

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA
ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA

CENTRO DE MEDICINA LABORATORIAL
GERMANO DE SOUSA

INFEÇÃO POR HPV:

Estudo observacional das amostras do Centro de Medicina
Laboratorial Germano de Sousa

Mafalda Filipa Correia Maltinha

Orientadora: Professora Doutora Maria José Rego de Sousa

Mestrado em Tecnologias Moleculares em Saúde

Lisboa, 2020

**INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA
ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA**

**CENTRO DE MEDICINA LABORATORIAL
GERMANO DE SOUSA**

INFEÇÃO POR HPV:

Estudo observacional das amostras do Centro de Medicina
Laboratorial Germano de Sousa

Mafalda Filipa Correia Maltinha

Orientadora: Professora Doutora Maria José Rego de Sousa

Mestrado em Tecnologias Moleculares em Saúde

Lisboa, 2020

Agradecimentos

Ao Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa, agradeço a oportunidade de estágio que me foi concedida, através da qual pude conhecer o ambiente de trabalho laboratorial e realizar a presente dissertação;

À Professora Doutora Maria José Rego de Sousa, orientadora deste trabalho, agradeço a oportunidade de aceitar orientar este trabalho e toda a ajuda prestada para o concluir.

À Doutora Ana Helena Guia Pereira, obrigada por toda a disponibilidade e ajuda prestada na realização e revisão desta dissertação e por todo o apoio, paciência e motivação demonstrada ao longo do percurso deste trabalho.

À Professora Sofia Nolasco por todo o apoio e orientação ao longo deste trabalho.

À Professora Carina Silva pela ajuda e disponibilidade para esclarecimento de dúvidas sobre a análise estatística deste trabalho.

Aos meus pais, avós e ao resto da minha família, por me apoiarem incondicionalmente

Ao Yaroslav, pelo apoio, amizade e companheirismo todos os dias desta jornada

A todos, o meu sincero obrigado.

Resumo

A infecção pelo HPV é uma das infecções de transmissão sexual mais comuns a nível mundial e os HPV de alto risco 16/18 são responsáveis por cerca de 70% dos casos de cancro do colo do útero. Para além desta patologia, também pode causar outros cancros anogenitais, cancro da cabeça e pescoço e verrugas genitais, em ambos os sexos. Esta infecção está associada a comportamentos sexuais de risco, logo os casos são superiores em indivíduos jovens, o que aumenta a importância de estudos epidemiológicos de HPV para a continua melhoria de programas eficientes de rastreio de cancro do colo do útero e de vacinação contra o HPV.

Este estudo foca-se na análise das prevalências da infecção de HPV e os genótipos mais frequentes nas 9707 amostras analisadas no Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa de setembro de 2019 a fevereiro de 2020. Para atingir o objetivo, calcularam-se as prevalências de infecção nas amostras de forma independente para os testes moleculares usados no Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa, nomeadamente, a captura híbrida, o Teste cobas 16/18 + HR e os testes de genotipagem, CLART® HPV e Anyplex™ II HPV28. Verificou-se que a prevalência variou entre 18,4%-38,9%, dependendo do teste molecular usado. Os genótipos mais frequentes nas amostras foram o HPV16, 51, 53, 42 e 54.

Neste trabalho, concluiu-se que o intervalo da prevalência da infecção por HPV é concordante com os valores obtidos nos outros estudos portugueses, os testes moleculares usados detetam os genótipos mais frequentes e os genótipos incluídos na vacina apresentam prevalências baixas na faixa etária jovem. No entanto, seria relevante estudar futuramente a inclusão dos genótipos 51 e 53 na vacina contra o HPV, uma vez que apresentam uma frequência elevada nas amostras analisadas neste estudo e não estão abrangidos na vacina atual.

Palavras-chave: Prevalência, frequência de genótipos, diagnóstico molecular, rastreio, vacinação

Abstract

HPV infection is one of the most common sexually transmitted infections in the world and high-risk HPV 16/18 account for about 70% of cervical cancer cases. In addition to this disease, it can also cause other anogenital cancers, head and neck cancer and genital warts, in both sexes. This infection is associated with risky sexual behaviour, so cases are superior in young individuals, which increases the importance of HPV epidemiological studies for the continued improvement of efficient cervical cancer screening and HPV vaccination programs.

This study focuses on the analysis of the prevalence of HPV infection and the most frequent genotypes in the 9707 samples analyzed at the Germano de Sousa Group - Laboratory Medicine Centre from September 2019 to February 2020. To achieve the objective, the prevalence of infection in the samples was calculated independently for the molecular tests used at the Germano de Sousa Group - Laboratory Medicine Centre, namely, hybrid capture, the Cobas test 16/18 + HR and the genotyping tests, CLART® HPV and Anyplex™ II HPV28. It was found that the prevalence varied between 18.4%-38.9%, depending on the molecular test used. The most frequent genotypes in the samples were HPV16, 51, 53, 42 and 54.

In this work, it was concluded that the range of prevalence of HPV infection is concordant with the values obtained in other Portuguese studies, the molecular tests used detect the most frequent genotypes and the genotypes included in the vaccine have low prevalence in the young age group. However, it would be relevant to study in the future the inclusion of genotypes 51 and 53 in the HPV vaccine, since they present a high frequency in the samples analyzed in this study and are not included in the current vaccine.

Keywords: Prevalence, frequency of genotypes, molecular diagnostics, screening, vaccination

Índice

Índice de Figuras	xiii
Índice de Tabelas	xv
Lista de Abreviaturas	xvii
I. Pertinência do estudo	1
II. Infecção pelo HPV	3
1. Características do HPV	3
2. Ciclo de infecção do vírus	5
3. Formas de transmissão do HPV	7
4. Lesões e patologias resultantes de infecção por HPV	9
5. Métodos de rastreio	11
6. Vacinação	13
7. Técnicas de diagnóstico molecular para HPV no Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa	15
7.1. Teste cobas 16/18 + HR - Sistema COBAS 4800	15
7.2. Teste de Genotipagem	16
7.3. Teste da Captura Híbrida	17
8. Dados epidemiológicos em Portugal	19
III. Objetivos	21
IV. Metodologia	23
1. Sequência de investigação	23
2. População e amostras	23
3. Cálculo da percentagem de infecção por HPV	24
4. Frequência de genótipos de HPV	24
5. Análise estatística	24
V. Resultados	25
1. População e amostras	25
2. Prevalência de infecção por HPV nos resultados de cada técnica	26

2.1. Captura Híbrida.....	26
2.2. Tipagem por microarray	27
2.3. Anyplex™ II HPV28 Detection.....	28
2.4. cobas® HPV Test.....	30
3. Frequência de genótipos de HPV nos resultados das técnicas	32
3.1. Tipagem por CLART <i>microarray</i>	32
3.2. Seegene Anyplex HPV28.....	33
VI. Discussão	35
1. Prevalência da infecção por HPV.....	35
3. Frequências de genótipos de HPV	37
4. Testes moleculares para diagnóstico de HPV	38
5. Vacinação	39
VII. Conclusão.....	41
VIII. Bibliografia	43
IX. Anexos	49
Tabelas de frequências dos genótipos de HPV	49

Índice de Figuras

Figura 2.1 - Ilustração representativa da estrutura do genoma de HPV tipo 18 (Chakravorty e Sugden (2018)).....	4
Figura 2.2 - Ciclo de vida do HPV e organização do genoma (Lazarczyk, M et al (2009))	5
Figura 2.3 - Progressão de infecção HPV para cancro cervical	9
Figura 5.1 - Caracterização das amostras por género e faixa etária (feminino)	25
Figura 5.2 - Caracterização das amostras por género e faixa etária (masculino)	25
Figura 5.3 - Prevalência da infecção por HPV por faixa etária nas amostras analisadas por captura híbrida.....	27
Figura 5.4 - Prevalência da infecção por HPV por faixa etária nas amostras analisadas por CLART microarray	28
Figura 5.5 - Prevalência da infecção por HPV por faixa etária nas amostras analisadas por Anyplex HPV28	29
Figura 5.6 - Frequência de genótipos de HPV nas amostras testadas com CLART microarray.....	33
Figura 5.7 - Frequência de genótipos de HPV nas amostras testadas com Anyplex HPV28	34

Índice de Tabelas

Tabela 5.1 - Amostragem	25
Tabela 5.2 - Prevalência da infecção por HPV por faixa etária nas amostras analisadas por captura híbrida.....	26
Tabela 5.3 - Caracterização das amostras por gênero (técnica CLART)	27
Tabela 5.4 - Prevalência da infecção por HPV por faixa etária nas amostras analisadas por microarrays.....	28
Tabela 5.5 - Caracterização das amostras por gênero (técnica Anyplex HPV28)	28
Tabela 5.6 - Prevalência da infecção por HPV por faixa etária nas amostras analisadas por Anyplex HPV28	29
Tabela 5.7 - Caracterização das amostras por gênero e por tipos de HPV identificados no teste (cobas [®] HPV test).....	30
Tabela 5.8 - Prevalência da infecção por HPV por faixa etária nos tipos de HPV identificados no teste (cobas [®] HPV test).....	31
Tabela 9.1 - Frequência de genótipos de HPV nas amostras testadas pela técnica CLART microarray	49
Tabela 9.2 - Frequência de genótipos de HPV nas amostras testadas pela técnica Anyplex HPV28.....	50

Lista de Abreviaturas

AIN	Neoplasia Intraepitelial Anal
ASC-US	Células Pavimentosas Atípicas de Significado Indeterminado
CCU	Cancro do Colo do Útero
CIN 1	Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 1
CIN 2	Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 2
CIN 3	Neoplasia Intraepitelial Cervical de grau 3
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DST	Doença Sexualmente Transmissível
FFPE	Fixado em formalina e embebido em parafina (<i>Formalin-Fixed Paraffin-Embedded</i>)
HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida
HPV	Vírus do Papiloma Humano
HR-HPV	Vírus do Papiloma Humano de Alto Risco
HSIL	Lesão Pavimentosa Intraepitelial de Alto Grau
LSIL	Lesão Pavimentosa Intraepitelial de Baixo Grau
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade (<i>Major histocompatibility complex</i>)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PNV	Plano Nacional de Vacinação
RNA	Ácido ribonucleico
VIN	Neoplasia Intraepitelial Vulvar

I. Pertinência do estudo

A infeção pelo Vírus do Papiloma Humano (HPV) é uma das infeções de transmissão sexual mais comuns a nível mundial. Estão identificados mais de 100 tipos de HPV, dos quais 40 podem infetar a área genital (Graham, 2017). Estes 40 são classificados em HPV's de alto ou baixo risco consoante a sua capacidade de fazer evoluir a infeção para doença cervical (Graham, 2017). Os tipos de HPV de alto risco (HPVs 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 56, 58, 59, 68, 73, 82) são descritos como oncogénicos por potenciarem o desenvolvimento de cancro anogenital (Graham, 2017). Por outro lado, os tipos de HPV de baixo risco (HPVs 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81, 89) tendencialmente originam verrugas e outras lesões benignas.

Os tipos HPV de alto risco 16 e 18 são responsáveis por cerca de 70% dos casos de cancro do colo do útero. Para além desta patologia, a infeção por HPV de alto risco também pode causar outros tipos de cancro anogenital (vagina, vulva, ânus, pénis), cancro da cabeça e pescoço e verrugas genitais, tanto em homens como em mulheres (Organização Mundial de Saúde, 2017). A maioria das infeções são assintomáticas, podendo ser combatidas pelo sistema imunitário no período de 2 anos, no entanto, as infeções podem evoluir para diversas lesões benignas (como as verrugas, os condilomas e as lesões benignas da orofaringe) ou cancro (Cuf, 2019; IARC & Papillomaviruses, 2007).

Segundo o relatório "Human Papillomavirus and Related Diseases - World" do *HPV Information centre* (Bruni et al., 2019b), são diagnosticados 569,847 novos casos de cancro cervical por ano no mundo, fazendo com que, mundialmente, o cancro cervical seja o terceiro cancro mais comum nas mulheres e o segundo mais comum na faixa etária entre os 15 e os 44 anos. Anualmente, o número de novas mortes devido ao cancro cervical são cerca de 311,365 no mundo. Estima-se que entre 50 e 80% dos indivíduos sexualmente ativos são infetados em alguma altura da sua vida, apesar de, na maioria dos casos, a infeção não progredir para doença sintomática (Cho, So, Lee, & Hong, 2015).

Estão identificados diversos fatores que aumentam o risco de infeção como por exemplo: certos tipos de HPV (HPV16 e HPV18), a presença de imunodeficiências, início precoce de atividade sexual, predisposição genética, hábitos tabágicos, coinfeção com outros microrganismos de transmissão sexual, como por exemplo, o HIV (Cuf, 2019). Os jovens em Portugal iniciam a vida sexual por volta dos 15 anos, muitas vezes em simultâneo com o início do consumo de álcool e drogas, levando à prática de relações sexuais desprotegidas. Apesar da utilização do preservativo não

proteger a 100% a infeção por HPV, não deixa de ser uma barreira que deve ser utilizada. Em Portugal, a vacinação aos indivíduos do sexo masculino foi incluída no PNV em 2020, o que faz com que a grande maioria dos jovens rapazes não estejam vacinados e possam ser transmissores do HPV. Estas circunstâncias aumentam o risco dos comportamentos sexuais dos jovens (Reis & Matos, 2019).

Atualmente em Portugal, o Sistema **cobas** 4800 é o mais usado e pedido pelos médicos no rastreio de infeção por HPV. Apesar desta técnica detetar a infeção por 14 tipos de HPV diferentes, são apenas identificados os tipos HPV 16 e HPV 18, o que origina uma grande limitação no diagnóstico de infeção. Em Portugal, existem infeções com outros tipos HPV de alto risco, que este método de rastreio não identifica. Desta forma, caso haja um resultado positivo que não seja HPV 16 ou HPV 18, é necessária a realização de uma técnica complementar para identificar especificamente o tipo de HPV. A genotipagem ou tipagem de HPV é uma técnica muito eficiente que identifica vários tipos de HPV de alto e baixo risco. Dependendo da marca comercial dos reagentes de genotipagem utilizada esse número de tipos de HPV identificados poderá variar (exemplo: o Anyplex™ II HPV28 Detection de teta 19 tipos de HPV de alto risco e 9 tipos de HPV de baixo risco). No entanto, é uma técnica de segunda linha, solicitada apenas quando o resultado de citologia ou outras técnicas de primeira linha é positivo. Existe então um limite no diagnóstico da infeção por HPV, no sentido que indivíduos infetados com tipos de HPV não identificados pelas técnicas de primeira linha irão receber um resultado negativo quando poderão estar infetados.

Segundo o relatório “Human Papillomavirus and Related Diseases - Portugal” do *HPV Information centre* (Bruni et al., 2019b), as estimativas acerca do cancro cervical mostram que 750 mulheres são diagnosticadas com esta patologia por ano em Portugal, com a consequência de 340 mortes por ano devido a esta doença. O cancro cervical é o nono cancro mais frequente nas mulheres em Portugal e o terceiro mais frequente em idades entre os 15 e 44 anos. Em Portugal, os tipos de HPV de alto risco mais prevalentes nos casos de cancro cervical são, por ordem decrescente, o HPV-16, HPV-18, HPV-33 e, por último, com uma prevalência de 3,7%, o HPV-45. Todos os outros tipos de HPV encontrados em casos de cancro cervical apresentam uma prevalência abaixo deste valor.

A OMS recomenda a inclusão da vacina contra o HPV nos programas nacionais de vacinação desde 2009, em países onde o cancro do colo do útero representa uma prioridade de saúde pública. Portugal, comparativamente com outros países europeus, apresenta uma taxa de cobertura vacinal elevada, com a vacina tetravalente incluída no Plano Nacional de Vacinação (PNV) desde 2008.

II. Infecção pelo HPV

1. Características do HPV

O HPV é um vírus pertencente à família dos *Papillomaviridae*, que são por definição vírus pequenos, com cápside icosaédrica sem envelope, com genoma DNA de cadeia dupla que infetam mucosas e epitélios cutâneos de uma grande variedade de vertebrados de espécies específicas, entre elas a espécie humana, conseguindo induzir a proliferação celular devido à composição do seu genoma. Podem categorizar-se em tipos cutâneos quando infetam a pele das mãos e dos pés, e em tipos mucosos quando a zona infetada é a boca, garganta, trato respiratório ou anogenital (Burd, 2003). A infecção das estruturas pode ser assintomática ou resultar na presença de lesões clinicamente evidentes como condilomas cutâneos ou mucosos, papilomatose respiratória e papilomas orais e nasais (Pytynia et al., 2014). Quando não há evidência de sintomas, a infecção só pode ser diagnosticada através de exames citológicos, histológicos e/ou moleculares.

