MM, Fowotade A, Abdullahi YM, El-Nafaty AU, Adamu DB, Pindiga HU, et al. Epidemiological patterns of cervical human papillomavirus infection among women presenting for cervical cancer screening in North-Eastern Nigeria. *Infect Agent Cancer* [Internet]. 2015;10(1):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13027-015-0035-8>
31. Garg A, Suri V, Nijhawan R, Aggarwal N, Aggarwal R, Guleria C, et al. Prevalence of human Papilloma virus infection in young primiparous women during postpartum period: Study from a tertiary care center in northern India. *J Clin Diagnostic Res*. 2016;10(10):QC06–9.
32. Ghedira R, Mahfoudh W, Hadhri S, Gabbouj S, Bouanene I, Khairi H, et al. Human papillomavirus genotypes and HPV-16 variants distribution among Tunisian women with normal cytology and squamous intraepithelial lesions. *Infect Agent Cancer* [Internet]. 2016;11(1):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13027-016-0109-2>
33. Strohl AE, Mendoza G, GHANT MS, Cameron KA, Simon MA, Schink JC, et al. Barriers to prevention: knowledge of HPV, cervical cancer, and HPV vaccinations among african american women. *Physiol Behav*. 2017;176(3):139–48.
34. Río-Ospina L Del, León SCS De, Camargo M, Sánchez R, Mancilla CL, Patarroyo ME, et al. The prevalence of high-risk HPV types and factors determining infection in female colombian adolescents. *PLoS One*. 2016;11(11):1–15.
35. Siddharthar J, Rajkumar B, Deivasigamani K. Knowledge awareness and prevention of cervical cancer among women attending a tertiary care hospital in Puducherry, India. *J Clin Diagnostic Res*. 2014;8(6):8–10.
36. Ebu NI, Mupepi SC, Siakwa MP, Sampsellem CM. Knowledge, practice, and barriers toward cervical cancer screening in Elmina, Southern Ghana. *Int J*

Womens Health. 2014;7:31–9.

37. Östensson E, Alder S, Elfström KM, Sundström K, Zethraeus N, Arbyn M, et al. Barriers to and facilitators of compliance with clinic-based cervical cancer screening: Population-based cohort study of women aged 23-60 years. *PLoS One*. 2015;10(5):1–19.
38. Marek E, Dergez T, Rebek-Nagy G, Szilard I, Kiss I, Ember I, et al. Effect of an educational intervention on Hungarian adolescents' awareness, beliefs and attitudes on the prevention of cervical cancer. *Vaccine* [Internet]. 2012;30(48):6824–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.09.012>
39. Fort VK, Makin MS, Siegler AJ, Ault K, Roach R. Barriers to cervical cancer screening in Mulanje, Malawi: A qualitative study. *Patient Prefer Adherence*. 2011;5:125–31.
40. de Araújo LA, De Paula AAP, da Silva Cintra de Paula H, Porto Ramos JE, de Oliveira BR, De Carvalho KPA, et al. Human papillomavirus (HPV) genotype distribution in penile carcinoma: Association with clinic pathological factors. *PLoS One*. 2018;13(6):1–15.
41. Rodríguez-álvarez MI, Gómez-Urquiza JL, Husein-El Ahmed H, Albendín-García L, Gómez-Salgado J, Cañadas-De la Fuente GA. Prevalence and risk factors of human papillomavirus in male patients: A systematic review and meta-analysis. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15(10).
42. Koliopoulos G, Vn N, Santesso N, Bryant A, Ppl M, Ra M, et al. Cytology versus HPV testing for cervical cancer screening in the general population (Review). *Cochrane Collab*. 2018;(8):1–122.
43. Papanicolaou GN, Traut HF. VAGINAL SMEARS IN CARCINOMA OF UTERUS. *Arch Pat hol lab*. 1944;121(3):1.
44. Wilson JMG JG. Principles and Practice of Screening for Disease. WHO Public Paper 34. In: Geneva: World Health Bibliography Organization [Internet]. 1968. p. 168. Available from: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/37650/WHO_PHP_34.pdf?sequence=17&isAllowed=y<https://apps.who.int/iris/handle/10665/37650>https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/37650/WHO_PHP_34.pdf?sequence=17&isAllowed=y

