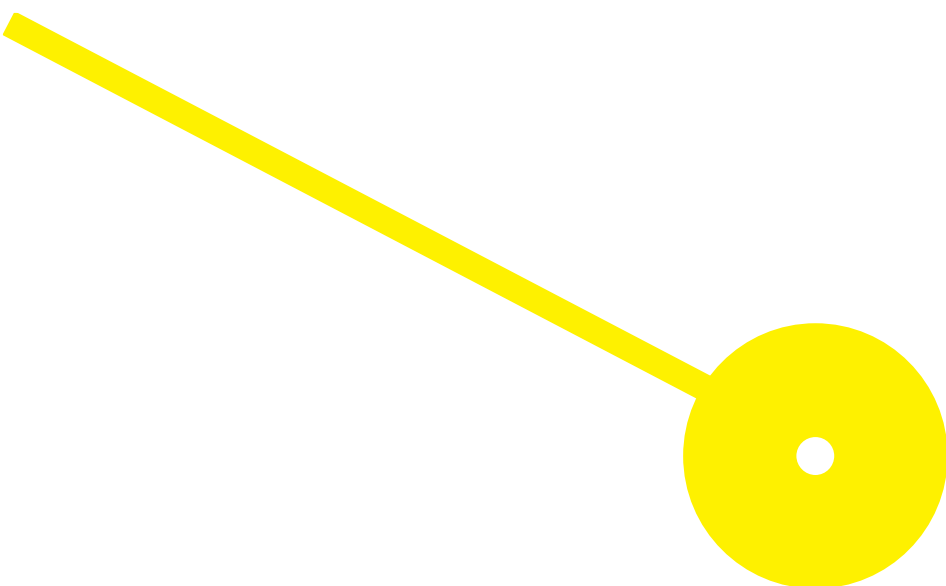




# Quantificação da carga viral de HPV de alto risco e associação com o desenvolvimento de lesões cervicais

Telma Sofia Mota Oliveira

10/2022





**ESCOLA  
SUPERIOR  
DE SAÚDE**



**Quantificação da carga viral de HPV de alto risco e associação com o desenvolvimento de lesões cervicais**

**Autor**

Telma Sofia Mota Oliveira

**Orientadores**

Prof. Doutora Regina Silva

Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto

Prof. Doutora Sílvia Fernandes

Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto

Dissertação apresentado para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em **Técnicas Laboratoriais em Biopatologia – Área de Especialização em Patologia Molecular** pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

## **Agradecimentos**

Agradeço à Prof. Doutora Regina Silva pela disponibilidade, orientação e incentivo ao longo deste processo.

À Prof. Doutora Sílvia Fernandes pela disponibilidade, orientação, revisão crítica e todo o apoio prestado na elaboração deste trabalho.

Agradeço ao serviço de Anatomia Patológica da Unidade Local de Saúde de Matosinhos, especialmente à direção de serviço (Dr<sup>a</sup>. Mrinalini Honovar e Dr<sup>a</sup>. Teresina Amaro) e à coordenação técnica, ao Dr. Amaro Frutuoso, pela possibilidade de realizar este estudo na instituição.

À Dr<sup>a</sup> Daniela Alves, pela ideia de estudo desta tese, pelo incentivo a continuar, e preciosa colaboração na colheita de dados.

Ao técnico Gustavo Lacerda da Abbott pela oferta dos kits para a realização desta tese e pela ajuda na análise dos dados.

À minha amiga Catarina, pela presença constante, pelos sonhos e projetos que idealizamos juntas desde a licenciatura.

Aos meus pais, pelos valores transmitidos, pelas oportunidades dadas todos os dias e pelo incentivo a ter uma formação académica sólida.

## Resumo

O desenvolvimento de métodos quantitativos para estimar a carga viral tem vindo a melhorar a capacidade de controlar a progressão de doenças e avaliar a eficácia dos tratamentos.

Neste estudo, pretende-se estimar a carga viral em mulheres infetadas com o Vírus do Papiloma Humano (HPV) de alto risco, e avaliar a sua associação com os dados clinicopatológicos para determinação da sua utilidade como fator de prognóstico.

Foram selecionadas 365 mulheres com resultado positivo para infeção por HPV de alto risco, determinada por PCR semi-quantitativo. A carga viral foi estimada usando retas de calibração construídas com base em amostras padrão.