O seu genoma de DNA circular de cadeia dupla codifica oito *open reading frames* (ORFs). Como se observa na figura 1, as ORFs são divididas em três partes funcionais, que consistem na região inicial (E), a região tardia (L) e a região de controlo longo (LCR), não codificante, que contém elementos reguladores *cis* (regiões de DNA não codificante, onde se liga uma ou mais proteínas reguladoras e estão presentes na mesma molécula de DNA que o gene que eles regulam) necessários para controlar a replicação e transcrição do DNA viral.

A região inicial (E) codifica proteínas necessárias para a replicação viral. Existem as proteínas E1-E7 que desempenham um papel em regular, promover e apoiar a transcrição e replicação do DNA viral (funções reguladoras na célula epitelial infetada) (Graham, 2017). A E1 e E2 formam um complexo que se liga à origem de replicação. A proteína E1 tem como função desenrolar o DNA viral, tornando-o acessível aos mecanismos celulares (Vonsky, 2019). A proteína E2, por sua vez, é um fator de transcrição, essencial para a segregação do genoma e para o empacotamento do DNA viral na capsídeo do vírus (Graham, 2017; M. Vonsky et al., 2019). Tem a função de regular a transcrição do gene viral, e o complexo formado com a E1 permite manter os níveis de expressão das proteínas virais iniciais a um nível baixo, para o vírus não ser detetado pelo sistema imunitário (Mirabello et al., 2018).

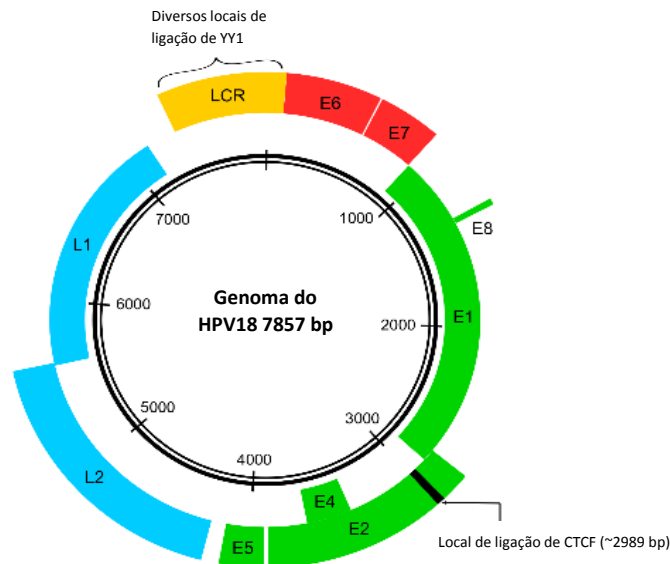


Figura 2.1 - Ilustração representativa da estrutura do genoma de HPV tipo 18 (Adaptado de Chakravorty e Sugden (2018))

Pensa-se que a proteína E4 esteja envolvida nas fases tardias do ciclo do vírus, onde parece ter uma função na libertação e/ou transmissão do vírus e na otimização da amplificação do genoma viral (Egawa, N.; Egawa, K.; Griffin, H.; Doorbar, 2015). A proteína E4 é sintetizada em grandes quantidades nas camadas suprabasais e granulares epiteliais e forma filamentos amilóides que, ao se ligarem a proteínas do citoesqueleto, fragilizam as células, levando a uma facilidade na libertação dos viriões de HPV (Mcintosh et al., 2008; 2010; Vonsky et al., 2019). Desta forma, esta proteína contribui para a infecciosidade e transmissão do HPV.

As últimas três oncoproteínas da região inicial, E5, E6 e E7 são acessórias e são as responsáveis pela imortalização e transformação das células infetadas por HPV. A E5 pode funcionar tanto nas fases iniciais como tardias do ciclo viral e tem um papel na fuga à resposta imunitária e à apoptose (Egawa, N.; Egawa, K.; Griffin, H.; Doorbar, 2015). A oncoproteína E5 assegura a penetração do genoma viral na célula, aumenta a atividade das proteínas E6 e E7, através da regulação de fatores de crescimento e inibição da apoptose, e pode alterar a expressão de genes envolvidos na adesão e motilidade celular (Vonsky et al., 2019). Para evitar uma resposta imunitária contra o vírus, a E5 interfere com funções essenciais do sistema imunitário, inibindo a resposta do interferão antiviral e reduzindo a expressão das moléculas MHC da classe I e II (Vonsky et al., 2019). Todas estas funções da proteína E5 levam a uma perturbação da apresentação dos antígenos virais, à supressão da inflamação e enfraquecem a resposta imunitária, contribuindo para a sobrevivência das células infetadas (Vonsky et al., 2019). Por outro lado, as oncoproteínas E6 e E7 são as principais responsáveis pelo potencial oncogénico do vírus e a sua principal atividade é a inativação de proteínas supressoras de tumores p53 e pRb, respetivamente (M. Vonsky et al., 2019). Estas duas

oncoproteínas virais desempenham um papel fundamental na condução da oncogênese celular, uma vez que podem induzir as “marcas distintivas” de uma célula cancerígena: proliferação celular descontrolada; ativação da invasão dos tecidos e metástase; inibição da apoptose; evasão dos supressores de crescimento; indução da angiogênese; detêm um potencial replicativo ilimitado (Hoppe-seyler et al., 2017; Pal & Kundu, 2020). Portanto, o papel essencial da E6 e da E7 no ciclo de infecção viral é modificar o ambiente celular para permitir a amplificação do genoma viral e impedir a ativação de mecanismos que tentam eliminar a infecção (Egawa, N.; Egawa, K.; Griffin, H.; Doorbar, 2015).

A região tardia (L) codifica proteínas estruturais, L1 e L2, que formam as cápsides virais, necessárias para a montagem de viriões. O arranjo estrutural destas duas proteínas forma a cápside do vírus, sendo a proteína L1, o elemento estrutural primário, e a proteína L2, um componente em menor quantidade no virião. Ambas as proteínas têm um papel na eficácia da infecciosidade do vírus.

2. Ciclo de infecção do vírus

A infecção por HPV de alto risco pode ser transeunte, sendo eliminada pelo sistema imunitário, ou tornar-se persistente. Estas duas formas de infecção designam-se infecção produtiva e não produtiva, respetivamente. Os HPV infetam geralmente células epiteliais, possuindo um ciclo de vida estruturado de acordo com os diferentes estados de diferenciação das células que vão ser infetadas (Graham, 2017; Mirabello et al., 2018; Moody, 2017).

Como se pode observar na figura 2, o vírus entra na camada basal do epitélio estratificado através de micro-lesões, onde se pode ligar a recetores de membrana através da proteína L1 e infetar as células. No caso do epitélio cervical, o vírus pode

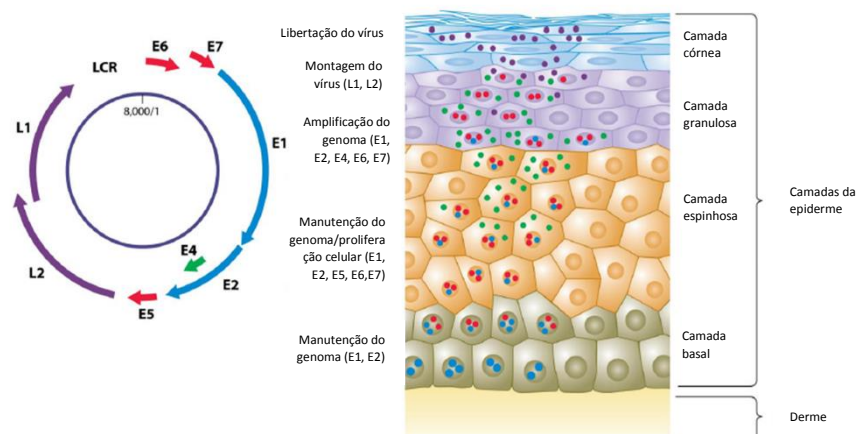


Figura 1.2 - Ciclo de vida do HPV e organização do genoma (adaptado de Lazarczyk, M et al (2009))

infetar através da junção colunar escamosa, conhecida como zona de transformação, entre o endo- e ectocervix (Moody, 2017; Chinita, 2018; Mirabello et al., 2018; Graham, 2017). O HPV depende do mecanismo de replicação de DNA das células do hospedeiro para sintetizar o seu DNA, por isso nas células basais indiferenciadas existe uma grande quantidade de maquinaria celular para a replicação na infecção inicial, onde ocorre manutenção do genoma viral com a amplificação de um número estável de cópias por célula infetada (Moody, 2017; Egawa, N.; Egawa, K.; Griffin, H.; Doorbar, 2015).

Concluída esta parte do ciclo de vida, a fase produtiva é ativada na diferenciação dos queratinócitos, continuando através da replicação produtiva, a expressão genética tardia e a produção de viriões, que são libertados pelas células que saem do ciclo celular (Graham, 2017). Nestas etapas da fase produtiva, muitas das proteínas do vírus têm um papel importante, como mecanismos do HPV para modificar as vias reguladoras da replicação celular normal (Mirabello et al., 2018). A expressão de E6 e E7 permite que as células entrem de novo em replicação, após a diferenciação, tendo a ajuda das proteínas E4 e E5 para a eficiência desta replicação. Na fase tardia do ciclo viral, onde o DNA viral se replica e se formam os viriões, existe uma maior expressão das proteínas virais E1 e E2 para a fase ser bem-sucedida e a expressão de L1 e L2 promove a encapsulação dos genomas replicados.

A diferenciação das células epiteliais é necessária para a ativação da fase produtiva, mas o vírus necessita dos elementos celulares para se replicar, o que faz com que esta forma de ciclo de infecção seja crucial para a viabilidade do vírus. Desta forma, existe um equilíbrio entre a atividade das proteínas virais no ciclo celular e apoptose para permitir a amplificação do DNA viral sem a consequência de integração do mesmo nas células hospedeiras, levando à finalização do ciclo de vida infeccioso (Graham, 2017). A estratégia usada pelo vírus para se replicar tem como objetivo fugir à resposta imunológica do indivíduo infetado, baseando-se no transporte do vírus pelas células infetadas desde a camada basal, através do avanço das células para a superfície do epitélio, onde ocorrem os níveis elevados de expressão genética viral e produção de viriões (Moody, 2017; Mirabello et al., 2018; Graham, 2017).

No momento em que a infecção por HPV se torna não produtiva, já se verifica a persistência do vírus nas células do indivíduo e conseqüentemente, o que, com o passar do tempo, pode levar ao desenvolvimento de uma patologia relacionada com a infecção prolongada. A persistência de infecção por um mesmo tipo de HPV é um fator necessário ao desenvolvimento de cancro, mas não é suficiente. A integração do DNA do vírus é o processo crucial para a origem das lesões e a infecção não produtiva (Gillison et al., 2000; Pytynia et al., 2014). Quando o vírus infeta o epitélio e replica o seu DNA nas células infetadas, causa uma perturbação no controlo normal do ciclo celular, o que pode

promover a divisão celular descontrolada e conseqüentemente, conduzir à acumulação de danos genéticos (Okunade, 2019). A desregulação da replicação produtiva do genoma do HPV pode levar a uma infecção persistente e se esta não for eliminada, pode progredir para cancro, o que constitui um evento não produtivo para o vírus, prejudicando a sua replicação (Egawa et al., 2015).

No caso desta infecção não produtiva, onde ocorre a integração do DNA viral no genoma da célula hospedeira (Graham, 2017), a expressão tardia do gene é retardada, diminuindo a produção de viriões e aumentando a expressão de E6/E7 (Egawa et al., 2015). Este aumento de expressão das oncoproteínas E6/E7 nas células infetadas é a principal alteração que leva a neoplasias malignas, independentemente do local infetado, através da inibição da diferenciação, da estimulação do crescimento celular e de instabilidade cromossômica (Graham, 2017).

3. Formas de transmissão do HPV

A infecção por HPV pode ser transmitida e manifestada por ambos os sexos (Duarte et al., 2014) e ocorre principalmente pelo contacto epitelial direto (pele ou mucosa), sendo o contato sexual penetrativo (vaginal ou anal) a forma mais comum de transmissão do vírus (M. Vonsky et al., 2019). No entanto, a transmissão também pode acontecer através de outras atividades sexuais, nomeadamente o sexo oral (Burd, 2003; Dunne & Park, 2013). Conseqüentemente, o comportamento sexual é de extrema importância para o risco de infecção por HPV (ACOG, 2017).

Para além destas vias de transmissão, o vírus pode-se transmitir através de verrugas na pele, no momento do parto, durante a passagem do bebé pelo canal vaginal da mãe infetada ou por autoinoculação. Diversos estudos mencionam a transmissão por via vertical ou através de fômites, mas estas vias ainda estão pouco estudadas (Sabeena et al., 2017; Syrjanen, 2018; M. Vonsky et al., 2019).

Alguns estudos indicam que através de transmissão vertical, o vírus pode ser transmitido pela mãe ao feto ou bebé durante a gravidez ou no parto. Durante a gravidez de uma mulher infetada por HPV, o feto pode ser infetado através de micro-lesões na membrana fetal ou através da placenta. No entanto, dados apontam que a maior parte das infeções por HPV em recém-nascidos ocorrem no momento do parto, uma vez que os estudos mostram concordância entre o(s) tipo(s) de HPV materno(s) e o(s) do recém-nascido, sugerindo transmissão perinatal (Sabeena et al., 2017). Esta transmissão pode ocorrer pelo contacto direto com o canal vaginal infetado da mãe ou por rutura prematura de membranas em contacto com o bebé (Sabeena et al., 2017). Desta forma, o risco de transmissão vertical é baixo, mas há uma maior probabilidade de o recém-nascido estar

infetado por HPV se a placenta ou cordão umbilical testarem positivo para DNA de HPV (Sabeena et al., 2017; M. Vonsky et al., 2019).

Diversos estudos epidemiológicos já demonstraram que o risco de contrair uma infecção por tipos de HPV de alto risco e o desenvolvimento de cancro cervical está relacionado com as atividades sexuais dos indivíduos (Okunade, 2019; Reis & Matos, 2019; Syrjanen, 2018; M. Vonsky et al., 2019). A maioria das infecções por HPV ocorrem quando se inicia a atividade sexual, maioritariamente na adolescência e o risco é aumentado quando os indivíduos possuem múltiplos parceiros sexuais ou um parceiro que já teve contacto com múltiplos parceiros (Braaten et al., 2008; Okunade, 2019). O início precoce da vida sexual também aumenta o risco, circunstância que atualmente se tem observado a nível mundial. Fatores adicionais são um histórico anterior de outras DST, verrugas vaginais ou cancro cervical ou do pénis no indivíduo ou no parceiro sexual (Okunade, 2019).

A utilização de preservativo nas relações sexuais é uma medida de prevenção, mas não elimina o risco de infeção a 100%, uma vez que o vírus pode ser transmitido através do contacto da pele com os tecidos labiais, escrotais ou anais infetados (Braaten et al., 2008; Burd, 2003). No entanto, o preservativo consiste numa forma importante de prevenção. Outros comportamentos que podem diminuir o risco de infeção por HPV são, por exemplo, ter apenas um/uma parceiro/a sexual.

Para além de fatores que possam aumentar o risco de infeção, também existem fatores que influenciam a eliminação da mesma. Os indivíduos infetados por HPV podem não conseguir eliminar a infeção devido a predisposição genética (alterações genéticas importantes para o funcionamento correto do sistema imunitário), variação genética de diferentes tipos de HPV, coinfeção com mais de um tipo de HPV, frequência de reinfeção, níveis hormonais e a resposta imunitária (Okunade, 2019). Em relação ao cancro cervical, também existem fatores que podem contribuir juntamente com infeção por HPV de alto risco para o seu desenvolvimento, tais como resposta imunitária primária suprimida, o uso prolongado de contraceptivos orais, hábitos tabágicos e um número elevado de gravidezes (Fu et al., 2016; Lin et al., 2018; Okunade, 2019).

Para além dos comportamentos sexuais, a idade também é um fator que influencia o risco de um indivíduo ser infetado por HPV. As infeções são mais comuns em mulheres sexualmente ativas entre os 18 e os 30 anos, diminuindo o risco a partir desta idade. É importante notar que os cancros cervicais são mais comuns em mulheres com idades superiores a 35 anos, o que suporta que as infeções se originam na idade jovem e progridem lentamente para cancro cervical quando são persistentes, em idades mais avançadas (Burd, 2003; Graham, 2017).