45. De Oliveira GG, De Oliveira JMDSC, Eleutério RMN, Barbosa RDCC, De Almeida PRC, Eleutério J. Atypical squamous cells: Cytopathological findings and correlation with HPV genotype and histopathology. *Acta Cytol.* 2018;62(5–6):386–92.
46. Jahic M, Jahic E. Diagnostic Approach to Patients with Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance Cytologic Findings on Cervix. *Med Arch (Sarajevo, Bosnia Herzegovina).* 2016;70(4):296–8.
47. Schiffman M, Vaughan L, Raine-Bennett TR, Castle PE, Katki HA, Gage JC, et al. A study of HPV typing for the management of HPV-Positive ASC-US cervical cytologic results. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2015;39(1):9–19.
48. Watson M, Benard V, Lin L. Provider management of equivocal cervical cancer screening results among underserved women, 2009-2011: follow-up atypical squamous cells of undetermined significance. *Physiol Behav.* 2017;176(3):139–48.
49. World Health Organization - WHO, Cancer IAFR on. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans VOLUME 90 Human Papillomaviruses. Vol. 80, International Agency for Research on Cancer. 2007. 1–689 p.
50. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJLM, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol [Internet].* 2002;55(4):244–65. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L34293391>
51. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet.* 2014;117(1):363–8.
52. Arbyn M, Anttila A, Jordan J, Ronco G, Schenck U, Segnan N, et al. European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. Second edition-summary document. *Ann Oncol.* 2010;21(3):448–58.
53. Breitenecker G, Dinges HP, Regitnig P, Wiener H, Vutuc C. Cytopathology in Austria. *Cytopathology.* 2004;15(2):113–8.
54. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci.* 2006;541:525–41.

55. Scince photo library. Vírus do papiloma humano, ilustração [Internet]. Scince photo library. [cited 2019 Oct 24]. Available from: <https://www.sciencephoto.com/media/666983/view/human-papilloma-virus-illustration>

56. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, Hausen H zur, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* [Internet]. 2010;401(1):70–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2010.02.002>

57. Villiers E-M de, Fauquet C, Broker TR, Bernard H-U, Hausen H Zur. Classification of Papillomaviruses Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2017;324(July 2004):17–27.

58. Bzhalava D, Eklund C, Dillner J. International standardization and classification of human papillomavirus types. *Virology* [Internet]. 2015;476:341–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2014.12.028>

59. Chen AA, Gheit T, Franceschi S, Tommasino M, Clifford GM. Human Papillomavirus 18 Genetic Variation and Cervical Cancer Risk Worldwide. *J Virol*. 2015;89(20):10680–7.

60. Bzhalava D, Eklund C, Dillner J. International standardization and classification of human papillomavirus types. *Virology* [Internet]. 2015;476:341–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2014.12.028>

61. Harari A, Chen Z, Burk RD, Health P. HPV Genomics: Past, Present and Future. *Curr Probl Dermatol* [Internet]. 2014;45(718):1–18. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4430864/pdf/nihms-687636.pdf>

62. Egawa N, Doorbar J. The low-risk papillomaviruses. *Virus Res* [Internet]. 2017;231:119–27. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.12.017>

63. Roden RBS, Stern PL. Opportunities and challenges for human papillomavirus vaccination in cancer. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2018;18(4):240–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2018.13>

64. Stanley MA. Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. *Clin Microbiol Rev*. 2012;25(2):215–22.

65. Yeo-teh NSL, Ito Y, Jha S. High-Risk Human Papillomaviral Oncogenes E6 and

- E7 Target Key Cellular Pathways to Achieve Oncogenesis. *Int J Mol Sci.* 2018;19(1706).
66. Yim E-K, Park J-S. The Role of HPV E6 and E7 Oncoproteins in HPV-associated Cervical Carcinogenesis. *Cancer Res Treat.* 2005;37(6):319.
 67. Tchurikov NA. Molecular Mechanisms of Epigenetics Molecular Mechanisms of Epigenetics. *Biochem.* 2005;70(4):493–513.
 68. Jiménez-wences H, Peralta-zaragoza O, Fernández-tilapa G. Human papilloma virus , DNA methylation and microRNA expression in cervical cancer (Review). *Oncol Rep.* 2014;31:2467–76.
 69. Poreba E, Broniarczyk JK, Gozdicka-jozefiak A. Epigenetic mechanisms in virus-induced tumorigenesis. *Clin Epigenet.* 2011;2:233–47.
 70. Soto D, Song C, E M, McLaughlin-Drubin. Epigenetic Alterations in Human. *Viruses.* 2017;9(248):1–18.
 71. Clarke MA, Wentzensen N, Mirabello L, Ghosh A, Wacholder S, Harari A, et al. Human Papillomavirus DNA Methylation as a Potential Biomarker for Cervical Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2012;21(12):2125–38.
 72. Yang H-J. Aberrant DNA methylation in cervical carcinogenesis. *Chin J Cancer.* 2013;32(1):42–8.
 73. Sen S, Mandal P, Bhattacharya A, Kundu S, Chowdhury RR, Mondal NR, et al. Impact of viral and host DNA methylations on HPV16-related cervical cancer pathogenesis. *Tumor Biol.* 2017;39(5):1–13.
 74. Sen P, Ganguly P, Ganguly N. Modulation of DNA methylation by human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins in cervical cancer (Review). *Oncol Lett.* 2018;15(1):11–22.
 75. Zheng Z-M, Wang X. Regulation of cellular miRNA expression by human papillomaviruses. *Biochim Biophys Acta [Internet].* 2008;23(1):1–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
 76. Wang X, Meyers C, Guo M, Zheng Z-M. Up-Regulation of p18Ink4c Expression by Oncogenic HPV E6 via p53-miR-34a Pathway. *Int J Cancer [Internet].*