Os resultados mostram que existe associação entre a carga viral e o grau das lesões cervicais, verificando-se uma maior carga viral em resultados citológicos de LSIL e HSIL/ASC-H quando comparados com situações reativas ou de NILM ( $p < 0,05$ ). Adicionalmente, uma carga viral superior a 2000 Cp/mL apresenta grande valor prognóstico, uma vez que no *follow up* este grupo de mulheres apresenta uma maior proporção de lesões CIN2/3 ( $p = 0,0235$ ).

O presente estudo transversal sugere que a carga viral pode ser útil na monitorização e *follow up* das lesões cervicais, e deve ser considerado no prognóstico de mulheres com infeção por HPV de alto risco.

**Palavras-chave:** HPV; Carga viral; Citologia; Histologia.

## **Abstract**

The development of quantitative methods to estimate viral load has been improving the ability to control the progression of diseases and assess the effectiveness of treatments.

In this study, our purpose was to estimate the viral load in women infected with the high-risk Human Papilloma Virus (HPV), and evaluate its association with clinicopathological data to determine its usefulness as a prognostic factor.

365 women with a positive result for high-risk HPV infection, determined by semi-quantitative PCR, were selected. Viral load was estimated using straight calibration lines constructed from standard samples.

The results show that there is an association between viral load and the degree of cervical lesions, verifying a higher viral load in cytological results of LSIL and HSIL/ASC-H when compared with reactive or NILM situations ( $p < 0.05$ ). Additionally, a viral load higher than 2000 Cp/mL has prognostic value, since at follow up this group of women has a higher proportion of CIN2/3 lesions ( $p = 0.0235$ ).

The present cross-sectional study suggests that viral load may be useful in monitoring and follow up of cervical lesions, and should be considered in the prognosis of women with high-risk HPV infection.

**Keywords:** HPV; Viral load; Cytology; Histology.

## Índice

1.	Introdução .....	1
1.1.	Dados epidemiológicos sobre o cancro do colo do útero.....	1
1.2.	Biologia do HPV .....	4
1.3.	Infeção pelo HPV e carcinogênese .....	5
1.4.	Papel das infeções múltiplas e reinfeções .....	7
1.5.	Rastreio com base no diagnóstico molecular .....	8
1.6.	Objetivos .....	11
2.	Métodos.....	12
2.1.1.	Seleção da amostragem/recolha de dados .....	12
2.1.2.	Genotipagem e determinação da carga viral de HPV.....	12
2.1.3.	Extração e Genotipagem de HPV .....	13
2.1.4.	Construção de curvas padrão.....	13
2.1.5.	Quantificação da carga viral.....	14
2.3	Análise Estatística .....	14
3.	Resultados .....	16
3.1	Idade das mulheres e genotipagem.....	16
3.2	Genotipagem e correlação citohistológica.....	17
3.3	Determinação da carga viral .....	18
3.4	Associação da carga viral com a idade.....	19
3.5	Associação da carga viral com o resultado citológico.....	20
3.6	Associação da carga viral com o diagnóstico histológico .....	21
3.7	Follow up das pacientes.....	23
3.	Discussão.....	27
4.	Conclusão .....	31
	Referências Bibliográficas.....	32
	ANEXOS.....	I
	Anexo I – Resultado da quantificação da carga viral em casos com mais de um genótipo .....	II

## Índice de Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AGC: Células glandulares atípicas

ARN: Acido ribonucleico

ASC-H: Células pavimentosas atípicas, não sendo possível excluir a lesão de alto grau