4. Lesões e patologias resultantes de infeção por HPV

A grande maioria das infeções por HPV são transientes, sendo eliminadas pelo sistema imunitário num período até 2 anos. No entanto, quando as infeções se tornam persistentes, originam-se lesões pré-cancerígenas e cancerígenas (Graham, 2017).

Na progressão de infeção para cancro, o cérvix é infetado pelo HPV e dá-se a progressão para um estágio de pré-cancro inicialmente. Deste estágio, a infeção pode desenvolver para uma invasão do cérvix, levando ao cancro cervical, ou, por outro lado, pode haver uma regressão deste estágio pré-cancro, levando à eliminação do HPV pelo organismo (*clearance*) (figura 2.3) (ICO/IARC Information Centre on HPV, 2020).

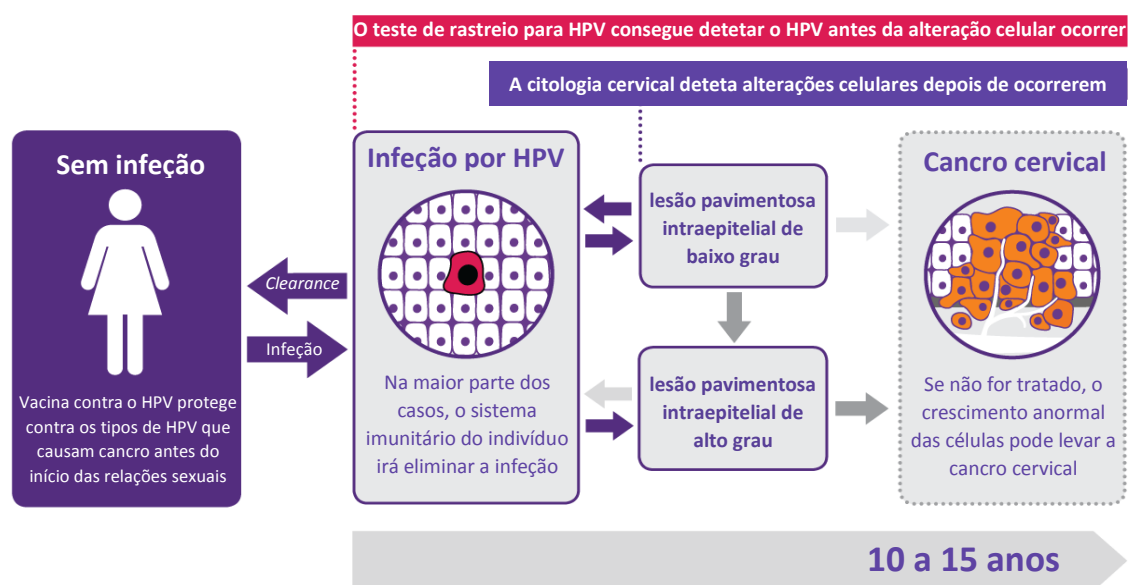


Figura 2.3 - Progressão de infeção HPV para cancro cervical
Retirado e adaptado da web em <https://www.cancer.nsw.gov.au/cervical-screening-nsw/cervical-cancer/about-cervical-cancer>. Visitado em 22/11/2019.

O cancro cervical e outras patologias mais severas são precedidas pelas lesões cervicais, que podem ser classificadas num sistema de 3 estádios (neoplasia intraepitelial cervical (CIN)) ou num sistema de 2 estádios (lesão intraepitelial escamosa - *squamous intraepithelial lesion* (SIL)). Este último sistema categoriza-se em estágio de *Low* (LSIL) e *High* (HSIL) (Braaten et al., 2008; Chaturvedi et al., 2011). Enquanto as lesões classificadas como LSIL apresentam uma probabilidade reduzida de progredir para algum tipo de cancro devido a uma percentagem de regressão elevada, as lesões HSIL são, geralmente, devidas a infeções persistentes, o que leva a uma elevada probabilidade de desenvolvimento das mesmas para lesões cancerígenas (Doorbar, 2006; Graham, 2017).

O sistema de classificação de neoplasia intraepitelial cervical (CIN) apresenta 3 estádios de lesão: CIN1 representa geralmente uma infeção transiente por HPV, com pequena probabilidade de progressão para cancro cervical, sendo eliminada pelo sistema imunitário na maior parte dos casos. Este estádio corresponde ao LSIL no sistema de classificação de lesão intraepitelial escamosa; CIN2 e CIN3 representam infeção persistente, não produtiva e corresponde ao HSIL no sistema de classificação de lesão intraepitelial escamosa (Egawa et al., 2015; Shanmugasundaram & You, 2017) Estes dois estádios representam a doença pré-cancerígena. A infeção por HPV também pode originar doenças anogenitais pré-neoplásicas, como por exemplo, VIN (neoplasia intraepitelial vulvar) e AIN (neoplasia intraepitelial anal).

O cancro cervical é o estádio terminal de uma infeção por HPV não resolvida, definido como a presença persistente de DNA de HPV em testes consecutivos de amostras cervicais (ICO/IARC Information Centre on HPV, 2020). Ou seja, origina-se devido a uma infeção persistente com um tipo de HPV de alto risco que não é eliminada, através de alterações que podem ocorrer no genoma viral e na célula hospedeira. Numa mulher com um sistema imunitário eficiente e saudável, um cancro cervical pode demorar 15 a 20 anos a desenvolver-se, contrariamente a uma mulher com um sistema imunitário comprometido, onde o cancro pode demorar apenas 5 a 10 anos a originar-se (World Health Organization, 2019). Esta patologia é o quarto cancro mais comum nas mulheres mundialmente, com cerca de 570 000 novos casos em 2018, representando 7,5% das mortes de mulheres devido a cancro. Das mais de 311 000 mortes por cancro cervical por ano, mais de 85% delas ocorreram em regiões pouco desenvolvidas (World Health Organization, 2019).

Em Portugal, são diagnosticados anualmente cerca de 750 novos casos de cancro do colo do útero, sendo este o 3º cancro feminino mais comum em mulheres dos 15 aos 44 anos (Bruni et al., 2019b). Para além do cancro cervical, a infeção por HPV tem outros carcinomas associados. Alguns são também cancros anogenitais, como o cancro peniano, vulvar, vaginal e anal, e existem evidências de que o cancro da cabeça e pescoço e da orofaringe estão também relacionados com a infeção deste vírus (Graham, 2017; Liu et al., 2019).

Comparativamente à doença cervical e ao cancro do colo do útero, a percentagem de patologias atribuíveis ao HPV noutros locais é menor (Graham, 2017). No caso do cancro do pénis, há estudos que demonstram associação com infeção por HPV de baixo risco, 6 ou 11 (Graham, 2017), mas esta patologia também está relacionada com HPV de alto risco. O vírus é também responsável por 88% dos cancros anais, 70% dos cancros vaginais e 43% dos cancros da vulva (Bruni et al., 2019a). As infeções anais são mais comuns nas mulheres e nos homens que têm relações sexuais

com outros homens, mas geralmente regridem quando os indivíduos são imunocompetentes (Benevolo et al., 2016). Sendo assim, esta infeção é mais significativa em doentes seropositivos, podendo evoluir para doença pré-maligna anal ou cancro anal (Wang et al., 2018). Por outro lado, as mulheres diagnosticadas com doença cervical ou cancro vulvar têm maior probabilidade de desenvolver cancro anal devido à infeção persistente por HPV na região anogenital (Graham, 2017).

Nos últimos anos, as infeções na cavidade oral e da orofaringe por HPV têm vindo a aumentar, o que leva a um aumento dos cancros orofaríngeos associados a esta infeção, especialmente nos jovens do sexo masculino (Graham, 2017). Geralmente, a infeção por HPV nesta região anatómica é assintomática e transiente, mas se for persistente, pode levar a lesões benignas e malignas (Sheedy & Heaton, 2019). O HPV na região da cabeça e pescoço é transmitido oralmente, e o aumento destas infeções pode ser devido a alterações nas práticas sexuais orais (Graham, 2017), logo o sexo oral pode contribuir para a transmissão do vírus nesta região (Tumban, 2019). A maioria dos cancros da cabeça e pescoço associados ao HPV é causada pelo HPV16 (Graham, 2017; Sheedy & Heaton, 2019; Tumban, 2019). que tem uma prevalência de 80 a 90% nos casos positivos (Graham, 2017). Os tumores da orofaringe, cabeça e pescoço contam com uma incidência superior a 500,000 casos por ano mundialmente, sendo o 6º tipo de cancro mais comum (Spence et al., 2016). Em Portugal, a incidência de cancro da faringe é bastante superior nos homens, com uma percentagem de 11,9%, enquanto nas mulheres é de apenas 0,7% (ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer, 2019).

5. Métodos de rastreio

A prevenção da infeção por HPV é constituída por medidas de prevenção primária, que consistem na vacinação e em estratégias que visam sensibilizar a população para diminuir comportamentos de risco, bem como medidas de prevenção secundária, como programas de rastreio e formação de profissionais de saúde, permitindo uma deteção precoce de lesões associadas à infeção. As medidas de prevenção primária são essenciais para a redução da infeção por HPV na população (Direção-Geral da Saúde, 2008). A vacinação é uma forma de proteger os indivíduos da infeção pelos tipos de HPV presentes na mesma, sendo disponibilizada através do plano nacional de vacinação (PNV) em Portugal. No entanto, como a vacina não protege contra todos os tipos de HPV, o rastreio continua a ter um papel importante na prevenção (Sociedade Portuguesa de Ginecologia, 2014).

O rastreio efetuado para detetar infeções por HPV e respetivas lesões cervicais é de extrema importância devido ao facto das alterações citológicas no colo do útero e as fases iniciais de cancro serem geralmente assintomáticas e a progressão das lesões para cancro demorar diversos anos (Direção-Geral da Saúde, 2008). Sendo assim, o rastreio permite evitar o cancro do colo do útero através da deteção precoce das alterações cervicais (ARS Norte, n.d.) quando o tratamento tem maior probabilidade de ser eficaz (Okunade, 2019).

Em Portugal, existem dois tipos de rastreio implementados, o rastreio organizado e o oportunista. No oportunista, o rastreio é efetuado numa consulta e a periodicidade não está definida, ou seja, não existe um controlo organizado das vezes em que a mulher precisa efetuar o rastreio ao longo do tempo. Contrariamente, o rastreio organizado permite fazer este controlo. É uma medida de Saúde Pública com base populacional, devendo abranger toda a população nacional ou uma determinada região. O facto de ser mais abrangente, mais económico e permitir controlar a periodicidade de rastreio faz com que o rastreio organizado seja mais vantajoso que o oportunista para prevenir casos de cancro do colo do útero. Este rastreio deve iniciar-se por volta dos 25 anos e terminar nos 65, sendo a sua eficácia tão mais elevada quanto maior for a percentagem de população-alvo rastreada (Sociedade Portuguesa de Ginecologia, 2014).

A incidência e mortalidade do cancro do colo do útero tem vindo a diminuir nas últimas décadas, um facto atribuído sobretudo ao sucesso do rastreio cervical (Bhatla & Singhal, 2020). Os métodos usados atualmente englobam a citologia convencional, a citologia em meio líquido e os testes moleculares para detetar DNA (ou mRNA) de HPV, podendo haver uma associação dos dois últimos, com um deles como co-teste (Sociedade Portuguesa de Ginecologia, 2014). O teste de rastreio escolhido deve ter a maior sensibilidade e especificidade possível e uma boa relação custo-benefício (Sociedade Portuguesa de Ginecologia, 2014).

A citologia como metodologia de rastreio permite detetar as alterações das células infetadas por HPV, enquanto o teste de HPV deteta a presença de DNA do vírus nas células infetadas. Desta forma, os resultados que estes métodos apresentam são complementares. Na citologia convencional, as células do colo do útero recolhidas são colocadas numa lâmina de vidro, ao contrário da citologia em meio líquido, onde as células são mergulhadas num recipiente com líquido (meio de preservação e transporte), sendo colocada na lâmina posteriormente através de equipamento específico para o efeito (Arbyn et al., 2008). Este último método tem uma leitura facilitada e permite realizar testes complementares de pesquisa de HPV na mesma

amostra, o que o torna um método com grande aceitação atualmente (Sociedade Portuguesa de Ginecologia, 2014).

Em relação ao teste de HPV, este começou por se realizar como um teste de segunda linha no rastreio, solicitado quando o resultado de citologia era positivo. Posteriormente, começaram a analisar-se as amostras com os dois métodos, o que possibilita um diagnóstico mais completo, mas o teste de HPV também é pedido isoladamente para rastreio. Usar este teste como rastreio primário tem a vantagem de uma sensibilidade superior à citologia, mesmo que a especificidade seja um pouco menor (Bhatla & Singhal, 2020). Adicionalmente, melhora a deteção de doença cervical, fornece melhores resultados clínicos e diminui os custos de rastreio para o sistema de saúde português. Os custos são diminuídos uma vez que o intervalo de rastreio necessário aumenta de 3 para 5 anos na presença de um resultado negativo, ou seja, a frequência de testes de rastreio na vida de uma mulher diminui no caso de resultados negativos consecutivos. O teste de HPV como método de rastreio também fornece uma proteção superior contra carcinoma invasivo cervical de 60-70%, quando comparado com a citologia (Pista et al., 2019).

Desta forma, as duas estratégias de rastreio permitem minimizar o número de visitas de *follow-up* e os procedimentos invasivos desnecessários sem comprometerem a deteção da patologia (Okunade, 2019).

6. Vacinação

A infeção por HPV é uma infeção muito frequente em faixas etárias jovens e tem uma forte associação com o aparecimento do cancro do colo do útero, o que levou ao desenvolvimento de diversas vacinas de importância crucial para prevenir e minimizar o impacto desta infeção, inicialmente apenas nas mulheres, mas atualmente também nos homens. A OMS recomenda a inclusão da vacina contra o HPV nos programas nacionais de vacinação desde 2009, em países onde o cancro do colo do útero representa uma prioridade de saúde pública. A introdução da vacina contra o HPV pode proporcionar uma oportunidade estratégica importante para melhorar ou estabelecer programas de rastreio e tratamento do cancro cervical, bem como para promover a sensibilização sobre o seu objetivo e a sua disponibilidade.

As vacinas que estão disponíveis atualmente contra o HPV previnem a infeção por vários tipos de HPV, maioritariamente de alto risco, prevenindo patologias causadas pelos tipos de HPV na vacina, mas são mais eficazes quando tomadas antes da exposição ao HPV. Ou seja, as vacinas anti-HPV devem ser administradas antes do início da atividade sexual para serem o mais eficaz possível. As vacinas profiláticas

atualmente disponíveis não são terapêuticas e não podem ser utilizadas para o tratamento da infecção por HPV ou das patologias associadas.

Atualmente, existem três vacinas contra o HPV disponíveis comercialmente (Sociedade Portuguesa de Ginecologia, 2017):

1. Uma vacina bivalente (**Cervarix®**, **GlaxoSmithKline**) que confere proteção contra dois tipos de HPV de alto risco, 16 e 18, responsáveis pela maioria dos câncros cervicais;

2. Uma vacina quadrivalente (**Gardasil®**, **Merck Inc.**) que confere proteção contra os tipos de HPV de alto risco, 16 e 18, bem como contra os tipos de HPV de baixo risco, 6 e 11, que são responsáveis por verrugas anogenitais.

3. Uma vacina nonavalente (**Gardasil®9**, **Merck Inc.**) que confere proteção contra os tipos de HPV de baixo risco, 6 e 11, e de alto risco, 16/18/31/33/45/52/58.

As vacinas profiláticas atuais atuam com base na capacidade da proteína L1 do HPV poder formar partículas antígenicamente semelhantes a víriões quando se expressa sozinha numa variedade de tipos celulares. As três vacinas provocam a produção de anticorpos neutralizantes que se ligam a estas partículas virais L1 e bloqueiam a entrada do vírus nas células.

As vacinas profiláticas foram um avanço de extrema importância para a prevenção das patologias que advêm das infecções por HPV. No entanto, elas não conseguem eliminar infecções pré-existentes à administração da vacina, o que limita o número de indivíduos que podem beneficiar das vacinas atuais (Hildesheim et al., 2017). Em lesões associadas à infecção por HPV que podem evoluir para cancro, o genoma viral encontra-se integrado no genoma das células do hospedeiro. A integração do genoma do vírus leva geralmente à deleção dos genes virais E1, E2, E4 e E5, L1 e L2. É devido à deleção de L1 e L2 que as vacinas profiláticas não conseguem ter um efeito terapêutico para câncros associados a infecções por HPV (Gupta et al., 2017).