2011;129(6):1362–72. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>

77. Pedroza-Torres A, López-Urrutia E, García-Castillo V, Jacobo-Herrera N, Herrera LA, Peralta-Zaragoza O, et al. MicroRNAs in cervical cancer: Evidences for a miRNA profile deregulated by HPV and its impact on radio-resistance. *Molecules*. 2014;19(5):6263–81.
78. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9(AUG):1–12.
79. Leva G Di, Croce CM. Roles of small RNAs in tumor formation. *Trends Mol Med* [Internet]. 2010;16(6):257–67. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>
80. Farazi TA, Spitzer JI, Morozov P, Tuschl T. miRNAs in human cancer. *Journal of Pathology*. 2011;223(2):102–15.
81. He L, He X, Lim LP, Srivastava D, Xuan Z, Liang Y, et al. A microRNA component of the p53 tumor suppressor network. *Blackwell Companion to Christ Spirituality*. 2007;447(7148):478–95.
82. Chang T-C, Wentzel EA, Kent OA, Ramachandran K, Mullendore M, Lee KH, et al. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol Cell* [Internet]. 2007;23(1):1–7. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2688697/pdf/nihms-110443.pdf>
83. Raver-Shapira N, Marciano E, Meiri E, Spector Y, Rosenfeld N, Moskovits N, et al. Transcriptional Activation of miR-34a Contributes to p53-Mediated Apoptosis. *Mol Cell*. 2007;26(5):731–43.
84. Chen J. Signaling pathways in HPV-associated cancers and therapeutic implications. *Rev Med Virol*. 2015;25(1):57–64.
85. Gupta S, Kumar P, Das BC. HPV: Molecular pathways and targets. *Curr Probl Cancer*. 2018;42(2):161–74.
86. Gradissimo A, Burk RD. Molecular tests potentially improving HPV screening and genotyping for cervical cancer prevention. *Expert Rev Mol Diagn*. 2017;17(4):379–91.

87. Tsakogiannis D, Gartzonika C, Levidiotou-Stefanou S, Markoulatos P. Molecular approaches for HPV genotyping and HPV-DNA physical status. *Expert Rev Mol Med.* 2017;19(1):1–20.
88. Burd EM. Human Papillomavirus Laboratory Testing : the Changing Paradigm. *Am J Clin Pathol.* 2016;29(2):291–319.
89. Wright TC, Schiffman M, Solomon D, Cox JT, Garcia F, Goldie S, et al. Interim guidance for the use of human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cervical cytology for screening. *Obstet Gynecol.* 2004;103(2):304–9.
90. Cabral LG, Barbosa AMRB. A indicação de captura de híbridos II e da reação da infecção por HPV. *Faculdades Metropolitanas Unidas (FMU).* :1–12.
91. Depuydt CE, Jonckheere J, Berth M, Salembier GM, Vereecken AJ, Bogers JJ. Serial type-specific human papillomavirus (HPV) load measurement allows differentiation between regressing cervical lesions and serial virion productive transient infections. *Cancer Med.* 2015;4(8):1294–302.
92. Heideman DAM, Hesselink AT, Berkhof J, Van Kemenade F, Melchers WJG, Daalmeijer NF, et al. Clinical validation of the cobas 4800 HPV test for cervical screening purposes. *J Clin Microbiol.* 2011;49(11):3983–5.
93. Boulet GAV, Micalessi IM, Horvath CAJ, Benoy IH, Depuydt CE, Bogers JJ. Nucleic acid sequence-based amplification assay for human papillomavirus mRNA detection and typing: Evidence for DNA amplification. *J Clin Microbiol.* 2010;48(7):2524–9.
94. Dockter J, Schroder A, Hill C, Guzinski L, Monsonogo J, Giachetti C. Clinical performance of the APTIMA® HPV Assay for the detection of high-risk HPV and high-grade cervical lesions. *J Clin Virol [Internet].* 2009;45(1):S55–61. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1386-6532\(09\)70009-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1386-6532(09)70009-5)
95. Szarewski A. HPV vaccination and cervical cancer. *Curr Oncol Rep.* 2012;14(6):559–67.
96. Nolte FS, Ribeiro-Nesbitt DG. Comparison of the aptima and cervista tests for detection of high-risk human papillomavirus in cervical cytology specimens. *Am J Clin Pathol.* 2014;142(4):561–6.
97. Benoy I, Xu L, Vanden Broeck D, Poljak M, Oštrbenk Valenčak A, Arbyn M, et