ASC-US: Células pavimentosas atípicas de significado indeterminado

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementar

CIN1: Neoplasia cervical intraepitelial grau 1

CIN2: Neoplasia cervical intraepitelial grau 2

CIN3: Neoplasia cervical intraepitelial grau 3

CMV: Citomegalovírus

Cp: Cópias

DSTs: Doenças sexualmente transmissíveis

EBV: Vírus de Epstein-Barr

EPC: Equipamento de proteção coletiva

EPI: Equipamento de proteção individual

VHB: Vírus da Hepatite B

VHC: Vírus da Hepatite C

HPV: Vírus do Papiloma Humano

HSIL: Lesão escamosa intraepitelial de alto grau

IARC: International Agency for Research of Cancer

LCR: Long control region

LSIL: Lesão escamosa intraepitelial de baixo grau

NILM: Negativo para lesão intraepitelial ou malignidade

OMS: Organização Mundial de Saúde

ORF'S: Open Reading frames

PCR: Polymerase Chain Reaction

pRB: Proteína do retinoblastoma

p53: Proteína 53

qPCR: PCR em tempo real quantitativo

ULS: Unidade local de saúde

VIH: Vírus da imunodeficiência humana

VLP's: vírus-like particles

## Índice de Tabelas

Tabela 1. Diferentes genótipos de HPV e risco de oncogenicidade .....	3
Tabela 2. Organização do rastreio do Cancro do Colo do Útero em Portugal .....	9
Tabela 3. Distribuição das amostras com base na genotipagem e faixa etária.....	16
Tabela 4. Distribuição das amostras com base na genotipagem e no exame citopatológico .....	17
Tabela 5. Distribuição das amostras com base na genotipagem e do exame histopatológico.....	18
Tabela 6. Quantificação da carga viral de acordo com os diferentes genótipos/grupos. ....	18
Tabela 7. Quantificação da carga viral de acordo com os diferentes grupos de idade.....	19
Tabela 8. Quantificação da carga viral de acordo com os diferentes resultados citológicos.....	21
Tabela 9. Quantificação da carga viral de acordo com os diferentes resultados histológicos.....	22
Tabela 10. Associação entre a carga viral e o diagnóstico citológico e histológico.....	23
Tabela 11. Avaliação do <i>follow up</i> para mulheres com uma carga viral inferior e superior a 2000 Cp/mL. .....	24
Tabela 12. Avaliação do diagnóstico histológico inicial versus <i>follow up</i> .....	26

## Índice de figuras

Figura 1. Gráfico com as taxas de incidência e mortalidade de cancro, em todas as idades, estimadas no mundo em 2020. ....	1
Figura 2. Gráfico com as taxas de incidência e mortalidade de cancro em mulheres, em todas as idades, estimadas em Portugal em 2020. ....	2
Figura 3. Infecção por HPV e progressão das lesões. A maioria das infeções são assintomáticas e eliminadas espontaneamente, apenas 10% das infeções se tornam persistentes podendo causar lesões pré-malignas que depois podem regredir ou levar ao desenvolvimento de cancro. ....	7
Figura 4. Número de mostras consideradas no estudo. ....	12
Figura 5. Curvas padrão utilizadas para o calculo da carga viral das amostras em estudo. ....	14
Figura 6. Distribuição das amostras de acordo com o genótipo e a carga viral. ....	19
Figura 7. Distribuição das amostras de acordo com a idade e a carga viral. ....	20
Figura 8. Distribuição das amostras de acordo com o resultado citológico e a carga viral. ....	21
Figura 9. Distribuição das amostras de acordo com o diagnóstico histológico e a carga viral. ....	22
Figura 10. Representação gráfica da carga viral, de acordo com o resultado citológico, em mulheres com idade inferior ou superior a 30 anos. ....	25
Figura 11. Representação gráfica da carga viral, de acordo com o resultado histológico, em mulheres com idade inferior ou superior a 30 anos. ....	26

## 1. Introdução

### 1.1. Dados epidemiológicos sobre o cancro do colo do útero

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) e a *International Agency for Research of Cancer* (IARC), estima-se que em 2020 terão sido diagnosticados mais de 604 000 novos casos de cancro cervical e registadas cerca de 342 000 mortes. Cerca de 90% dos novos casos e das mortes ocorreram em países de baixo e médio desenvolvimento económico onde o risco de surgir lesões malignas antes dos 65 anos é de cerca de 1,5%<sup>1,2</sup>.