Relativamente à melhoria das vacinas existentes e ao aparecimento de uma nova geração de vacinas, Gupta et al. (2017) apresentam uma série de potenciais medidas que visam este objetivo. Demonstram que existem vários estudos em vários estádios de ensaios clínicos que visam produzir novas vacinas anti-HPV, com diversas características, sendo elas:

- Vacinas HPV acessíveis, seguras e eficazes, reduzindo o custo de produção em sistemas hospedeiros alternativos de alto rendimento para a produção de partículas semelhantes ao vírus HPV

- Vacinas alternativas de peptídeos ou proteínas baseadas em subunidades para uma produção mais simples e fácil escalabilidade em grandes volumes para vacinação em massa.

- Redução da dose das vacinas

- Ampliação da proteção através da adição de novos tipos de HPV

7. Técnicas de diagnóstico molecular para HPV no Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa

A necessidade de existir infecção com o vírus do papiloma humano para o desenvolvimento do cancro do colo do útero originou o aparecimento de técnicas que detetassem a presença/ausência deste vírus em amostras cervicais, de forma a prevenir esta patologia ou adequar o acompanhamento e tratamento de pacientes com cancro cervical. Ao longo das décadas, o rastreio foi evoluindo com o uso de técnicas moleculares que permitem fazer o diagnóstico com uma sensibilidade superior à citologia. Os testes de genotipagem, por exemplo, proporcionam uma forma de monitorizar a infecção num paciente, mas também realizar estudos epidemiológicos importantes da infecção por HPV em raparigas vacinadas (GENOMICA S.A.U, 2019).

No Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa efetuam-se diversas técnicas de diagnóstico molecular para a deteção de HPV nas amostras. São elas:

7.1. Teste cobas 16/18 + HR - Sistema COBAS 4800

A tecnologia do Sistema COBAS 4800 consiste na amplificação e deteção de sequências de ácidos nucleicos através de uma reação de polimerização em cadeia (PCR) em tempo real. Especificamente, no teste **cobas** 4800 Human Papillomavirus (HPV), realiza-se uma deteção qualitativa *in vitro* do vírus do papiloma humano nas amostras enviadas para esta análise, utilizando a amplificação do DNA alvo por PCR e a hibridização de ácidos nucleicos. A técnica está limitada à deteção simultânea de 14 tipos de HPV de alto risco (HR) numa análise, conseguindo identificar apenas os tipos de alto risco HPV 16 e HPV 18. Os outros 12 tipos de HPV de alto risco detetados são o 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68. Para a realização do teste, as amostras biológicas utilizadas são células cervicais colhidas em Meio de Colheita de Células **cobas** PCR (Roche Molecular Systems, Inc.), Solução PreservCyt (Hologic Corp.) e Fluido Conservante SurePath (BD Diagnostics-TriPath). Qualquer outro tipo de amostra não está validado para o teste **cobas** 4800 Human Papillomavirus (HPV) (Roche Molecular Systems Inc., 2015).

Esta metodologia é utilizada no rastreio de citologia cervical de ASC-US, para avaliar a presença ou ausência de genótipos 16 e 18 do HPV de alto risco e para determinar a necessidade de recomendar colposcopia; é utilizada como complemento da citologia cervical ou como teste de rastreio de primeira linha, para avaliar presença ou ausência dos genótipos 16 e 18 do HPV e identificar mulheres com risco aumentado de desenvolvimento de cancro cervical ou presença de doença em alto grau (<https://diagnostics.roche.com/global/en/products/systems/cobas-4800-system.html>).

O processo laboratorial do teste Cobas ocorre em duas fases:

- a) Preparação automática de amostras para extrair simultaneamente DNA celular humano e de HPV
- b) Amplificação por PCR de sequências do DNA alvo, usando *primers* para regiões específicas dos 14 tipos de HPV de alto risco previamente descritos e para o gene da beta-globina.

Na preparação da amostra, o processo é automatizado e utiliza-se o extrator Hamilton designado cobas x480. Ocorre uma desnaturação a elevadas temperaturas e as amostras são lisadas com um reagente caotrópico e posteriormente purificadas. Acabada a corrida no módulo cobasx480, coloca-se a placa de extração no módulo cobas z480 onde ocorre a reação de amplificação, que começa pela seleção do alvo a partir de iniciadores presentes na MASTERMIX, que estão definidos para os 14 tipos de HPV de alto risco. Finalmente, a deteção automática feita por PCR em tempo real realiza-se a partir de 4 canais que captam a fluorescência dos diferentes fluoróforos presentes na reação de PCR. Estas cores estão definidas para HPV16, HPV18, outros tipos de HPV de alto risco e do gene da beta-globina, daí este teste identificar apenas os tipos HPV16 e HPV18.

7.2. Teste de Genotipagem

7.2.1. Seegene Anyplex HPV 28 Detection (com extração NucliSENS easyMAG - Biomerieux)

Anyplex™ II HPV28 Detection é uma técnica de deteção e identificação simultânea de 28 tipos de HPV – 19 de alto risco e 9 de baixo risco – que utiliza um PCR em tempo real multiplex com elevadas sensibilidade e especificidade utilizando a tecnologia DPO™ e TOCE™. A inovadora tecnologia DPO™ permite a amplificação simultânea de múltiplos alvos e melhora a especificidade do alvo e minimiza a amplificação não específica comumente ocorrida na PCR multiplex (Chun, 2012). A tecnologia TOCE™ permite a confirmação da deteção molecular de múltiplos (cinco ou mais) alvos sem comprometer a sensibilidade. Esta técnica possui um software de

análise automática dos dados de PCR real-time multiplex designado Seegene Viewer. As amostras para estas análises podem ser citologia em meio líquido (ThinPrep® ou Surepath™) ou exsudado cervical.

A tecnologia NucliSENS easyMAG consiste numa extração BOOM, o Gold Standard no Diagnóstico Molecular. A extração BOOM começa com a lise dos ácidos nucleicos. Finalizada esta etapa, é colocada a sílica que se vai ligar aos ácidos nucleicos e a amostra é lavada, removendo proteínas e lípidos. Desta forma, fica-se com os ácidos nucleicos ligados à sílica, que se obtêm através de uma eluição, onde a sílica vai ser separada dos ácidos nucleicos, permitindo a sua extração (bioMérieux S.A., 2007).

7.2.2. CLART microarray

A tecnologia CLART® é uma plataforma baseada em *microarrays* para uso clínico que permite a deteção de múltiplos alvos num único teste e possui um processamento de amostras muito simples e uma análise dos resultados automática, através de um software e de um leitor automático (CAR® ou CLINICAL ARRAY READER) (Genómica, 2020). Esta tecnologia possibilita um diagnóstico rápido, sensível e específico para o vírus HPV, com a linha CLART® HPV. Esta linha é um teste de diagnóstico *in vitro* que realiza a deteção e genotipagem de 35 genótipos de HPV: Alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68B) Provável de alto risco (26, 53, 73, 82) e baixo risco (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 62, 70, 71, 72, 81, 83, 84, 85, 89). A técnica é realizada por PCR multiplex seguido de visualização em *microarrays* de baixa densidade e está validada para diversos tipos de amostra, como citologia líquida, esfregaços e tecidos FFPE (GENOMICA S.A.U, 2019). A sensibilidade e especificidade elevadas são garantidas devido à hibridação de sondas específicas do tipo de HPV e sondas em triplicado para cada genótipo que a técnica deteta.

A tecnologia CLART® para o diagnóstico de HPV permite detetar coinfeções numa amostra, facilitando o acompanhamento de pacientes com infeções persistentes.

7.3. Teste da Captura Híbrida

O teste *digene* HC2 HPV DNA (CH 2, Digene/QIAGEN) utiliza a tecnologia Hybrid Capture® 2 (HC2) para diagnóstico *in vitro* e consiste num ensaio de hibridização de ácidos nucleicos com amplificação de sinal a partir da quimioluminescência em microplacas para a deteção de HPV em amostras cervicais (QIAGEN, n.d.). Nesta técnica, ocorre a hibridação do DNA de HPV presente na amostra com sondas de RNA

complementares às sequências genômicas do HPV. Os híbridos de DNA-RNA são capturados na superfície da microplaca e detetados por um anticorpo monoclonal e um substrato quimioluminescente, que determina a carga viral de forma semi-quantitativa (Kwon, Ho, Park, & Woo, 2014).

A técnica de captura híbrida deteta a presença de 13 tipos de HPV de alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68). A detecção é realizada pela marcação do DNA alvo com uma sonda específica, detetando a presença de HPV, mas não identificando qual é o genótipo específico (QIAGEN, n.d.).

As amostras que podem ser testadas com este teste incluem amostras colhidas com o digene HC2 DNA Collection Device; amostras colhidas no digene Specimen Transport Medium; amostras colhidas com um dispositivo e colocadas na solução PreservCyt® e amostras colhidas na solução BD SurePath® (QIAGEN, n.d.).

Este teste apresenta algumas desvantagens em relação a outras usadas para diagnóstico de infecções por HPV. Não é possível identificar o genótipo específico de HPV presente na amostra, o que constitui uma grande desvantagem desta técnica para o rastreamento de HPV. Para além disso, o limite de detecção de 5000 cópias de genoma torna este teste menos sensível que a técnica de PCR (Bastos, 2011).

Resumindo estas quatro técnicas moleculares para diagnóstico de HPV, o teste de captura híbrida e o teste cobas são atualmente técnicas de primeira linha no rastreamento, enquanto os testes de genotipagem são realizados em segunda linha. O teste de captura híbrida deteta a presença de 13 tipos de HPV de alto risco, mas não permite identificar quais são os tipos de HPV presentes nas amostras, sendo esta a principal desvantagem deste teste em relação aos restantes três. Em comparação, o teste cobas, também um teste de primeira linha, apresenta a vantagem de possibilitar a identificação dos genótipos 16 e 18 nas amostras analisadas, mas os restantes 12 genótipos de HPV de alto risco são apenas detetados. Por outro lado, os dois testes de genotipagem, CLART® HPV e *Anyplex™ II HPV28*, permitem detetar e identificar 35 e 28 genótipos de HPV, respetivamente, num só teste. No entanto, pode ser desvantajoso realizar estes testes como primeira linha de rastreio, uma vez que a alta sensibilidade dos mesmos pode levar a que muitas mulheres jovens, com infeções que podem ser transientes, sejam orientadas para colposcopia, quando não seria necessário submeterem-se a este processo mais invasivo.

8. Dados epidemiológicos em Portugal

Portugal, comparativamente com outros países europeus, apresenta uma taxa de cobertura vacinal elevada, com a vacina tetravalente incluída no Plano Nacional de Vacinação (PNV) desde 2008. Portanto, é importante verificar quais foram os efeitos da introdução da vacina contra a infeção por HPV na população vacinada, de forma a perceber se a incidência e prevalência de génotipos de HPV relevantes em Portugal se alterou.

Em Portugal, foi realizado um estudo observacional transversal (Rocha & Verdasca, 2017) por 19 instituições que integram o Grupo de Estudo da Vacina do HPV com o Laboratório do Vírus do Papiloma Humano da Unidade de Infeções Sexualmente Transmissíveis do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA). O estudo decorreu de setembro de 2014 a dezembro de 2016, com o objetivo de dar a conhecer os primeiros resultados da identificação dos génotipos de HPV em Portugal numa população feminina vacinada com atividade sexual ativa. Durante o período de observação, foram analisadas amostras clínicas de mulheres jovens vacinadas, com atividade sexual ativa na altura. Durante o período de observação, colheram amostras clínicas por *cytobrush*, extraíram o DNA e realizaram deteção e tipificação do HPV pela técnica de *microarrays*, com uma análise molecular adicional, que englobou amplificação por PCR da região L1, com purificação e sequenciação posteriormente.

Foram estudadas amostras de 152 mulheres jovens vacinadas com atividade sexual ativa, em que 28,3% (43/152) apresentaram uma infeção por HPV, sendo que 58,1% (25/43) dessas estavam infetadas com génotipos de alto risco, 41,8% (18/43) com génotipos de possível alto risco e 25,6% (11/43) com génotipos de baixo risco. No total, foram identificados 21 génotipos de HPV. De acordo com a história vacinal das 152 mulheres estudadas, 81,6% (124/152) foram vacinadas ao abrigo do PNV e 18,4% (28/152) foram vacinadas fora do PNV. Das mulheres vacinadas ao abrigo do PNV, 76,6% (95/124) cumpriram o esquema de vacinação, aquando da introdução da vacina no PNV. Das 28 mulheres que foram vacinadas fora do PNV, 60,7% (17/28) respeitaram o esquema de vacinação recomendado pelo PNV.

Embora o estudo referido apresente um tamanho de amostra pequeno, o que limita os resultados que se poderiam obter com uma amostragem mais representativa, podem-se retirar algumas conclusões. Os génotipos de HPV de alto risco associados ao cancro do colo do útero foram os mais frequentes nas amostras de mulheres infetadas, onde dois casos foram de HPV16. No entanto, estas duas mulheres iniciaram uma atividade sexual antes da administração da vacina, o que reforça que a única forma de garantir a efetividade da vacina e ter uma total proteção contra os tipos de HPV que

a vacina abrange é uma administração antes do contacto com o vírus, logo antes de iniciar a atividade sexual. Outro reforço à eficácia da vacina é a ausência de infeção para os genótipos incluídos na vacina, nas mulheres vacinadas com infeção por HPV.

Adicionalmente, entre agosto de 2016 e dezembro de 2017, decorreu um grande estudo na Região Norte de Portugal (Sousa et al., 2019), cujo objetivo foi caracterizar a prevalência e distribuição dos genótipos HR-HPV em amostras cervico-vaginais obtidas a partir do Programa Regional de Rastreio do Cancro do Colo do Útero (PRRCCU). O PRRCCU é um rastreio organizado, realizado em todas as mulheres com idades compreendidas entre os 25 e os 60 anos (com possível extensão até aos 64 anos de idade) da Região Norte de Portugal.

A genotipagem de HR-HPV foi realizada em amostras de citologia em meio líquido, utilizando o kit de deteção de HPV-HR Anyplex™ II (Seegene®, Seul, Coreia) em 105.458 mulheres inscritas no programa durante o período do estudo. Depois de algumas amostras serem excluídas, foram incluídos no estudo 104,993 casos, onde 10,665 (10,2%) deram positivo para HR-HPV, com infeções múltiplas detetadas em 2736 (25,7%) mulheres que testaram positivo para HR-HPV. Os casos positivos tiveram um intervalo de prevalência de infeção entre 6,2% a 17,1%, dependendo da idade e nas múltiplas infeções o intervalo de prevalência vai de 16,5 a 31,0%. Nos resultados obtidos em relação aos genótipos de HPV, os mais prevalentes foram o HPV-16 (17.5%), HPV-39 (16.7%), HPV-31 (15.0%), HPV-68 (13.2%), HPV-52 (10.7%) e o HPV-51 (10.6%). Os autores do estudo ficaram surpreendidos com dois resultados que encontraram, sendo eles a baixa prevalência do HPV-18 na nossa população e, contrariamente, a elevada prevalência do HPV-39. Os resultados da distribuição dos genótipos de HR-HPV de acordo com idades também mostraram que o HPV-16 é mais predominante nas mulheres entre os 30 a 45 anos e o HPV-39 em mulheres mais velhas, entre os 50 e os 65 anos.

Em relação aos genótipos incluídos nas vacinas contra a infeção por HPV, o estudo mostrou que os HPV-16/18 estão presentes apenas em 22,1% das mulheres infetadas, enquanto os genótipos HPV-16/18/31/33/45/52/58, incluídos na vacina nonavalente, representam apenas 47,6% do número total de mulheres infetadas. Isto significa que a restante percentagem de genótipos de HPV que infetam mulheres portuguesas não estão incluídos em nenhuma das vacinas existentes atualmente, o que impede que haja uma medida de prevenção para estes tipos de HPV, excetuando o rastreio a partir de técnicas que façam uma tipagem de um grande número de genótipos de HPV.

III. Objetivos

1.1. Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo geral estudar e analisar as prevalências da infecção de HPV e dos genótipos de HPV identificados no universo das amostras, analisadas no Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa de setembro de 2019 a fevereiro de 2020, por faixa etária.

1.1.1. Questões de investigação

- Quais os tipos de HPV não abrangidos nas vacinas atualmente administradas com alta prevalência em Portugal?
- Há uma eficácia dos métodos atuais de diagnóstico para identificar os tipos de HPV mais prevalentes em Portugal?

1.1.2. Objetivos específicos

Para ser possível atingir o objetivo geral deste estudo, foram definidos os seguintes objetivos específicos: calcular prevalências e incidências de infecção de HPV com os resultados de diferentes testes moleculares (por idade).