- al. Using the VALGENT-3 framework to assess the clinical and analytical performance of the RIATOL qPCR HPV genotyping assay. *J Clin Virol*. 2019;120:57–62.
98. Tatsas AD, Phelan DF, Gravitt PE, Boitnott JK, Clark DP. Practice patterns in cervical cancer screening and human papillomavirus testing. *Am J Clin Pathol*. 2012;138(2):223–9.
99. Naryshkin S, Marshall Austin R. Limitations of widely used high-risk human papillomavirus laboratory-developed testing in cervical cancer screening. *Drug Healthc Patient Saf*. 2012;4(1):167–72.
100. World Health Organization. The Immunological Basis for Immunization Series. *The Immunological Basis for Immunization Series*. World Heal Organ. 2011;
101. Graham JE, Mishra A. Global challenges of implementing human papillomavirus vaccines. *Int J Equity Health* [Internet]. 2011;10(1):27. Available from: <http://www.equityhealthj.com/content/10/1/27>
102. Toh ZQ, Kosasih J, Russell FM, Garland SM, Mulholland EK, Licciardi P V. <p>Recombinant human papillomavirus nonavalent vaccine in the prevention of cancers caused by human papillomavirus</p>. *Infect Drug Resist*. 2019;Volume 12:1951–67.
103. Van Den Bergh JMJ, Guerti K, Willemen Y, Lion E, Cools N, Goossens H, et al. HPV vaccine stimulates cytotoxic activity of killer dendritic cells and natural killer cells against HPV-positive tumour cells. *J Cell Mol Med*. 2014;18(7):1372–80.
104. Didierlaurent AM, Morel S, Lockman L, Giannini SL, Bisteau M, Carlsen H, et al. AS04, an Aluminum Salt- and TLR4 Agonist-Based Adjuvant System, Induces a Transient Localized Innate Immune Response Leading to Enhanced Adaptive Immunity. *J Immunol*. 2009;183(10):6186–97.
105. Garçon N, Morel S, Didierlaurent A, Descamps D, Wettendorff M, Van Mechelen M. Development of an AS04-adjuvanted HPV vaccine with the adjuvant system approach. *BioDrugs*. 2011;25(4):217–26.
106. Schiller JT, Day PM, Kines RC. Current understanding of the mechanism of HPV infection. *Gynecol Oncol*. 2010;118(1 SUPPL. 1):1–13.

107. Einstein MH, Baron M, Levin MJ, Chatterjee A, Fox B, Scholar S, et al. Comparison of the immunogenicity of the human papillomavirus (HPV) -16 / 18 vaccine and the non-vaccine types HPV-31 and HPV-45 in healthy women aged 18 – 45 years. *Hum Vaccin*. 2011;(December):1359–73.
108. Kemp TL, Safaeian M, Hildesheim A, Pan Y, Penrose KJ, Porras C, et al. Kinetic and HPV infection effects on cross-type neutralizing antibody and avidity responses induced by Cervarix. *Vaccine*. 2012;31(1):165–70.
109. Ismaili J, Rennesson J, Aksoy E, Vekemans J, Vincart B, Amraoui Z, et al. Monophosphoryl Lipid A Activates Both Human Dendritic Cells and T Cells. *J Immunol*. 2002;168(2):926–32.
110. Bedeutung D, Screening DH. Importance of HPV Genotyping for the Screening , Therapy and Management of Cervical Neoplasias. 2012;507–12.
111. Yeo M, Lee A. Clinical Significance of an HPV DNA Chip Test with Emphasis on HPV-16 and / or HPV-18 Detection in Korean Gynecological Patients. 2016;294–9.
112. Drolet M, Bénard É, Pérez N, Brisson M, Ali H, Boily M-C, et al. Population-level impact and herd effects following the introduction of human papillomavirus vaccination programmes: updated systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2019;394(10197):497–509.
113. Bruni L, Diaz M, Barrionuevo-Rosas L, Herrero R, Bray F, Bosch FX, et al. Global estimates of human papillomavirus vaccination coverage by region and income level: A pooled analysis. *Lancet Glob Heal*. 2016;4(7):e453–63.
114. LaMontagne DS, Bloem PJN, Brotherton JML, Gallagher KE, Badiane O, Ndiaye C. Progress in HPV vaccination in low- and lower-middle-income countries. *Int J Gynecol Obstet*. 2017;138:7–14.
115. Barcelos MRB, De Vargas PRM, Baroni C, Miranda AE. Infecções genitais em mulheres atendidas em Unidade Básica de Saúde: Prevalência e fatores de risco. *Rev Bras Ginecol e Obstet*. 2008;30(7):349–54.
116. (INCa/MS) IN de C da S. Nomenclatura Brasileira para laudos cervicais e condutas preconizadas: Recomendações para profissionais de saúde. *J Bras Patol e Med Lab*. 2006;42(5):351–73.