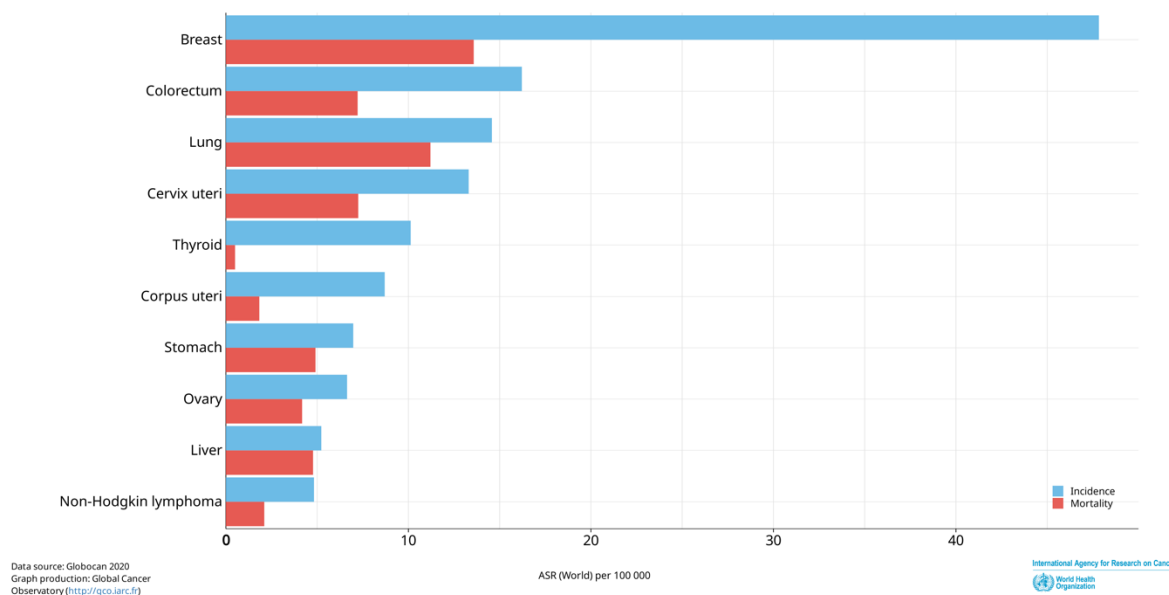


Figura 1. Gráfico com as taxas de incidência e mortalidade de cancro, estimadas a nível mundial, em todas as idades para o ano 2020.

Nos países desenvolvidos, o cancro do colo do útero é responsável por 3,6% dos novos casos, com um risco cumulativo (dos 0 aos 64 anos) de 0,8%. Nos países em desenvolvimento, a sobrevivência a cinco anos é de menos de 50%, enquanto nos países desenvolvidos é de cerca de 66%<sup>1</sup>.

Na Europa, as estimativas atuais indicam que a cada ano, 58 169 mulheres são diagnosticadas com cancro do colo do útero e 25 989 morrem da doença. Este é classificado como o 9º cancro mais frequente entre as mulheres na Europa e o 3º mais comum em mulheres entre os 15 e os 44 anos<sup>2,3</sup>.

Em Portugal, todos os anos são diagnosticados cerca de 750 novos casos de cancro do colo do útero, sendo este o sexto cancro mais comum e o segundo mais frequente entre mulheres com idades compreendidas entre os 15 e os 44 anos. Segundo as estimativas, no ano de 2020, 965 mulheres foram diagnosticadas com cancro do colo do útero e 379 faleceram da doença. Vários estudos indicam que é o quarto cancro mais frequente nas mulheres e que até 2025 este valor tem tendência a diminuir cerca de 23%, no entanto, prevê-se um aumento de 21% na faixa etária dos 45 aos 54 anos<sup>2-4</sup>.