IV. Metodologia

1. Sequência de investigação

Ordem cronológica dos passos realizados para a realização deste estudo:

- i. **Recolha documental** – escolha de artigos relacionados com o HPV (caraterísticas do vírus, ciclo de infeção e as suas consequências, patologias associadas), dados epidemiológicos de prevalência e incidência da infeção por HPV e cancros associados, tanto em mulheres como homens, as metodologias usadas para diagnóstico e rastreio e análise estatística;
- ii. **Recolha de dados** – os dados para o estudo foram entregues no formato de tabela, com a idade e género dos indivíduos e resultado do respetivo teste de diagnóstico que foi realizado. Para este estudo, obtiveram-se resultados de diferentes técnicas de diagnóstico realizadas no Laboratório Germano de Sousa;
- iii. **Análise estatística dos dados recolhidos** – foi usado o Microsoft Office Excel 2019 e o software IBM SPSS Statistics para realizar a análise dos dados obtidos.

2. População e amostras

A população deste estudo consiste nas amostras recebidas no Laboratório Germano de Sousa para pesquisa de HPV, através das técnicas de diagnóstico solicitadas. Para cumprir o objetivo deste trabalho, foram analisados os resultados das amostras testadas entre setembro de 2019 e fevereiro de 2020. As amostras incluídas neste estudo estão divididas pelas diversas técnicas de diagnóstico que são utilizadas no laboratório Germano de Sousa e, conseqüentemente, os resultados deste estudo serão calculados e apresentados de acordo com os dados para cada técnica.

Do total de amostras recebidas neste período, foram excluídas todas as amostras provenientes de indivíduos com idade inferior a 18 anos, uma vez que é um intervalo de idades para o qual o rastreio não é recomendado e são indivíduos menores. As amostras de indivíduos do sexo masculino foram incluídas no presente estudo, ainda que se apresentem em percentagem muito inferior ao da amostragem total, para se perceber a percentagem de casos positivos nestas amostras, quais os genótipos de

HPV mais prevalentes e se estarão relacionados com os HPV mais prevalentes nas amostras dos indivíduos do sexo feminino.

A população em estudo foi dividida em sexo feminino e masculino nas técnicas que tinham dados de ambos os sexos, para se verificar a percentagem de casos positivos entre os sexos, e dividida por três faixas etárias: idade inferior ou igual a 30 anos; idade entre 31 e 50 anos e idade superior a 50, onde os valores são apresentados em conjunto, ou seja, o cálculo das frequências engloba os resultados de amostras do sexo feminino e masculino.

3. Cálculo da prevalência de infeção por HPV

Neste estudo foram incluídos resultados de quatro diferentes técnicas de diagnóstico para infeção por HPV que se realizam no Laboratório Germano de Sousa, logo os cálculos da prevalência de infeção foram feitos de forma independente, nos resultados de cada técnica. A percentagem de amostras positivas para HPV em cada técnica foi obtida através do número de casos positivos na população total de amostras que foram analisadas. A percentagem foi calculada por faixa etária. Uma amostra foi considerada positiva quando foi detetado pelo menos um genótipo de HPV.

4. Frequência de genótipos de HPV

Das quatro técnicas realizadas no laboratório, apenas uma delas não fornece dados de genótipos de HPV presentes nas amostras analisadas. Desta forma, nas três técnicas que nos forneciam estes dados, a frequência de cada genótipo nas amostras foi determinada calculando a percentagem de amostras que estavam infetadas com determinado tipo de HPV na totalidade de amostras positivas. As amostras com infeções múltiplas foram contabilizadas tantas vezes quantos os genótipos nelas presentes. A frequência foi determinada por faixa etária.

5. Análise estatística

Os dados das amostras foram exportados do software informático do laboratório para o Microsoft Office Excel 2019 onde foi realizada parte da análise dos dados. Todos os cálculos e gráficos foram feitos com o mesmo programa. Usou-se o IBM SPSS Statistics para averiguar se existia associação estatisticamente significativa entre as faixas etárias e as amostras testadas positivas em cada uma das cinco técnicas.

V. Resultados

1. População e amostras

Neste estudo foram analisadas 9707 amostras, das quais 9604 eram do sexo feminino e 103 do sexo masculino (figura 5.1 e 5.2). Em relação à distribuição das amostras por faixa etária: 1435 são amostras com idade igual ou superior a 30 anos; 6697 são amostras com idade entre os 31 e os 50 anos, inclusive e 1575 amostras com idade superior a 50 anos (tabela 5.1). No entanto, estas amostras foram distribuídas pelas técnicas usadas para analisar as mesmas.

Tabela 5.1 - Amostragem

Idade	Feminino n (%)	Masculino n (%)
<= 30	1408 (98,1)	27 (1,9)
31-50	6640 (99,2)	57 (0,9)
>50	1556 (98,8)	19 (1,2)

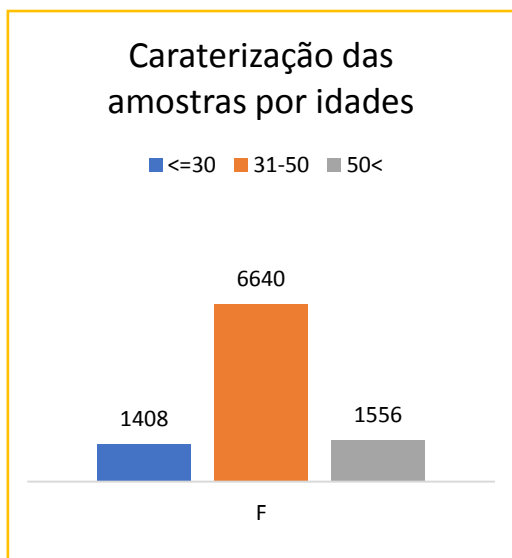


Figura 5.1 - Caraterização das amostras por género e faixa etária (feminino)

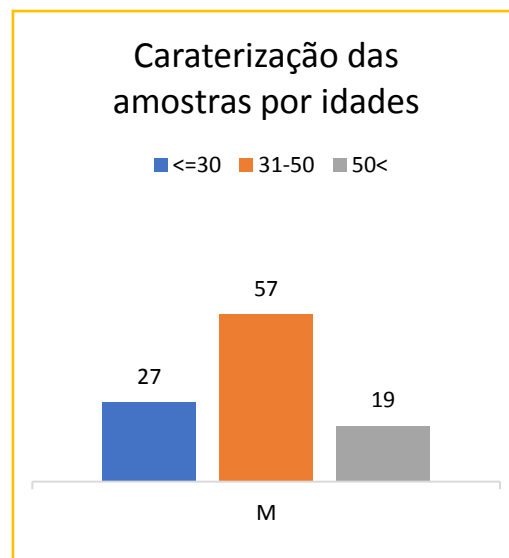


Figura 5.2 - Caraterização das amostras por género e faixa etária (masculino)

2. Prevalência de infecção por HPV nos resultados de cada técnica

A prevalência da infecção por HPV nas amostras foi determinada com o total das amostras com resultados negativos e positivos, nas quais se considerou uma amostra positiva sempre que o resultado foi apresentado como positivo ou foi detetado pelo menos um genótipo de HPV. As metodologias de tipagem por *microarray* e PCR em tempo real permitem a identificação individualizada dos tipos de HPV detetados, enquanto que o método Cobas 16/18 HRHPV, apenas identifica o HPV16 e HPV18 caso o DNA esteja presente, mas os outros tipos de HPV são apenas detetados e não identificados individualmente. Ao contrário de todas as técnicas anteriores, na captura híbrida o resultado demonstra apenas se o DNA de HPV de alto risco está presente na amostra, sendo apresentado como negativo ou positivo. Adicionalmente, esta técnica não está validada para amostras masculinas, à semelhança do teste Cobas 16/18 HPV. Estas duas técnicas são de primeira linha para o rastreio do CCU em amostras cervicais.

Os genótipos de HPV identificados pelas diversas técnicas variam, uma vez que umas técnicas são mais completas ao identificar tipos de HPV adicionais, embora a maioria identifique os genótipos de alto risco. Os resultados das amostras serão apresentados em subcapítulos, referentes a cada uma das quatro técnicas usadas.

2.1. Captura Híbrida

No total das amostras analisadas por captura híbrida (n = 132), 88 (66,7%) foram amostras negativas e 44 (33,3%) foram positivas. Como se pode observar na tabela 5.2, o maior número de amostras analisadas (n = 89) foram de indivíduos entre os 31 e 50 anos, correspondendo ao intervalo de idade com maior risco de desenvolver cancro devido a uma infecção persistente. Das amostras pertencentes a pacientes com idade inferior ou igual a 30 anos (n = 21), 47,6% foram positivas para HPV. Na faixa etária entre os 31 e os 50 anos, 30,3% tiveram resultado positivo e na faixa etária de idade superior a 50 anos, a prevalência de resultados foi semelhante, com 31,8% (figura 5.3).

Tabela 5.2 - Prevalência da infecção por HPV por faixa etária nas amostras analisadas por captura híbrida

Idade	DNA HPV negativo n (%)	DNA HPV positivo n (%)
<= 30	11 (52,4)	10 (47,6)
31-50	62 (69,7)	27 (30,3)
>50	15 (68,2)	7 (31,8)

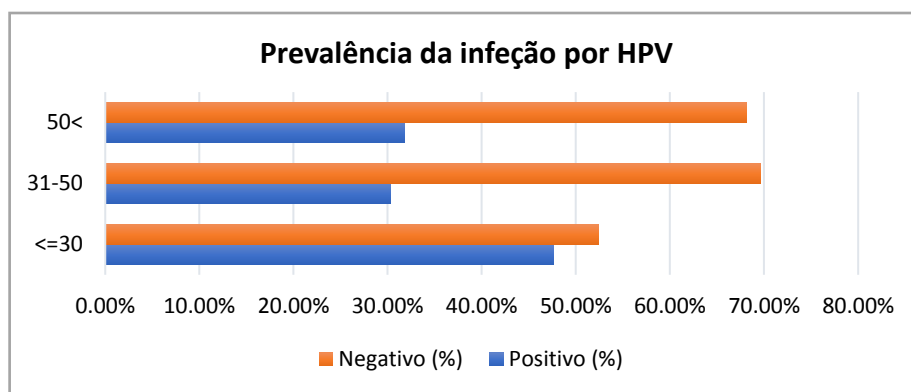


Figura 5.3 - Prevalência da infecção por HPV por faixa etária nas amostras analisadas por captura híbrida

2.2. Tipagem por microarray

Na técnica CLART, já se obteve resultados de mulheres e homens (tabela 5.3). No total das amostras do sexo feminino ($n = 1159$), 802 (69,2%) apresentam resultado negativo para DNA de HPV, enquanto 357 (30,8%) testaram positivo. Comparativamente, o número de amostras do sexo masculino é reduzido ($n = 62$), com 27 (43,6%) amostras negativas e 35 (56,5%) positivas. É de notar que no sexo masculino, a percentagem de amostras positivas é superior à de amostras negativas.

Tabela 5.3 - Caracterização das amostras por género (técnica CLART)

Género	DNA HPV negativo n (%)	DNA HPV positivo n (%)
F	802 (69,2)	357 (30,8)
M	27 (43,6)	35 (56,5)

Fazendo a apresentação dos dados por faixa etária (tabela 5.4), 202 amostras pertenciam a indivíduos (femininos e masculinos) com idade inferior a 30 anos, com um valor de 48,5% de amostras positivas. Na faixa etária dos 31-50, 29,1% das amostras foram testadas positivas, assim como 27,9% das amostras de indivíduos com mais de 50 anos (figura 5.4). O maior número de amostras obtido foi na faixa etária dos 31-50 anos, com um total de 793 amostras analisadas.

Os valores de percentagem nas amostras masculinas estão incluídos nos resultados da tabela 5.4. Das 35 amostras testadas positivas de indivíduos do sexo masculino, 13 pertenciam a jovens com menos de 30 anos, 16 pertenciam à faixa etária dos 31-50 anos e 6 pertenciam aos indivíduos com mais de 50 anos, sendo as percentagens de amostras positivas, 86,7%, 45,7% e 50%, respetivamente, da faixa etária mais jovem para a mais velha.

Tabela 5.4 - Prevalência da infecção por HPV por faixa etária nas amostras analisadas por microarrays

Idade	DNA HPV negativo n (%)	DNA HPV positivo n (%)
<= 30	104 (51,5)	98 (48,5)
31-50	562 (70,9)	231 (29,1)
>50	163 (72,1)	63 (27,9)

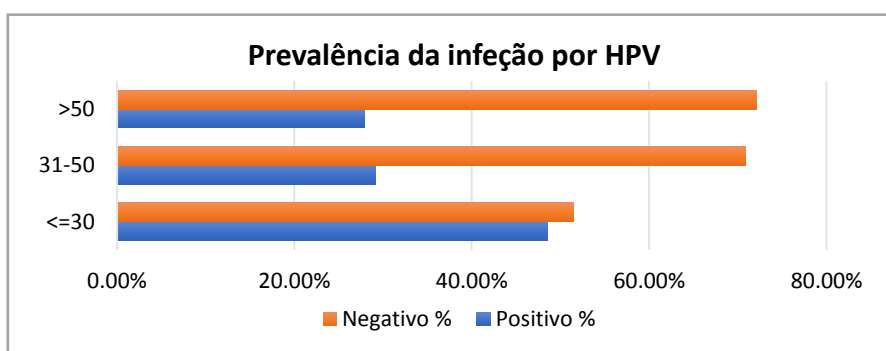


Figura 5.4 - Prevalência da infecção por HPV por faixa etária nas amostras analisadas por CLART microarray

2.3. Anyplex™ II HPV28 Detection

A técnica Anyplex também apresenta resultados em amostras de mulheres e homens. As amostras do sexo feminino perfaziam um total de n = 1116, das quais 682 (61,1%) testaram negativo e 434 (38,9%) testaram positivo. Nesta técnica, obtiveram-se apenas 24 amostras do sexo masculino, resultando em 14 (58,3%) amostras negativas e 10 (41,7%) positivas (tabela 5.5).

Tabela 5.5 - Caracterização das amostras por gênero (técnica Anyplex HPV28)

Gênero	DNA HPV negativo n (%)	DNA HPV positivo n (%)
F	682 (61,1)	434 (38,9)
M	14 (58,3)	10 (41,7)

Apresentando os dados por faixa etária (tabela 5.6), 186 amostras pertenciam a indivíduos (femininos e masculinos) com idade inferior a 30 anos, com 50% de amostras positivas. Na faixa etária dos 31-50, 36,2% das amostras foram testadas positivas, assim como 38,5% das amostras de indivíduos com mais de 50 anos. De novo, a faixa etária dos 31-50 anos continha o maior número de amostras testadas (n = 694) (figura 5.5).

Os valores de percentagem nas amostras masculinas estão incluídos nos resultados da tabela 5.6. Das 10 amostras testadas positivas de indivíduos do sexo masculino, 3 pertenciam a jovens com menos de 30 anos, 4 pertenciam à faixa etária dos 31-50 anos e 3 pertenciam aos indivíduos com mais de 50 anos, sendo as percentagens de amostras positivas, 42,9%, 33,3% e 60%, respetivamente, da faixa etária mais jovem para a mais velha.

Tabela 5.6 - Prevalência da infeção por HPV por faixa etária nas amostras analisadas por Anyplex HPV28

Idade	DNA HPV negativo n (%)	DNA HPV positivo n (%)
<= 30	93 (50,0)	93 (50,0)
31-50	443 (63,8)	251 (36,2)
>50	160 (61,5)	100 (38,5)

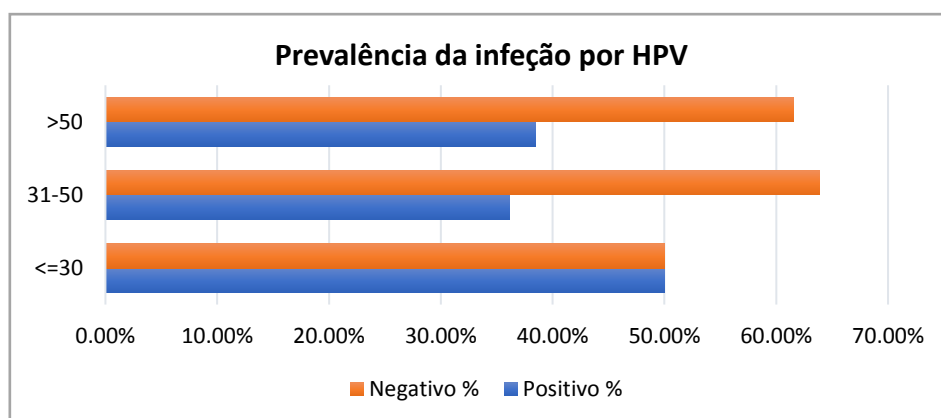


Figura 5.5 - Prevalência da infeção por HPV por faixa etária nas amostras analisadas por Anyplex HPV28

2.4. cobas® HPV Test

O **cobas®** HPV test é uma técnica que permite a detecção e identificação do HPV16 e HPV18, enquanto os outros tipos de HPV são apenas detetados e não identificados. Sendo assim, os dados são apresentados pelos diferentes resultados para o HPV16, o HPV18 e os outros tipos de HPV (tabela 5.8 e 5.9). Para se obter o número de amostras para cada resultado possível da técnica **cobas®** HPV test (HPV16, HPV18 e outros tipos de HPV), as amostras foram contadas tantas vezes quanto o número de resultados divulgados, uma vez que existiam amostras com resultado para HPV 16, HPV18 e outros tipos de HPV, enquanto outras possuíam apenas resultado para HPV16, por exemplo.