117. World Health Organization. Human papillomavirus laboratory manual Human papillomavirus laboratory manual First edition , 2009. Vol. 1, WHO Press. 2009. 1–124 p.
118. Hermansson RS, Olovsson M, Hoxell E, Lindström AK. HPV prevalence and HPV-related dysplasia in elderly women. *PLoS One*. 2018;13(1):1–9.
119. Lindau ST, Drum ML, Gaumer E, Surawska H, Jordan JA. Prevalence of high-risk human papillomavirus among older women. *Obstet Gynecol*. 2008;112(5):979–89.
120. Burchell AN, Winer RL, de Sanjosé S, Franco EL. Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine*. 2006;24(SUPPL. 3):52–61.
121. Castle PE, Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A, Rodriguez AC, Bratti MC, et al. A Prospective Study of Age Trends in Cervical Human Papillomavirus Acquisition and Persistence in Guanacaste, Costa Rica. *J Infect Dis*. 2005;191(11):1808–16.
122. Augusto EF, Santos LS dos, Oliveria L do H dos S. Detecção do papilomavírus humano em citologias cervicais de mulheres atendidas no Programa Saúde da Família. *Rev Lat Am Enfermagem*. 2014;22(1):100–7.
123. Woodman CBJ, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: Unresolved issues. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(1):11–22.
124. Zeferino LC, Bastos JB, Vale DBAP do, Zanine RM, Melo YLMF de, Primo WQSP, et al. Guidelines for HPV-DNA Testing for Cervical Cancer Screening in Brazil Recomendações para o uso de testes de DNA-HPV no rastreamento do câncer do colo útero no Brasil. *Rev Bras Ginecol e Obstet*. 2018;40:360–8.
125. Marks M, Gravitt PE, Gupta SB, Liaw KL, Kim E, Tadesse A, et al. The association of hormonal contraceptive use and HPV prevalence. *Int J Cancer*. 2011;128(12):2962–70.
126. Ojiyi E, Dike I, Okeudo C, Ejikem C, Nzewuihe A, Agbata A. Local risk factors in genital human papilloma Virus Infection in cervical smears. *Ann Med Health Sci Res*. 2013;3(4):529.
127. Schabath M, Thompson Z, Egan K, Torres N, Nguyen A, Papenfuss M, et al.

- Alcohol consumption and prevalence of HPV infection among US men in HIM 9HPV in Men) Study. *Sex Transm Infect.* 2017;32(7):736–40.
128. Szabo G. Alcohol's contribution to compromised immunity. *Alcohol Res Heal.* 1997;21(1):30–8.
 129. Cook RT. Alcohol abuse, alcoholism, and damage to the immune system - A review. *Alcohol Clin Exp Res.* 1998;22(9):1927–42.
 130. Díaz LE, Montero A, González-Gross M, Vallejo AI, Romeo J, Marcos A. Influence of alcohol consumption on immunological status: A review. *Eur J Clin Nutr.* 2002;56(3):S50–3.
 131. Appleby P, Beral V, Colin D, Franceschi S, Goodhill O, Greem J, et al. Cervical cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data for 16 573 women with cervical cancer and 35 509 women without cervical cancer from 24 epidemiological studies. *Lancet.* 2007;370(9599):1609–21.
 132. Smith JS, Green J, Berrington De Gonzalez A, Appleby P, Peto J, Plummer M, et al. Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: A systematic review. *Lancet.* 2003;361(9364):1159–67.
 133. Wright TC, Parvu V, Stoler MH, Kodsi S, Eckert K, Yanson K, et al. HPV infections and cytologic abnormalities in vaccinated women 21–34 years of age: Results from the baseline phase of the Onclarity trial. *Gynecol Oncol [Internet].* 2019;153(2):259–65. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2019.02.016>
 134. John TJ, Samuel R. Herd immunity and herd effect: New insights and definitions. *Eur J Epidemiol.* 2000;16(7):601–6.
 135. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, Group TP. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses : The PRISMA Statement. *Plos Med.* 2009;6(7):1–6.
 136. Rabelo-Santos SH, Zeferino L, Villa LL, Sobrinho JP, Amaral RG, Magalhães A V. Human Papillomavirus Prevalence among Women with Cervical Intraepithelial Neoplasia III and Invasive Cervical Cancer from Goiânia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003;98(2):181–4.
 137. Coelho FRG, Prado JCM, Pereira Sobrinho JS, Hamada G, Landman G, Pinto C