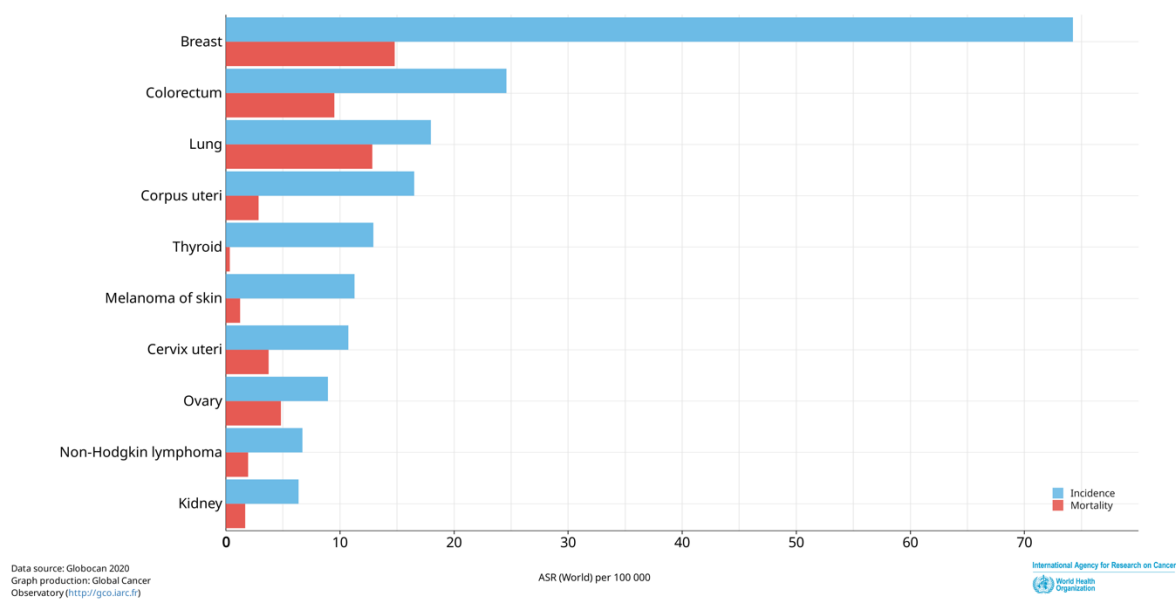


Figura 2. Gráfico com as taxas de incidência e mortalidade de cancro em mulheres, em todas as idades, estimadas em Portugal em 2020.

Na grande maioria dos casos o cancro do colo do útero é assintomático na fase inicial. No entanto, por vezes, pode apresentar alguma sintomatologia, como hemorragias mais abundantes entre os ciclos menstruais ou depois de relações sexuais. Numa fase mais avançada, é frequente este tipo de hemorragia. Outro possível sintoma é o corrimento vaginal persistente, pouco espesso e com odor desagradável<sup>5,6</sup>.

Atualmente, está estabelecida a relação causal entre a infeção pelo Vírus do Papiloma Humano (HPV) e o desenvolvimento de cancro cervical e seus precursores. Os estudos moleculares mostram que o ácido desoxirribonucleico (ADN) do vírus, principalmente dos genótipos de alto risco, está presente em células do epitélio cervical de aproximadamente 99,7% dos casos<sup>7,8</sup>.

Anualmente são infetadas aproximadamente 14 milhões de pessoas em todo o mundo em que 9 milhões são referentes a infeções persistentes. Cerca de 70% dos adultos sexualmente ativos serão infetados por HPV durante a vida. A maioria das infeções são assintomáticas e eliminadas espontaneamente<sup>9</sup>.

Entre os subtipos de HPV, o 16 e 18 foram descritos como potenciais carcinogénicos humanos desde 1983 e estão implicados em 70% das infeções em mulheres com citologia normal, sendo que o HPV 16 causa cerca de 60% e o HPV 18 cerca de 10% dos cancros do colo do útero, e em conjunto com os genótipos 31, 33, 45, 52 e 58 representam mais de 90% de todos os casos. Por sua vez, os genótipos 6 e 11 são os mais persistentes em lesões benignas e pré-malignas e causam aproximadamente 90% das verrugas genitais ou condiloma acuminado<sup>10-15</sup>.

Atualmente, segundo a IARC, os genótipos HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68 pertencem ao grupo 1 de "carcinogénicos para humanos", que estão incluídos na maioria dos testes comercializados, podendo a sua identificação ser útil para o desenvolvimento de futuras vacinas ou estratégias de prevenção; existem ainda genótipos de baixo risco e de risco indeterminado (Tabela 1)<sup>16-20</sup>.

As infecções por HPV de alto e baixo risco são extremamente comuns, com pico em mulheres jovens após o início da atividade sexual. A maioria das infecções cervicais por HPV são curadas em cerca de 12 meses, sem lesão residual no colo do útero, no entanto, 10–40% das mulheres apresenta persistência da infecção, mas sem modificações citológicas<sup>21-25</sup>.