Nas amostras com resultado para HPV16 (n = 7216), 7034 (97,5%) foram testadas negativas e 182 (2,5%) foram testadas positivas para o sexo feminino, demonstrando uma prevalência bastante baixa deste tipo de HPV. Esta diferença grande na percentagem de amostras negativas e positivas também foi observado nas amostras para o HPV18. Por outro lado, na detecção de outros tipos de HPV, os resultados já demonstram uma percentagem maior de amostras positivas (15%) no total de 7159 amostras analisadas.

Nas amostras do sexo masculino, existem mais amostras analisadas para HPV18 e outros tipos de HPV. Para HPV16, obtiveram-se apenas resultados de duas amostras, que testaram negativo. Havendo um número de amostras igual, n=60, para HPV18 e outros tipos de HPV, foi para estes últimos que se obtiveram mais amostras positivas para DNA de HPV (n = 8).

Tabela 5.7 - Caracterização das amostras por género e por tipos de HPV identificados no teste (**cobas®** HPV test)

	HPV16		HPV18		Outros tipos de HPV	
	Negativo n (%)	Positivo n (%)	Negativo n (%)	Positivo n (%)	Negativo n (%)	Positivo n (%)
F	7034 (97,5)	182 (2,5)	7098 (99,1)	61 (0,9)	6086 (85,0)	1073 (15,0)
M	2 (100)	0 (0)	59 (98,3)	1 (1,7)	52 (86,7)	8 (13,3)

A apresentação dos resultados por faixa etária (tabela 5.9) demonstra que a percentagem de amostras negativas e positivas é muito semelhante nas três faixas etárias, em cada um dos resultados possíveis do teste (HPV16, HPV18 e outros tipos de HPV). O maior número de amostras analisadas corresponde à faixa etária dos 31 aos 50 anos, nos três resultados possíveis. No entanto, as percentagens mais elevadas de amostras positivas são para os outros tipos de HPV, no total de 1007 amostras na faixa etária igual ou menor a 30 anos, 5094 na faixa etária entre os 31 e 50 anos e 1118 amostras nos de idade superior a 50 anos.

Os valores de percentagem nas amostras masculinas estão incluídos nos resultados da tabela 5.9. Nos resultados de HPV16, as duas amostras masculinas foram negativas, enquanto nos resultados de HPV18 obteve-se apenas uma amostra positiva, na faixa etária com menos de 30 anos. Por outro lado, nos resultados de outros tipos de HPV, das 8 amostras testadas positivas de indivíduos do sexo masculino, 3 pertenciam a jovens com menos de 30 anos, 3 pertenciam à faixa etária dos 31-50 anos e 2 pertenciam aos indivíduos com mais de 50 anos, sendo as percentagens de amostras positivas, 30,0%, 7,9% e 16,7%, respetivamente, da faixa etária mais jovem para a mais velha.

Tabela 5.8 - Prevalência da infeção por HPV por faixa etária nos tipos de HPV identificados no teste (cobas® HPV test)

	HPV16		HPV18		Outros tipos de HPV	
	Negativo n (%)	Positivo n (%)	Negativo n (%)	Positivo n (%)	Negativo n (%)	Positivo n (%)
<=30	997 (97,3)	28 (2,7)	992 (98,5)	15 (1,5)	855 (84,9)	152 (15,1)
31-50	4993 (97,4)	131 (2,6)	5055 (99,2)	39 (0,8)	4341 (85,2)	753 (14,8)
>50	1046 (97,8)	23 (2,2)	1110 (99,3)	8 (0,7)	942 (84,3)	176 (15,7)

3. Frequência de genótipos de HPV nos resultados das técnicas

Duas das quatro técnicas moleculares utilizadas (teste com tecnologia CLART e a técnica Anyplex HPV28) realizadas no Laboratório Germano de Sousa permitiram identificar quais os genótipos presentes nas amostras positivas. A frequência de cada genótipo foi calculada dividindo o número de vezes que um genótipo estava presente nas amostras pelo número total de amostras positivas em cada técnica. Esta contabilização foi realizada com o intuito de averiguar os genótipos mais frequentes nas amostras analisadas, a fim de perceber quais os tipos de HPV mais frequentes e se estão em discordância com os genótipos presentes nas vacinas atualmente em uso. Nas amostras analisadas existiam diversas coinfeções (infecções por mais do que 1 tipo de HPV), o que levou a que algumas amostras fossem contabilizadas no número de vezes igual ao número de genótipos presentes nas mesmas.

3.1. Tipagem por CLART *microarray*

A análise de frequências de genótipos por faixa etária (figura 5.7), nas amostras testadas pela tecnologia CLART *microarray*, é interessante notar que o HPV53 foi um dos três mais frequentes em todas as faixas etárias, sendo o mais frequente nas pacientes com idade compreendida entre os 31 e 50 anos (15,2%) e na faixa etária com mais de 50 (17,5%), enquanto que na faixa etária até 30 anos, foi o segundo mais frequente (14,3%), com o HPV51 sendo o mais prevalente (22,5%). Na faixa etária dos 31 aos 50 anos o segundo genótipo mais frequente foi o HPV54 com 11,3%, enquanto na faixa etária com mais de 50 anos se obtiveram dois tipos de HPV com a mesma prevalência de 14,3%, o HPV58 e o HPV51.

Em comum nas três faixas etárias, existem outros tipos de HPV que são muito frequentes, com percentagem acima dos 10%, como o HPV16, o HPV66, o HPV56 e o HPV42. Em relação ao HPV16, na faixa etária com menos de 30 anos a sua prevalência é de 10,2%, enquanto na faixa etária dos 31 aos 50 anos é de 9,5% e na faixa etária com mais de 50, é de 11,1%. O HPV 18 não é um dos mais frequentes na análise, apesar de, entre as três, ser mais frequente na segunda faixa etária com 4,3%.

Os genótipos menos frequentes na faixa etária mais jovem foram o HPV43, 62, 69 e 71, que não foram detetados em nenhuma amostra. Nos indivíduos de 31 a 50 anos, a menor prevalência de HPV foi nos genótipos 26 e 69, ambos com 0,4%. Já na faixa etária com mais de 50 anos, os tipos de HPV menos frequentes foram os HPV11,18, 26, 40, 43, 69 e 84, para os quais não foi encontrado nenhum caso.

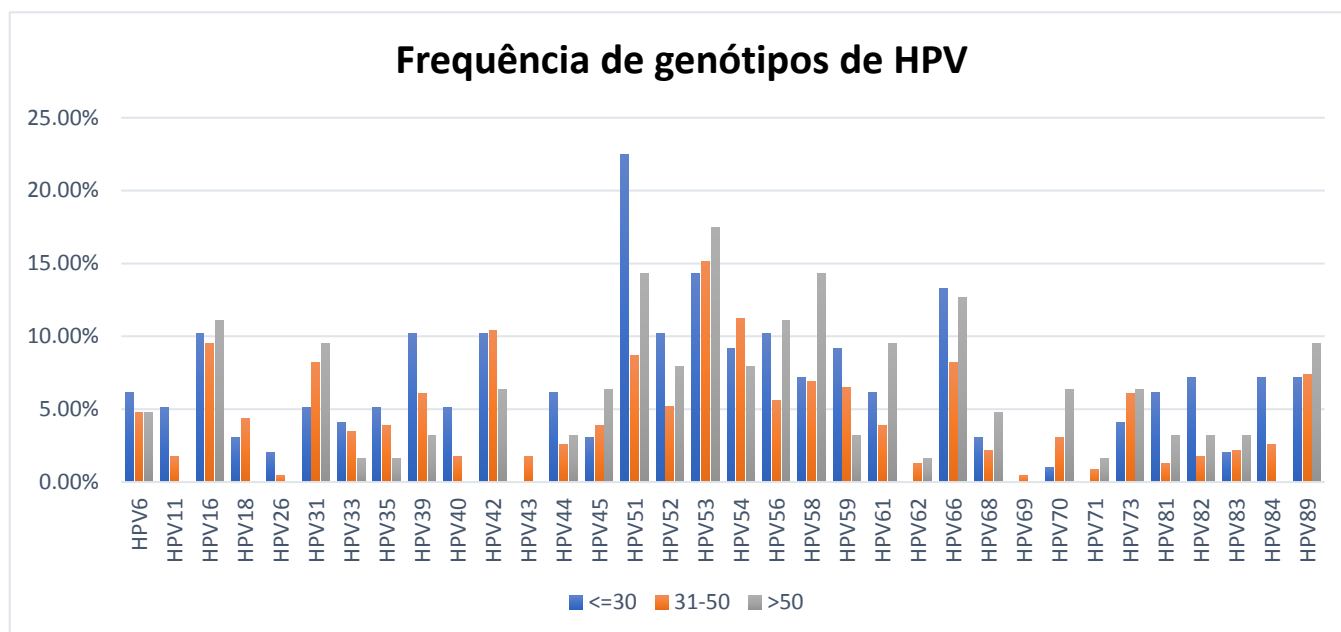


Figura 5.6 - Frequência de genótipos de HPV nas amostras testadas com CLART *microarray*

Nas amostras masculinas testadas positivas (n = 35), os genótipos mais frequentes foram o HPV6 (23%), o 11, o 51 (ambos 20%), o 42 e o 44 (ambos 17%). Na faixa etária dos indivíduos com menos de 30 anos, os tipos de HPV mais frequentes foram o HPV11 (38%), o 6, o 51 e o 56 (os três com valores de 23%). Na faixa etária entre os 31 e 50 anos, os genótipos mais frequentes foram o HPV6 (25%), o 31, o 42 e o 53 (os três com valores de 19%). Na faixa etária dos indivíduos com mais de 50 anos, os genótipos mais frequentes foram o HPV42, o 44 e o 51 (os três com valores de 33%).

3.2. Seegene Anyplex HPV28

Nos resultados obtidos com a técnica Anyplex HPV28 (figura 5.8), o genótipo mais prevalente no total de amostras das três faixas etárias é o HPV42, sendo o tipo de HPV mais prevalente na faixa etária com menos de 30 anos (23,7%), o segundo mais frequente na faixa etária entre os 31 e os 50 anos (12%) e um dos mais frequentes na faixa etária mais velha (11%). O genótipo 31 também é um dos mais prevalentes, com 12,9% na primeira faixa etária, o que faz com que seja o segundo mais frequente nestas idades, enquanto na faixa etária dos 31 aos 50 este é o tipo de HPV mais frequente,

com 13,5%. Na faixa etária mais velha, o HPV31 também é um dos mais frequentes, com 11,0%, enquanto o mais prevalente é o HPV16 com 21,0%.

Nos indivíduos com menos de 30 anos, o HPV53 e 66 foram tão frequentes quanto o HPV31, com 12,9%, e os HPV51, 59 e 68 também tiveram prevalências acima dos 10%, com 10,8%. No caso da segunda faixa etária, os genótipos mais frequentes depois do 31 foram o 16, o 42 e o 52 com 12,0%. O HPV54, 51 e 53 também foram muito frequentes, com prevalência acima dos 10%. Na faixa etária com mais de 50 anos, o segundo genótipo mais prevalente foi o 53, com 18% e o terceiro foi o 54, com 16%. Outros três tipos de HPV muito prevalentes foram o HPV52 e 68 com 14% e o HPV61 com 11%. O HPV18 foi o genótipo menos frequente na faixa etária mais jovem e na faixa etária com mais de 50 anos, com 0% de frequência nas amostras. Nos indivíduos de 31 a 50 anos, a menor prevalência de HPV foi nos genótipos 11 e 43, com 0,4% e 0,8%, respectivamente.

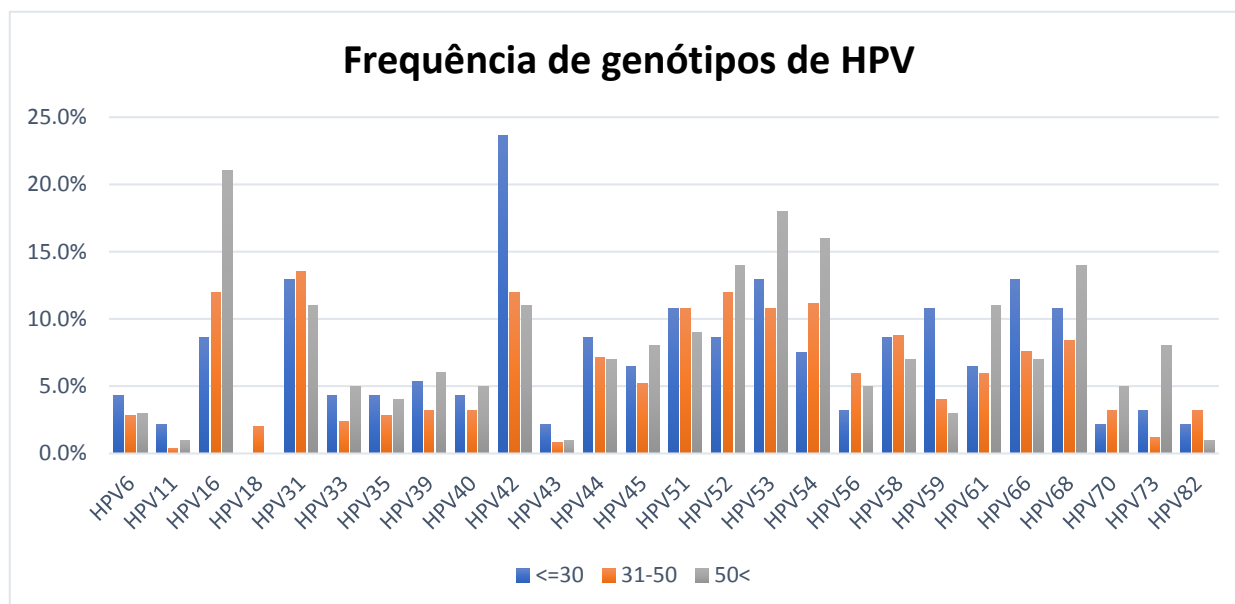


Figura 5.7 - Frequência de genótipos de HPV nas amostras testadas com Anyplex HPV28

Nas amostras masculinas testadas positivas (n = 10), os genótipos mais frequentes foram o HPV6, o 11 e o 53 (todos com valores de 30%). Na faixa etária dos indivíduos com menos de 30 anos, o tipo de HPV mais frequente foi o HPV11 (67%). Na faixa etária entre os 31 e 50 anos, o genótipo mais frequente foi o HPV53 (50%). Na faixa etária dos indivíduos com mais de 50 anos, foi detetada apenas uma amostra positiva para cada genótipo identificado: o HPV6, o 11, o 31, o 52, o 53 e o 58 (valores de 33%).

VI. Discussão

Passados 12 anos após a introdução da primeira vacina contra o vírus do Papiloma Humano (HPV) no Plano Nacional de Vacinação em Portugal, é importante conhecer a epidemiologia do vírus para otimizar os programas de rastreio de cancro do colo do útero e da infeção por HVP e para adaptar os programas de vacinação aos tipos de HPV mais prevalentes atualmente na população portuguesa.

Neste trabalho, procurou-se obter informação sobre a prevalência de HVP e sobre a frequência dos genótipos em amostras portuguesas que chegaram ao Laboratório Germano de Sousa para serem analisadas, inferir sobre os testes moleculares usados para o diagnóstico de HPV e concluir acerca da discordância entre os genótipos presentes nas vacinas atualmente administradas e os mais frequentes nas amostras analisadas, o que indica a eficácia da vacina. A discussão vai abordar os resultados obtidos pelas quatro técnicas diferentes utilizadas no Centro de Medicina Laboratorial Germano de Sousa e será feita uma análise acerca dos testes moleculares e da vacinação.