- a, et al. Estrogen and progesterone receptors in human papilloma virus-related cervical neoplasia. *Braz J Med Biol Res* [Internet]. 2004;37(1):83–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14689048>
138. Rabelo-Santos SH, Levi JE, Derchain SFM, Sarian LOZ, Zeferino LC, Messias S, et al. DNA recovery from Hybrid Capture II samples stored in specimen transport medium with denaturing reagent, for the detection of human papillomavirus by PCR. *J Virol Methods*. 2005;126(1–2):197–201.
 139. de Paula FDF, Fernandes AP, Carmo BB do, Vieira DCD, Dutra MS, Santos CGM dos, et al. Molecular detection of Chlamydia trachomatis and HPV infections in cervical samples with normal and abnormal cytopathological findings. *Diagn Cytopathol* [Internet]. 2007 Apr;35(4):198–202. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17351932>
 140. Campos EA, Simões JA, Rabelo-Santos SH, Sarian LO, Pitta DR, Levi JE, et al. Recovery of DNA for the detection and genotyping of human papillomavirus from clinical cervical specimens stored for up to 2 years in a universal collection medium with denaturing reagent. *J Virol Methods*. 2008;147(2):333–7.
 141. Calil LN, Igansi CN, Meurer L, Edelweiss MIA, Bozzetti MC. Chlamydia trachomatis and human papillomavirus coinfection: Association with p16INK4a and Ki67 expression in biopsies of patients with preneoplastic and neoplastic lesions. *Brazilian J Infect Dis* [Internet]. 2011;15(2):126–31. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1413-8670\(11\)70157-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1413-8670(11)70157-X)
 142. Furtado YL, Almeida G, Lattario F, Silva KS, Maldonado P, Silveira FA, et al. The presence of methylation of the p16INK4A gene and human papillomavirus in high-grade cervical squamous intraepithelial lesions. *Diagn Mol Pathol*. 2010;19(90):15–9.
 143. Siegel EM, Salemi JL, Craft NE, Villa LL, Ferenczy AS, Franco EL, et al. No association between endogenous retinoic acid and human papillomavirus clearance or incident cervical lesions in Brazilian women. *Cancer Prev Res (Phila)* [Internet]. 2010 Aug;3(8):1007–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20606041>
 144. Fernandes JV, Meissner RDV, Carvalho MGF, Fernandes TAADM, Azevedo PRM, De Azevedo JWV, et al. Human papillomavirus prevalence in women with normal cytology and with cervical cancer in Natal, Brazil. *Mol Med Rep*. 2011;4(6):1321–6.
 145. da Silva Barros NK, Costa MC, Alves RRF, Villa LL, Derchain SFM, Zeferino

- LC, et al. Association of HPV infection and Chlamydia trachomatis seropositivity in cases of cervical neoplasia in Midwest Brazil. *J Med Virol* [Internet]. 2012 Jul;84(7):1143–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22585734>
146. Nomelini RS, Guimarães PDN, Candido PA, Campos ACC, Michelin MA, Murta EFC. Prevention of cervical cancer in women with ASCUS in the Brazilian Unified National Health System: cost-effectiveness of the molecular biology method for HPV detection. *Cad Saude Publica* [Internet]. 2012;28(11):2043–52. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2012001100004&lng=en&tlng=en
 147. Carestiato FN, Afonso LA, Moysés N, Almeida-Filho GL, Velarde LGC, Cavalcanti SMB. Padrão de metilação do gene P16INK4A e de infecções por HPV de alto risco acompanham a evolução de lesões cervicais. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2013;55(5):329–34.
 148. Fidelis AC, Dutra RF, Souza PRE, de Melo CP, Maia MMD. A Simple HPV 18 Detection Method Based on Ultra Specific Primer Immobilized on Glass Slides. *J Clin Lab Anal*. 2013;27(2):143–7.
 149. de Oliveira CM, Fregnani JHTG, Carvalho JP, Longatto-Filho A, Levi JE. Human papillomavirus genotypes distribution in 175 invasive cervical cancer cases from Brazil . *BMC Cancer* [Internet]. 2013;13. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/13/357%5Cnhttp://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L52699580> <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-13-357>
 150. Augusto EF, Santos LS dos, Oliveira L do H dos S. Human papillomavirus detection in cervical scrapes from women attended in the Family Health Program. *Rev Lat Am Enfermagem* [Internet]. 2014;22(1):100–7. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-11692014000100100&lng=en&tlng=en
 151. Krambeck WM, Cadidé RM, Dalmarco EM, De Cordova CMM. HPV detection and genotyping as an earlier approach in cervical cancer screening of the female genital tract. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 2008;35(3):175–8.
 152. Magalhães PAF, Miranda CAN, Lima ÉG, Moizéis RNC, de Lima DBS, Cobucci RNO, et al. Genital tract infection with Chlamydia trachomatis in women attended at a cervical cancer screening program in Northeastern from Brazil. *Arch Gynecol Obstet*. 2015;291(5):1095–102.