As verrugas genitais são altamente contagiosas tendo um período de incubação compreendido entre três semanas a oito meses, onde a maioria das verrugas desenvolvem-se em cerca de dois a três meses, tendo uma taxa de transmissão de 65% nas relações sexuais. As verrugas genitais podem persistir por longos períodos de tempo, mas raramente existe evolução para malignidade, ocorrendo em 30% dos casos regressão espontânea<sup>26,27</sup>.

Tabela 1. Diferentes genótipos de HPV e risco de oncogenicidade

Potencial Oncogénico	Tipo de HPV
Alto Risco	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66
Provável alto risco	26, 53, 68, 73, 82
Baixo Risco	6, 11, 40, 42, 44, 54, 61, 70, 72, 81, 89
Risco Indeterminado	34, 55, 57, 62, 67, 69, 71, 74, 77, 83, 84, 85, 86, 87, 90, 91

Fonte: editado de Gusakov et al (2020)

A infecção por HPV, particularmente pelos tipos de alto risco, é também responsável pelo desenvolvimento do cancro anogenital e orofaríngeo, sendo detetada em 50% dos cancros do pénis, vulva e vagina e em 85% dos cancros anais e no cancro da cabeça e pescoço<sup>28-30</sup>.

A transmissão do vírus ocorre por via direta epitélio-a-epitélio e mucosa-a-mucosa, mas não acontece através de fluidos corporais como é registado em outras infeções virais<sup>31</sup>.

As doenças sexualmente transmissíveis (DSTs), como o HPV, de uma forma geral têm características que obrigam a considerações especiais na modelação da sua epidemiologia: pois numa fase assintomática o indivíduo portador da doença não tem conhecimento da mesma e por isso não existe alteração dos seus comportamentos<sup>32</sup>.

Ademais o período de evolução, incubação e da probabilidade de infeção é diferente entre ambos os sexos, levando à necessidade de modelar separadamente cada um dos sexos e a avaliar os padrões de contacto entre ambos.

A infeção por HPV é uma causa necessária, mas não suficiente, para o desenvolvimento do cancro do colo do útero. Fatores endógenos e exógenos podem influenciar o curso da infeção, sendo necessário

que eles atuem de forma cumulativa e continua de modo a se produzirem alterações celulares durante um longo período de tempo. O tabagismo, a alta paridade, o uso de contraceptivos hormonais por longos períodos de tempo e a coinfeção pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH) (mulheres que contraíram VIH são 6 vezes mais propensas a desenvolver cancro do colo do útero em comparação com as mulheres sem VIH) foram identificados como cofatores estabelecidos. Outros fatores prováveis são a coinfeção com *Chlamydia trachomatis* e vírus *Herpes simplex* tipo 2, imunossupressão e certas deficiências alimentares. Fatores genéticos e imunológicos do hospedeiro e fatores virais além do tipo, como as variantes do tipo, carga viral e integração viral, provavelmente são importantes, mas ainda não foram claramente identificados<sup>1,28,33,34</sup>.

Vários países, incluindo Austrália, Estados Unidos da América, Dinamarca, e Portugal, foram os primeiros a adotar programas nacionais de imunização contra o HPV para adolescentes antes do início da atividade sexual. A vacina bivalente contém virus-like particles (VLP's) de HPV 16 e 18, e a vacina quadrivalente também contém VLP's do HPV 6 e 11. Ambas as vacinas demonstraram ser seguras, imunogénicas e altamente eficazes contra o cancro do colo do útero e em lesões causadas pelos genótipos 16 e 18. No entanto, estas vacinas não previnem aproximadamente um terço das infeções por HPV potencialmente oncogénicos. Uma vacina contra o HPV de nova geração foi recentemente licenciada na Europa, a vacina nonavalente, direcionada aos genótipos de HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58. Esta vacina é indicada para proteger contra lesões pré-malignas causadas por genótipos de HPV que acometem o colo do útero, vulva, vagina e ânus, bem como verrugas anogenitais causadas por genótipos específicos de HPV<sup>1,35</sup>.

Em Portugal, a vacina quadrivalente contra o HPV está incluída no programa nacional de imunização desde outubro de 2008 para o sexo feminino a partir dos 13 anos, com um programa inicial de recuperação de 3 anos para quem tenha 17 anos. Em outubro de 2014, a população-alvo foi alterada para o sexo feminino com idades entre os 11 e os 14 anos, com o esquema de duas doses. A vacina nonavalente está disponível em Portugal desde 2017 através do plano nacional de vacinação num esquema de duas doses (0 e 6 meses) a administrar a raparigas aos 10 anos de idade. A partir dos 15 anos de idade deve ser feita uma administração de 3 doses (0, 2 e 6 meses), estando demonstrada a eficácia da vacina até aos 45 anos<sup>36-38</sup>.