1. Prevalência da infeção por HPV

A prevalência da infeção por HPV obtida pelos diferentes testes moleculares difere, o que pode ser devido ao facto de umas técnicas detetarem mais tipos de HPV que outras e/ou ao facto dos métodos Captura Híbrida e Cobas 16/18 serem usados como rastreio e os outros dois, CLART *microarray* e Anyplex HPV28 serem usados como testes de segunda linha, após a obtenção de um resultado positivo nos testes de primeira linha. No teste de captura híbrida, a prevalência de HPV foi de 33,3%, na técnica CLART *microarray*, o valor foi menor, com prevalência de 30,8%, mas o número de amostras analisadas por esta técnica era superior. Por outro lado, no teste Anyplex HPV28, com um valor de amostragem semelhante à técnica CLART *microarray*, a prevalência foi de 38,9%, superior à dos dois testes mencionados. No teste Cobas, a prevalência foi de 18,4%, mas é necessário ter em conta que algumas amostras foram contadas mais do que uma vez, o que faz com que este valor calculado seja superior ao valor real de prevalência nas amostras testadas com Cobas. Mesmo assim, esta é a menor prevalência entre os cinco testes.

A partir dos valores apresentados, pode-se concluir que a prevalência varia entre 18,4%-38,9%. No estudo CLEOPATRE (Pista et al., 2012) com amostras portuguesas foi calculada uma prevalência de 19,4% para a infeção por HPV, valor que está dentro

do intervalo obtido neste estudo. Adicionalmente, no estudo de Rocha *et al.* (2017) com amostras de mulheres jovens vacinadas obteve uma prevalência de infecção mais alta, de 28,3%, mas também dentro do intervalo 18,4%-38,9%. Neste estudo português, o número de amostras era bastante pequeno ($n=152$), ao contrário do estudo de Sousa *et al.* (2018), que tinha um número de amostras de $n=104993$ e obteve uma prevalência de 10,2%, valor muito abaixo dos descritos nos outros estudos e no intervalo encontrado neste estudo.

2. Prevalência da infecção por HPV por faixa etária

Em relação à prevalência por faixa etária, não se obtiveram diferenças significativas ($p > 005$) entre as faixas etárias para a Captura Híbrida ($p = 0,315$) e no teste Cobas para outros tipos de HPV apenas identificados ($p = 0,713$) e para HPV16 ($p = 0,668$). Por outro lado, obtiveram-se diferenças significativas entre as faixas etárias para o teste Cobas nos resultados positivos para HPV18 ($p = 0,034$), para o teste CLART *microarray* ($p < 0,001$) e para o teste Anyplex HPV28 ($p = 0,016$).

Estes resultados não são totalmente os esperados, uma vez que diversos estudos a nível europeu e mundial concluíram que a idade é um fator que influencia a infecção por HPV. Nas técnicas onde se obtiveram diferenças significativas, a prevalência era superior na faixa etária mais jovem e inferior na faixa etária mais velha. No entanto, nas técnicas cujos dados não apresentaram diferenças significativas, o número de amostras entre as faixas é bastante diferente, sendo geralmente superior na faixa etária dos 31-50 anos. Esta diferença na amostragem poderá ter interferido com os resultados da análise.

No estudo de Pista *et al.* (2012), a prevalência de infecção por HPV em mulheres com menos de 25 anos era de 55,8% e cerca de 11,3% em mulheres com mais de 50 anos. Também no estudo de Sousa *et al.* (2018), verificaram-se diferenças entre as idades das mulheres para a prevalência de infecção por HPV, onde houve um máximo de 17,1% na idade dos 25 anos e um mínimo de 6,2% na idade dos 64 anos. Estes valores corroboram a evidencia que as infeções por HPV são mais frequentes em idades mais jovens e começam a diminuir a partir dos 45 anos (Sousa *et al.*, 2019). Esta tendência deve-se principalmente à maior atividade sexual nas idades mais jovens, aos comportamentos de risco e ao número superior de parceiros sexuais.

3. Frequências de genótipos de HPV

As frequências de genótipos encontradas na técnica CLART *microarray* e no teste Anyplex HPV28 podem ser consultadas nos anexos, na tabela 9.1 e 9.2, respetivamente. No teste Cobas, as frequências do HPV16 e 18 encontram-se apresentadas na tabela 5.8. Os genótipos mais frequentes entre os dois testes que identificam os tipos de HPV presentes foram o genótipo 51, com prevalências entre 10,4%-13% e o genótipo 16, com prevalências entre 10%-14,4%. Globalmente, este valor de HPV16 era esperado, uma vez que o HPV16 e 18 são responsáveis por 71% do cancro cervical (Martel et al., 2017). Alguns tipos de HPV apresentam uma frequência elevada entre os testes CLART *microarray* e Anyplex HPV28. Sendo assim, o tipo de HPV53 (15,3% e 12,8%, respetivamente), 42 (9,7% e 14,2%, respetivamente) e 54 (10,2% e 11,5%, respetivamente) têm uma prevalência elevada nestes dois testes.

Resumindo, os genótipos de HPV mais relevantes nas amostras são, nos de alto risco, o 16 e 51; nos possíveis de alto risco, o 53 e nos de baixo risco, o 42 e o 54. No cancro do colo do útero, a combinação de HPV6/11/16/18/31/33/45/52/58 representa 90% dos casos de cancro (Martel et al., 2017). Ou seja, dos genótipos mais frequentes nos resultados deste trabalho, quatro deles não fazem parte desse conjunto de tipos de HPV que provocam cancro cervical, mas com uma atual prevalência elevada, o HPV51 de alto risco pode vir a ter uma importância elevada nos casos do cancro do colo do útero. No estudo de Sousa *et al.* (2018), os genótipos indicados como mais frequentes são o HPV16, 39, 31, 68, 52 e o 51, enquanto no estudo de Rocha *et al.* (2017), os genótipos mais frequentes foram o 51, 53, 66 e 42. É de notar que nestes dois estudos, o único genótipo em concordância é o HPV51, que também foi considerado um dos mais prevalentes no presente estudo. Tal discrepância nos resultados dos dois estudos portugueses pode ser devido à população em estudo, uma vez que o estudo de Sousa *et al.* (2018) foi realizado apenas com amostras de mulheres da região norte de Portugal e possui um número de amostras muito elevado, enquanto o estudo de Rocha *et al.* possui amostras de 19 instituições, mas com uma amostragem muito inferior.

Em termos de concordância com o presente estudo, os resultados obtidos vão de encontro aos obtidos por Sousa *et al.* (2018) ao indicarem o HPV16 e 51 como dos mais prevalentes. Por outro lado, os resultados também apresentam alguma concordância com os obtidos por Rocha *et al.* (2017) ao concluírem os genótipos 51, 53 e 42 como dos mais prevalentes. No entanto, estes dois estudos apresentam metodologias diferentes, tendo Sousa *et al.* (2018) feito uma análise com o teste Anyplex, enquanto Rocha *et al.* (2017) realizou análise com a técnica de *microarrays*. Os genótipos considerados mais frequentes em cada estudo são comuns aos dois

testes, ou seja, ambos os testes identificam estes tipos de HPV, o que leva a concluir que a discrepância nos resultados não é devido à diferença de genótipos identificados pelo teste CLART *microarray* e o Anyplex HPV28. Desta forma, torna-se difícil comparar e tirar conclusões sobre a frequência de genótipos, visto existirem, para além das diferenças encontradas na população e na metodologia, muitos fatores externos que afetam os resultados obtidos. Um fator que também dificulta esta comparação é, no presente estudo, os resultados provirem de diferentes técnicas, não permitindo realmente comparar os valores obtidos. Estas discrepâncias seriam de esperar, uma vez que os testes realizados por real time PCR demonstram uma sensibilidade analítica superior que os testes realizados por *microarray* (Cornall et al., 2017). Estes fatores poderão ser o que contribui para diferenças encontradas na prevalência da infeção por HPV em diferentes estudos.

O número de amostras masculinas neste estudo é bastante reduzido, quando comparado com o de amostras femininas, mas podem-se retirar algumas conclusões acerca da concordância de genótipos mais frequentes nas amostras masculinas e femininas. Os genótipos mais frequentes nas amostras femininas foram o 16, o 51, o 53, o 42 e o 54, enquanto nas amostras masculinas foi o HPV6 e 11, em comum no teste CLART *microarray* e o Anyplex HPV28. No método CLART *microarray*, o genótipo 51 foi um dos mais frequentes, enquanto o HPV53 foi um dos mais frequentes no teste Anyplex HPV28. Com base nestes resultados, pode-se concluir que o HPV6 e 11 (ambos de baixo risco) prevalecem nas amostras masculinas incluídas no presente estudo, ao contrário da sua prevalência nas amostras femininas, que é muito baixa. No entanto, os outros dois mais frequentes nas amostras masculinas, HPV51 e HPV53 são também dos mais frequentes nas amostras femininas, o que poderá indicar que os homens transmitem o vírus às parceiras sexuais. Estas conclusões são interessantes, mas seria necessário um número muito superior de amostras masculinas para obter resultados mais sólidos sobre a concordância de genótipos nas amostras de ambos os sexos.

4. Testes moleculares para diagnóstico de HPV

A captura híbrida ainda é atualmente o *gold standart* para o diagnóstico de HPV em amostras cervicais. No entanto, este método não identifica os genótipos de HPV de alto risco que possam estar presentes na amostra, fazendo apenas a sua deteção. Este teste apresenta duas limitações principais: não tem controlo de amostra, o que significa que um resultado negativo pode ser um falso negativo se não existir amostra suficiente

para ser testada; os testes moleculares atuais, como os testes de genotipagem, são mais rápidos, mais sensíveis e permitem obter mais informação num só teste.

Da mesma forma, o teste Cobas HPV16/18 é muito usado em laboratórios, identificando apenas o HPV16 e HPV18, embora tenha evidentemente esta vantagem quando comparado com a captura híbrida. Uma vez que os genótipos considerados mais frequentes neste estudo foram o 16 e o 51, e de acordo com outros estudos com amostras portuguesas, a realização destas técnicas em Portugal é relevante para fazer o diagnóstico, mas quando se trata de outros tipos de HPV, as técnicas com tipagem por PCR são uma mais valia para prevenir um número ainda maior de possíveis casos de cancro do colo do útero. Mulheres que estejam infetadas com genótipos que não estão presentes no grupo que a captura híbrida ou o Cobas detetam, receberão um resultado negativo, o que pode levar a uma infeção persistente e posteriormente cancro. É o caso do genótipo 53, que é um possível genótipo de alto risco. Ainda assim, verifica-se que a maioria dos genótipos mais prevalentes estão abrangidos nos grupos destes quatro testes moleculares usados no Laboratório Germano de Sousa.

5. Vacinação

Na vacina nonavalente (**Gardasil®9, Merck Inc.**) atualmente administrada em Portugal estão incluídos os genótipos 16/18/31/33/45/52/58, sendo a mais completa que existe por agora.

Do grupo de genótipos incluídos na vacina, apenas o HPV16 foi considerado dos mais prevalentes no presente estudo, o que indica que a vacina tem sido eficaz na redução da prevalência dos genótipos incluídos. É possível que a prevalência mais alta de HPV16 seja devido ao elevado número de amostras de indivíduos com mais de 30 anos, uma vez que a maioria dos indivíduos que foram vacinados a partir de 2008, aquando da introdução da vacina em Portugal, pertencem atualmente à faixa etária com menos de 30 anos. Desta forma, importa perceber se os genótipos incluídos na vacina apresentam uma baixa prevalência na faixa etária mais jovem, assumindo que os indivíduos foram vacinados.

Em relação aos genótipos incluídos na vacina nonavalente, os resultados do teste CLART *microarray* mostram que apenas os genótipos HPV16 e HPV52 apresentam uma prevalência acima de 10% (10,2% para ambos), contrariamente aos resultados do teste Anyplex HPV28, onde o único genótipo incluído na vacina com uma prevalência acima de 10% foi o HPV31 (12,9%). Uma vez que os tipos de HPV mais frequentes nesta faixa etária foram o HPV51, o HPV53 e o HPV31, os dados apontam para que a vacina esteja a ser eficaz para a maioria dos genótipos incluídos. O HPV51

e o 53 não pertencem ao conjunto de genótipos da vacina, o que pode significar que a sua prevalência aumentou nos últimos anos em consequência à diminuição da prevalência dos tipos de HPV incluídos na vacina nonavalente.

Considerando os resultados deste estudo, mas também do estudo de Sousa *et al.* (2018) e Rocha *et al.* (2017), seria muito vantajoso incluir os genótipos 51 e 53 a uma nova vacina, para aumentar bastante a proteção que a vacina fornece, uma vez que estes tipos de HPV são bastante prevalentes em Portugal e são de alto risco ou provável de alto risco, podendo no futuro causar numerosos casos de cancro do colo do útero.

No entanto, uma possível desvantagem de alargar ainda mais o espectro de genótipos incluídos na vacinação será a diminuição da adesão ao rastreio por parte das mulheres mais jovens, devido à sensação de proteção que possam sentir pela vacina proteger de tipos de HPV adicionais. É importante continuar a sensibilizar e educar a população para a continua importância do rastreio do CCU, uma vez que as frequências dos genótipos se vão alterando com a inclusão na vacina e novos tipos de HPV de alto risco poderão começar a ficar mais frequentes nas infeções no futuro.

VII. Conclusão

Neste trabalho analisaram-se os resultados de diagnóstico de HPV em amostras recebidas no Laboratório Germano de Sousa, calculando-se prevalências da infeção e dos genótipos de HPV presentes nas amostras testadas positivas. Os resultados foram obtidos a partir de quatro testes moleculares diferentes, todos realizados no Laboratório Germano de Sousa. O facto de se ter obtido dados de quatro técnicas diferentes originou valores de prevalência diferentes para cada técnica: no teste de captura híbrida, a prevalência foi de 33,3%; no teste CLART *microarray*, o valor obtido foi de 30,8%; no teste Anyplex HPV28, a prevalência foi de 38,9 e no teste Cobas, a prevalência foi a mais baixa, obtendo-se o valor de 18,4% (sendo a prevalência real neste teste inferior a este valor, devido a contagens repetidas de amostras).

Os genótipos mais frequentes de HPV nas duas técnicas que os identificam foi o 51 e o 16. Outros genótipos de alto risco e baixo risco foram também muito prevalentes nos indivíduos acima dos 30 anos, estando a maioria deles abrangidos pela vacina nonavalente administrada atualmente, o que confere uma proteção forte para a população portuguesa que foi e será vacinada. No entanto, seria importante no futuro considerar alargar o espectro de genótipos incluídos nesta vacina, uma vez que o genótipo 51 e 53 são bastante prevalentes em Portugal e não estão abrangidos na vacina.

É importante continuar a existir sensibilização e educar, principalmente os jovens, para os comportamentos de risco, no que respeita ao número de parceiros sexuais e a terem relações sexuais protegidas, e educar sobre os programas de rastreio e vacinação, que continuam a ser de extrema importância para prevenir muitos possíveis casos de cancro do colo do útero no futuro.