153. Nunes JDC, Vidal FCB, Ferraro CTL, Chein MBC, Brito LMO, Monteiro SCM. Molecular detection of human papillomavirus in Brazilian women with cervical intraepithelial neoplasia in a northeast Brazilian city. *Genet Mol Res.* 2014;13(4):9077–85.
154. Caixeta RCA, Ribeiro AA, Segatti KD, Saddi VA, Figueiredo Alves RR, dos Santos Carneiro MA, et al. Association between the human papillomavirus, bacterial vaginosis and cervicitis and the detection of abnormalities in cervical smears from teenage girls and young women. *Diagn Cytopathol [Internet]*. 2015 Oct;43(10):780–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26173042>
155. Peres AL, Camarotti JRSL, Cartaxo M, Alencar N, Stocco RC, Beçak W, et al. Molecular analysis and conventional cytology: Association between HPV and bacterial vaginosis in the cervical abnormalities of a Brazilian population. *Genet Mol Res.* 2015;14(3):9497–505.
156. Possati-Resende JC, Fregnani JHTG, Kerr LM, Mauad EC, Longatto-Filho A, Scapulatempo-Neto C. The Accuracy of p16/Ki-67 and HPV Test in the Detection of CIN2/3 in Women Diagnosed with ASC-US or LSIL. *PLoS One [Internet]*. 2015;10(7):e0134445. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26230097>
157. Silveira FA, Almeida G, Furtado Y, Silva KS, Maldonado P, Cavalcanti S, et al. HPV DNA genotyping and methylation of gene p16^{INK4A} in cervical LSIL. *Exp Mol Pathol [Internet]*. 2015;98(2):308–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2015.01.007>
158. Wohlmeister D, Vianna DRB, Helfer VE, Gimenes F, Consolaro MEL, Barcellos RB, et al. Association of human papillomavirus and Chlamydia trachomatis with intraepithelial alterations in cervix samples. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2016;111(2):106–13.
159. Batista JE, Saddi VA, Carvalho KPA de, Ribeiro AA, Segati KD, Carneiro MA dos S, et al. Human papillomavirus genotypes 68 and 58 are the most prevalent genotypes in women from quilombo communities in the state of Maranhão, Brazil. *Int J Infect Dis.* 2017;55:51–5.
160. Duarte D, Vieira R, Brito E, Pinheiro M, Monteiro J, Valente M, et al. Prevalence of Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer Screening among Riverside Women of the Brazilian Amazon. *Rev Bras Ginecol e Obs / RBGO Gynecol Obstet [Internet]*. 2017;39(07):350–7. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0037-1604027>

161. Sanjosé S De, Brotons M, Pavon MA. The natural history of human papillomavirus infection. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* [Internet]. 2018;(47):2–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2017.08.015>

Apêndice A

QUESTIONÁRIO

Dados pessoais		
Data da entrevista:	/ /201	
Nome da paciente:		
Número de identificação:		
Data de nascimento:		
Idade:		
Cidade de procedência:		
Endereço:		
Telefone:		
Escolaridade		
1	Analfabeta	
2	Nível fundamental incompleto	
3	Nível fundamental completo	
4	Nível médio incompleto	
5	Nível médio completo	
6	Nível superior incompleto	
7	Nível superior completo	
Profissão :		
Situação Funcional		
1	Autônomo	
2	Empregado	
3	Benefício Previdenciário	
4	Desempregado	
Renda		
1	Sem renda	
2	Renda mensal menor de um salário mínimo ou menor	
3	Renda mensal de um a dois salários mínimos	
4	Renda mensal maior que dois salários mínimos	
Hábitos		
Tabagismo (Fuma)	1. Sim ()	2. Não ()
Uso de bebida alcóolica (Bebe)	1. Sim ()	2. Não ()
Pratica Exercício Físico	1. Sim ()	2. Não ()
Estado civil		
1. Casada ()		
2. Solteira ()		
3. Vive junto ()		
4. Viuva ()		
5. Outros ()		