## 1.2. Biologia do HPV

O HPV está agrupado em cinco géneros: *Alphapapillomavirus*, *Betapapillomavirus*, *Gammapapillomavirus*, *Mupapillomavirus* e *Nupapillomavirus*. No entanto, a maioria dos HPV's com significado clínico são encontrados no género *Alphapapillomavirus*<sup>39</sup>.

O HPV pertence à família de vírus que infeta a pele e as mucosas e pode originar verrugas, tumores benignos (papilomas) e lesões pré-malignas que, dependendo do subtipo do vírus, podem evoluir para lesões malignas<sup>15,40,41</sup>.

Existem atualmente mais de 200 subtipos de HPV que afetam o Homem e desses mais de 100 subtipos já foram isolados e o seu genoma completamente descrito. O HPV pode ainda ser classificado segundo o seu tropismo em cutâneo ou mucoso<sup>15,40,41</sup>.

Todos os subtipos de HPV são vírus sem involucro, de cápside icosaédrica com um genoma circular de ADN de cadeia dupla de pequeno diâmetro (~ 55 nm) composta por 72 capsómeros formados por duas proteínas estruturais, L1 e L2, sendo que a primeira corresponde a 90% do conteúdo proteico do vírus. O seu genoma é dividido em duas regiões codificantes e uma não codificante<sup>42,43</sup>.

As duas regiões codificantes são compostas por *open reading frames* (ORF's), ou seja, sequências de ADN compreendidas entre um codão de iniciação da tradução (ATG) e um codão stop<sup>44</sup>. As ORF's de genes funcionais precoces (do inglês, *early*, E), designadas de E1 a E8, codificam proteínas envolvidas na transcrição, replicação, maturação viral e transformação celular. Ainda não está esclarecida a função dos genes E3 e E8, os quais não estão presentes em todos os genótipos de HPV. As ORF's dos genes que se expressam tardiamente (do inglês, *late*, L), L1 e L2, são responsáveis pela produção de proteínas estruturais necessárias para a produção do capsídeo. O gene L1 é altamente conservado entre os diferentes tipos de HPV's, enquanto o gene L2 é menos conservado, apresentando mais sequências variáveis<sup>7,42</sup>.

A identificação dos diferentes tipos de HPV's é feita por análise completa do seu ADN. A homologia da sequência para a proteína L1, que é o gene mais conservado do seu genoma, vai determinar a classificação por genótipos<sup>45</sup>.

### **1.3. Infecção pelo HPV e carcinogênese**

A maior parte das lesões do colo do útero provocadas pelo HPV regride por si. Apenas 10% das infeções se tornam persistentes podendo causar lesões pré-cancerígenas. Alterações displásicas clinicamente relevantes, podem ocorrer de 1 a 3 anos após a infeção, podendo regredir ou levar cerca de 8-12 anos para o desenvolvimento de doença invasiva, sendo que existem casos de mulheres jovens com cancros rapidamente invasivos que obrigam por isso a cuidados especiais na elaboração dos programas de rastreio e prevenção<sup>41</sup>.

Durante a infeção crónica por HPV, pode ocorrer integração do genoma do vírus dentro da célula hospedeira, cuja persistência está na base do desenvolvimento de neoplasia intraepitelial cervical grau I (CIN I). Este vírus infeta células indiferenciadas da camada basal de epitélios mucosos, que se tornam acessíveis após abrasões ou microlesões. A infeção do epitélio tem início quando os viriões infecciosos se

difundem na zona de transformação do epitélio do colo do útero o que leva à perda de integridade do epitélio de revestimento<sup>42,46,47</sup>.

A supressão mediada pelo vírus de proteínas pro-inflamatórias faz com que exista uma ativação de linfócitos T citotóxicos e/ou expressão limitada de proteínas virais até estadios mais tardios de diferenciação epitelial, o que pode provocar uma tolerância imunitária, que facilita a sua persistência<sup>9</sup>.