VIII. Bibliografia

- ACOG. (2017). Committee opinion No. 704: human papillomavirus vaccination. *Obstetrics and Gynecology*, 129(704), 173–178.
- Arbyn, M., Bergeron, C., Klinkhamer, P., Martin-Hirsch, P., Siebers, A. G., & Bulten, J. (2008). Liquid Compared With Conventional Cervical Cytology. *OBSTETRICS & GYNECOLOGY*, 111(1), 167–177.
- ARS Norte. (n.d.). Cancro do Colo do Útero. Retrieved from <http://www.arsnorte.min-saude.pt/ratarios/cancro-do-colo-do-utero>
- Bastos, M. R. A. de. (2011). *Prevalência da Infecção por HPV num Grupo de Mulheres Portuguesas*.
- Benevolo, M., Dona, M. G., & Ravenda, P. S. (2016). Anal human papillomavirus infection: prevalence, diagnosis and treatment of related lesions. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 7210(April).
<https://doi.org/10.1586/14787210.2016.1174065>
- Bhatla, N., & Singhal, S. (2020). Primary HPV screening for cervical cancer. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 65, 98–108.
<https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2020.02.008>
- bioMérieux S.A. (2007). *NucliSENS easyMAG User manual*.
- Braaten, K. P., MD, MPH, & Marc R. Laufer, M. (2008). Human Papillomavirus (HPV), HPV-Related Disease, and the HPV Vaccine. *REVIEWS IN OBSTETRICS & GYNECOLOGY*, 1(1).
- Bruni, L., Albero, G., Serrano, B., Mena, M., Gómez, D., Muñoz, J., ... de Sanjosé, S. (2019a). Human Papillomavirus and Related Diseases in Portugal. *ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre)*, (June).
- Bruni, L., Albero, G., Serrano, B., Mena, M., Gómez, D., Muñoz, J., ... de Sanjosé, S. (2019b). *Human Papillomavirus and Related Diseases in the World*.
- Burd, E. M. (2003). *Human Papillomavirus and Cervical Cancer*. 16(1), 1–17.
<https://doi.org/10.1128/CMR.16.1.1>

- Chaturvedi, A. K., Engels, E. A., Pfeiffer, R. M., Hernandez, B. Y., Xiao, W., Kim, E., ... Gillison, M. L. (2011). Human Papillomavirus and Rising Oropharyngeal Cancer Incidence in the United States. *JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY*, 29(32). <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.36.4596>
- Cho, H. W., So, K. A., Lee, J. K., & Hong, J. H. (2015). *Type-specific persistence or regression of human papillomavirus genotypes in women with cervical intraepithelial neoplasia 1 : A prospective cohort study*. 58(1), 40–45.
- Chun, J.-Y. (2012). High Multiplex Molecular Diagnostics. *Seegene Bulletin*, 1(July).
- Cornall, A. M., Poljak, M., Garland, S. M., Phillips, S., Machalek, D. A., Tan, H., ... Tabrizi, S. N. (2017). *HPV genotype-specific concordance between EuroArray HPV , Anyplex II HPV28 and Linear Array HPV Genotyping test in Australian cervical samples*. 4(February), 79–84. <https://doi.org/10.1016/j.pvr.2017.10.002>
- Cuf. (2019). HPV - Vírus do Papiloma Humano. Retrieved from <https://www.cuf.pt/saude-a-z/hpv-virus-do-papiloma-humano>
- Direção-Geral da Saúde. (2008). *Vacinação contra infecções por Vírus do Papiloma Humano (HPV)*.
- Doorbar, J. (2006). *Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer*. 541, 525–541. <https://doi.org/10.1042/CS20050369>
- Duarte, E., Jr, M., Giuliano, A. R., Palefsky, J., Flores, C. A., Goldstone, S., ... Haupt, R. M. (2014). Incidence , Clearance , and Disease Progression of Genital Human Papillomavirus Infection in Heterosexual Men. *The Journal of Infectious Diseases*, 210. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu077>
- Dunne, E. F., & Park, I. U. (2013). HPV and HPV-Associated Diseases. *Infectious Disease Clinics of NA*, 27(4), 765–778. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2013.09.001>
- Egawa, N.; Egawa, K.; Griffin, H.; Doorbar, J. (2015). *Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia*. 3863–3880. <https://doi.org/10.3390/v7072802>
- Fu, T., Xi, L. F., Hulbert, A., Hughes, J. P., Feng, Q., Schwartz, S. M., ... Milagro, E. De. (2016). Short-term Natural History of High-Risk Human Papillomavirus Infection in Mid-Adult Women Sampled Monthly (Short title: Short-term HPV Natural History in Mid-Adult Women). *Int J Cancer*, 137(10), 2432–2442. <https://doi.org/10.1002/ijc.29602>. Short-term

- Genomica. (2020). PRODUCTS – CLART® TECHNOLOGY. Retrieved from <http://genomica.com/products-clart-technology/?lang=en>
- GENOMICA S.A.U. (2019). *CLART® HPV4*.
- Gillison, M. L., Koch, W. M., Capone, R. B., Spafford, M., Westra, W. H., Wu, L., ... Sidransky, D. (2000). Evidence for a Causal Association Between Human Papillomavirus and a Subset of Head and Neck Cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(9).
- Graham, S. V. (2017). *The human papillomavirus replication cycle , and its links to cancer progression : a comprehensive review*. (August), 2201–2221. <https://doi.org/10.1042/CS20160786>
- Gupta, G., Glueck, R., & Patel, P. R. (2017). HPV vaccines : Global perspectives. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 13(6), 1421–1424. <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1289301>
- Hildesheim, A., Gonzalez, P., Kreimer, A. R., Wacholder, S., Schussler, J., Rodriguez, A. C., ... Sidawy, M. (2017). Impact of human papillomavirus (HPV) 16 and 18 vaccination on prevalent infections and rates of cervical lesions after excisional treatment. *Am J Obstet Gynecol.*, 215(2), 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2016.02.021.Impact>
- Hoppe-seyler, K., Bossler, F., Braun, J. A., Herrmann, A. L., & Hoppe-seyler, F. (2017). The HPV E6 / E7 Oncogenes : Key Factors for Viral Carcinogenesis and Therapeutic Targets. *Trends in Microbiology*, xx, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.07.007>
- IARC, & Papillomaviruses, H. (2007). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. In *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. Lyon, France.
- ICO/IARC Information Centre on HPV. (2020). HPV PREVENTION AT A GLANCE. Retrieved from <https://www.hpvcentre.net/hpvatglance.php>
- ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer. (2019). *Portugal Human Papillomavirus and Related Cancers, Fact Sheet 2018*.
- Kwon, M., Ho, K., Park, H., & Woo, H. (2014). Comparison of the Anyplex II HPV28 assay with the Hybrid Capture 2 assay for the detection of HPV infection. *Journal of Clinical Virology*, 59(4), 246–249. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.01.015>

- Lin, C., Hsieh, M., Hung, H., Tsao, S., Chen, S., Yang, H., & Lee, Y. (2018). *Human papillomavirus prevalence and behavioral risk factors among HIV-infected and HIV- uninfected men who have sex with men in Taiwan*. 0(May).
- Liu, Y. U., Li, H., Pi, R., Yang, Y., Zhao, X. I. A., & Qi, X. (2019). *Current strategies against persistent human papillomavirus infection (Review)*. 570–578.
<https://doi.org/10.3892/ijo.2019.4847>
- Martel, C. De, Plummer, M., Vignat, J., & Franceschi, S. (2017). Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. *International Journal of Cancer*, 1–22.
- Mcintosh, P. B., Laskey, P., Sullivan, K., Davy, C., Wang, Q., Jackson, D. J., ... Doorbar, J. (2010). E1 ^ E4-mediated keratin phosphorylation and ubiquitylation : a mechanism for keratin depletion in HPV16-infected epithelium. *Journal of Cell Science*, (123), 2810–2822. <https://doi.org/10.1242/jcs.061978>
- Mcintosh, P. B., Martin, S. R., Jackson, D. J., Khan, J., Isaacson, E. R., Calder, L., ... Doorbar, J. (2008). *Structural Analysis Reveals an Amyloid Form of the Human Papillomavirus Type 16 E1 \wedge E4 Protein and Provides a Molecular Basis for Its Accumulation* . 82(16), 8196–8203. <https://doi.org/10.1128/JVI.00509-08>
- Mirabello, L., Clarke, M. A., Nelson, C. W., Dean, M., Wentzensen, N., Yeager, M., ... Burk, R. D. (2018). The Intersection of HPV, Genomics and Mechanistic Studies of HPV-Mediated Carcinogenesis. *Viruses*. <https://doi.org/10.3390/v10020080>
- Moody, C. A. (2017). *Mechanisms by which HPV Induces a Replication Competent Environment in Differentiating Keratinocytes*. <https://doi.org/10.3390/v9090261>
- Okunade, K. S. (2019). Human papillomavirus and cervical cancer. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 0(0), 1–7.
<https://doi.org/10.1080/01443615.2019.1634030>
- Organização Mundial de Saúde. (2017). *Guia sobre a introdução da vacina contra o VPH nos programas nacionais de vacinação [Guide to introducing HPV vaccine into national immunization programmes]*. Retrieved from
<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/253123/9789248549762-por.pdf;jsessionid=126AC71D9BB9A6EEC3ABF156C4DBA902?sequence=5>
- Pal, A., & Kundu, R. (2020). *Human Papillomavirus E6 and E7 : The Cervical Cancer Hallmarks and Targets for Therapy*. 10(January).
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03116>

- Pista, A., Costa, C., Saldanha, C., Alberto, J., Moutinho, F., Moutinho, J. M., ... Kempers, J. (2019). *Budget impact analysis of cervical cancer screening in Portugal : comparison of cytology and primary HPV screening strategies*. 1–11.
- Pista, A., Oliveira, C. F. De, Cunha, M. J., Paixao, M. T., & Real, O. (2012). Risk factors for human papillomavirus infection among women in Portugal : The CLEOPATRE Portugal Study. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 118(2), 112–116. <https://doi.org/10.1016/j.ijgo.2012.03.028>
- Pytynia, K. B., Dahlstrom, K. R., Sturgis, E. M., & Surgery, N. (2014). *Epidemiology of HPV-associated oropharyngeal cancer*. 50(5), 380–386. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2013.12.019>.Epidemiology
- QIAGEN. (n.d.). *Instruções de utilização do teste digene® HC2 HPV DNA*.
- Reis, M., & Matos, M. G. De. (2019). *Comportamentos sexuais de risco nos adolescentes : resultados do estudo HBSC 2018*. 1, 149–158.
- Rocha, R., & Verdasca, N. (2017). *_ Primeiro estudo em Portugal sobre a identificação dos genótipos do vírus do papiloma humano (HPV) numa população feminina vacinada com atividade sexual ativa*. 51, 4–9.
- Roche Molecular Systems Inc. (2015). *cobas ® HPV Test*.
- Sabeena, S., Bhat, P., Kamath, V., & Arunkumar, G. (2017). Possible non-sexual modes of transmission of human papilloma virus. *Japan Society of Obstetrics and Gynecology*, 43(3), 429–435. <https://doi.org/10.1111/jog.13248>
- Shanmugasundaram, S., & You, J. (2017). Targeting Persistent Human Papillomavirus Infection. *Viruses*, (9). <https://doi.org/10.3390/v9080229>
- Sheedy, T., & Heaton, C. (2019). HPV-associated oropharyngeal cancer. *Journal of the American Academy of PAs*, 32(9). <https://doi.org/10.1097/01.JAA.0000578756.52642.cb>
- Sociedade Portuguesa de Ginecologia. (2014). *Consenso sobre infecção por HPV e neoplasia intraepitelial do colo vulva e vagina*.
- Sociedade Portuguesa de Ginecologia. (2017). *Consenso Nacional sobre Vacinas contra HPV*.

- Sousa, H., Tavares, A., Campos, C., Marinho-dias, J., & Brito, M. (2019). High-Risk human papillomavirus genotype distribution in the Northern region of Portugal : Data from regional cervical cancer screening program. *Papillomavirus Research*, 8(July), 100179. <https://doi.org/10.1016/j.pvr.2019.100179>
- Spence, T., Bruce, J., Yip, Lk. W., & Liu, F.-F. (2016). HPV Associated Head and Neck Cancer. *Cancers*, (8), 1–12. <https://doi.org/10.3390/cancers8080075>
- Syrjanen, S. (2018). Oral manifestations of human papillomavirus infections. *Oral Sciences*, 126, 49–66. <https://doi.org/10.1111/eos.12538>
- Tumban, E. (2019). A Current Update on Human Papillomavirus-Associated Head and Neck Cancers. *Viruses*, (11).
- Vonsky, M. S., Runov, A. L., Gordeychuk, I. V, & Isaguliants, M. G. (2019). *Therapeutic Vaccines Against Human Papilloma Viruses : 84(7)*, 800–816.
- Vonsky, M., Shabaeva, M., Runov, A., & Lebedeva, N. (2019). *Carcinogenesis Associated with Human Papillomavirus Infection . Mechanisms and Potential for Immunotherapy. 84(7)*, 782–799.
- Wang, C. J., Sparano, J., & Palefsky, J. M. (2018). HIV/AIDS, HPV and Anal Cancer. *Surg Oncol Clin N Am*, 26(1), 17–31. <https://doi.org/10.1016/j.soc.2016.07.010.HIV/AIDS>
- World Health Organization. (2019). Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer. Retrieved from [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-\(hpv\)-and-cervical-cancer](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/human-papillomavirus-(hpv)-and-cervical-cancer)

IX. Anexos

Tabelas de frequências dos genótipos de HPV

a. CLART microarray

Tabela 9.1 - Frequência de genótipos de HPV nas amostras testadas pela técnica CLART microarray

GENÓTIPOS	<=30		31-50		>50		TOTAL	
	n	(%)	n	%	n	%	n	%
HPV6	6	6,1	11	4,8	3	4,8	20	5,1
HPV11	5	5,1	4	1,7	0	0,0	9	2,3
HPV16	10	10,2	22	9,5	7	11,1	39	10,0
HPV18	3	3,1	10	4,3	0	0,0	13	3,3
HPV26	2	2,0	1	0,4	0	0,0	3	0,8
HPV31	5	5,1	19	8,2	6	9,5	30	7,7
HPV33	4	4,1	8	3,5	1	1,6	13	3,3
HPV35	5	5,1	9	3,9	1	1,6	15	3,8
HPV39	10	10,2	14	6,1	2	3,2	26	6,6
HPV40	5	5,1	4	1,7	0	0,0	9	2,3
HPV42	10	10,2	24	10,4	4	6,4	38	9,7
HPV43	0	0,0	4	1,7	0	0,0	4	1,0
HPV44	6	6,1	6	2,6	2	3,2	14	3,6
HPV45	3	3,0	9	3,9	4	6,4	16	4,1
HPV51	22	22,5	20	8,7	9	14,3	51	13,0
HPV52	10	10,2	12	5,2	5	7,9	27	6,9
HPV53	14	14,3	35	15,2	11	17,5	60	15,3
HPV54	9	9,2	26	11,3	5	7,9	40	10,2
HPV56	10	10,2	13	5,6	7	11,1	30	7,7
HPV58	7	7,2	16	6,9	9	14,3	32	8,2
HPV59	9	9,2	15	6,5	2	3,2	26	6,6
HPV61	6	6,1	9	3,9	6	9,5	21	5,4
HPV62	0	0,0	3	1,3	1	1,6	4	1,0
HPV66	13	13,3	19	8,2	8	12,7	40	10,2
HPV68	3	3,1	5	2,2	3	4,8	11	2,8
HPV69	0	0,0	1	0,4	0	0,0	1	0,3
HPV70	1	1,0	7	3,0	4	6,4	12	3,1
HPV71	0	0,0	2	0,9	1	1,6	3	0,8
HPV73	4	4,1	14	6,1	4	6,4	22	5,6
HPV81	6	6,1	3	1,3	2	3,2	11	2,8
HPV82	7	7,1	4	1,7	2	3,2	13	3,3
HPV83	2	2,0	5	2,2	2	3,2	9	2,3
HPV84	7	7,1	6	2,6	0	0,0	13	3,3
HPV89	7	7,1	17	7,4	6	9,5	30	7,7

b. Anyplex HPV28

Tabela 9.2 - Frequência de genótipos de HPV nas amostras testadas pela técnica Anyplex HPV28

GENÓTIPOS	<=30		31-50		>50		TOTAL	
	n	%	n	%	n	%	n	%
HPV6	4	4,3	7	2,8	3	3,0	14	3,2
HPV11	2	2,2	1	0,4	1	1,0	4	0,9
HPV16	8	8,6	30	12,0	21	21,0	59	13,3
HPV18	0	0,0	5	2,0	0	0,0	5	1,1
HPV31	12	12,9	34	13,5	11	11,0	57	12,8
HPV33	4	4,3	6	2,4	5	5,0	15	3,4
HPV35	4	4,3	7	2,8	4	4,0	15	3,4
HPV39	5	5,4	8	3,2	6	6,0	19	4,3
HPV40	4	4,3	8	3,2	5	5,0	17	3,8
HPV42	22	23,7	30	12,0	11	11,0	63	14,2
HPV43	2	2,2	2	0,8	1	1,0	5	1,1
HPV44	8	8,6	18	7,2	7	7,0	33	7,4
HPV45	6	6,5	13	5,2	8	8,0	27	6,1
HPV51	10	10,8	27	10,8	9	9,0	46	10,4
HPV52	8	8,6	30	12,0	14	14,0	52	11,7
HPV53	12	12,9	27	10,8	18	18,0	57	12,8
HPV54	7	7,5	28	11,2	16	16,0	51	11,5
HPV56	3	3,2	15	6,0	5	5,0	23	5,2
HPV58	8	8,6	22	8,8	7	7,0	37	8,3
HPV59	10	10,8	10	4,0	3	3,0	23	5,2
HPV61	6	6,5	15	6,0	11	11,0	32	7,2
HPV66	12	12,9	19	7,6	7	7,0	38	8,6
HPV68	10	10,8	21	8,4	14	14,0	45	10,1
HPV70	2	2,2	8	3,2	5	5,0	15	3,4
HPV73	3	3,2	3	1,2	8	8,0	14	3,2
HPV82	2	2,2	8	3,2	1	1,0	11	2,5