Idade do início da atividade sexual:	Anos:		
Gesta:	Nº:		
Para:	Nº:		
Aborto:	Nº:		
Vida sexual ativa atualmente:	1. Sim ()	2. Não ()	
Método contraceptivo em uso:	1. Sim ()	2. Não ()	
Utiliza preservativo durante as relações sexuais (vaginal ou anal)	1. Sempre ()	2. As vezes ()	3. Nunca ()
Número de parceiros sexuais			
Tempo de relacionamento com o último parceiro:	1. Meses ()	2. Anos ()	
Higiene vaginal e anal antes e após o ato sexual:	1. Sim ()	2. Não ()	
Uso de duchas vaginais:	1. Sim ()	2. Não ()	
Há quanto tempo fez o último exame preventivo ?	1. Um ano ()	2. > 1 ano ()	
Sintomas			
1	Queixa de secreção vaginal anormal	1. Sim ()	2. Não ()
2	Odor fétido (peixe podre):	1. Sim ()	2. Não ()
3	Prurido:	1. Sim ()	2. Não ()
4	Ardor:	1. Sim ()	2. Não ()
5	Dor durante a relação sexual?	1. Sim ()	2. Não ()
Uso de antibióticos oral ou tópico nos últimos 15 dias?		1. Sim ()	2. Não ()
Histórico familiar de alguma neoplasia?		1. Sim ()	2. Não ()
Antecedentes patológicos (citar):			
Exame especular			
Sinais clínicos sugestivos de:			
1	Secreção vaginal normal:	1. Sim ()	2. Não ()
2	Vaginose bacteriana:	1. Sim ()	2. Não ()
3	Candidíase:	1. Sim ()	2. Não ()
4	Tricomoníase:	1. Sim ()	2. Não ()

Resultados Laboratoriais			
Exame a fresco			
1	Flora Vaginal (normal)	1. Sim ()	2. Não ()
2	Flora Vaginal Intermediaria	1. Sim ()	2. Não ()
3	Vaginose Bacteriana	1. Sim ()	2. Não ()
5	Candidíase:	1. Sim ()	2. Não ()
6	Tricomoniase:	1. Sim ()	2. Não ()
Crítérios de Amsel			
pH		1. >4,5 ()	2. <4,5()
Whiff		1. Positivo ()	2. Negativo ()
Carct. Secreção		1. Normal ()	2. VB ()
		3. TV ()	4.Candidíase ()
Sintomatologia		1. Normal ()	2. VB ()
		3. TV ()	4. Candidíase ()
Bacterioscopia corada pelo Gram – Crítérios de Nugent			
Score	Lactobacillus	Gardnerella and Bacteriodes	
0	4+	0	
1	3+	1+	
2	2+	2+	
3	1+	3+	
4	0	4+	
Crítérios por Ison e Hay			
Grau I	Predomínio de Lactobacillus (normal)		
Grau II	Quantidade semelhante de cocos e lactobacillus		
Grau III	Predomínio cocobacilos curtos		
Exame Citológico			

1	Flora Vaginal normal:	1. Sim ()	2. Não ()
2	Flora Vaginal Intermediária	1. Sim ()	2. Não ()
3	Vaginose Bacteriana	1. Sim ()	2. Não ()
4	Candidíase	1. Sim ()	2. Não ()
5	Tricomoníase	1. Sim ()	2. Não ()
Anormalidades Citológicas			
Células epiteliais escamosas			
1. Atipias de células escamosas de significado indeterminado (ASC-US):		1. Sim () 2. Não ()	
2. Atipias em células em células escamosas onde não se pode excluir lesão de alto grau – (ASC-H):		1. Sim () 2. Não ()	
3. Lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau (LSIL):		1. Sim () 2. Não ()	
4. Lesão intra-epitelial escamosa de alto grau (HSIL):		1. Sim () 2. Não ()	
5. Carcinoma de células escamosas:		1. Sim () 2. Não ()	
Células glandulares			
6. Células glandulares atípicas de significado indeterminado		1. Sim () 2. Não ()	
7. Adenocarcinoma “in situ”		1. Sim () 2. Não ()	
8. Adenocarcinoma invasor		1. Sim () 2. Não ()	
Histopatológico, Biopsia e CAF			
9. Diagnóstico do histopatológico de biopsia dirigida			
10. CAF:		1. Sim () 2. Não ()	
11. Diagnóstico do histopatológico de espécime obtido por CAF:			
Reação em cadeia da polimerase (PCR)			
Confirmado diagnóstico de tricomoníase:		1. Si	2. Não ()

Confirmado diagnóstico de Gonorréia:	1.Si	2.Não ()
Confirmado diagnóstico de Clamídiase:	1.Si	2.Não ()
Deteccão de HPV:	1.Si	2.Não ()
Genotipagem HPV		
Genótipo de HPV detectado:		
Observações:		

Apêndice B
GEL DE POLIACRILAMIDA INNOLPA