Uma vez no interior das células, o genoma do vírus é replicado, permanecendo num número reduzido de cópias. As células, mesmo infetadas, continuam o seu ciclo celular normal, reproduzindo-se e migrando para a superfície do epitélio de onde ocorre descamação. Esta ação de descamação permite a libertação dos vírus que irão infetar células vizinhas e/ou outros hospedeiros.

O HPV não tem atividade citolítica e por isso, não desencadeia reação inflamatória no hospedeiro<sup>47,48</sup>.

Devido às suas particularidades, as proteínas víricas são reconhecidas pelo sistema imunitário do hospedeiro, desencadeando a produção de anticorpos que vão neutralizar o vírus.

A amplificação viral em células diferenciadas ocorre em G2/M. A região não codificante do genoma do HPV (*long control region* – LCR) desempenha uma função reguladora, visto que controla a transcrição das ORF's dos genes E e L. A amplificação ocorre coordenadamente com a expressão de transcritos virais tardios que se inicia a partir de um promotor localizado na ORF E7 e que leva à expressão de altos níveis de E1, E2 e E4 e E5. Além disso, os transcritos tardios que codificam L1 e L2 são gerados a partir do promotor tardio, mas requerem a supressão de sinais de poliadenilação precoces para utilizar elementos de terminação no final de L1. Isso ocorre através de alterações induzidas por vírus no fator de CSTF-64. A síntese de proteínas do capsídeo ocorre coordenadamente com a amplificação, resultando no empacotamento de genomas virais em viriões recentes para libertação nas camadas mais externas<sup>48</sup>.

Está descrito que a integração do ADN do HPV no ADN do hospedeiro é crítica na carcinogénese cervical mediada por E1/E2, em que as propriedades oncogénicas do HPV estão na base da sobreexpressão das proteínas E6 e E7 pela consequente perda da regulação controlada por E2<sup>49</sup>.

A proteína E7, que regula a produção de proteínas celulares, e a proteína E6, que complementa o papel da primeira interação com as proteínas das células do hospedeiro interferindo com a atividade de proliferação celular controlada pela proteína do retinoblastoma (pRb) e pela proteína 53 (p53), respetivamente<sup>42</sup>.

A inativação da p53 e da pRb da célula do hospedeiro pelas proteínas E6 e E7 virais, leva a uma perda da regulação do ciclo celular, facto que leva a uma proliferação celular descontrolada. Ou seja, a E6 vai-se ligar à p53, via E3-ligase E6AP, ocorrendo a sua degradação via ubiquitinação. A degradação da p53 leva à inativação de um de seus alvos – proteína 21 (também conhecido como p21WAF1/Cip1), um inibidor de quinase dependente de ciclina, que impede que as células entrem na fase S, causando a paragem do ciclo celular na fase G1 em resposta a muitos estímulos<sup>50-55</sup>.

A pRb é direcionada para ubiquitinação pela proteína E7, ocorrendo a libertação de fatores de transcrição E2F que migram do citoplasma para o núcleo, promovendo a transcrição de determinados genes, como ciclina E, ciclina A e p16INK4A, um inibidor de CDK4/6, facto que leva à célula a entrar prematuramente na fase S. No entanto, ainda não está esclarecido como a proteína E7 medeia a ubiquitinação da pRb. Em geral, a degradação da p53 e da pRb, mediada por HPVs de alto risco, leva à imortalização celular, favorecendo o desenvolvimento de displasia com consequente progressão para carcinoma invasivo<sup>56-58</sup>. Noutros casos os vírus não adquirem a sua forma madura e a sua presença apenas pode ser detetada pelo seu ADN, sendo designada de infeção latente<sup>42,56,59,60</sup>.

O genoma do HPV16 e HPV18 tem um padrão de resposta à progesterona que pode estimular a replicação do HPV, desempenhando um papel importante no processo de progressão da infeção (transformação). Assim, concentrações elevadas de progesterona podem explicar a maior frequência de lesões malignas no sexo feminino comparativamente ao sexo masculino<sup>61</sup>.

Na maioria das mulheres, a infeção pelo HPV resolve-se espontaneamente entre 8 a 24 meses, particularmente em adolescentes e jovens mulheres. A persistência de infeções por HPV de alto risco demonstra um papel fundamental na progressão das lesões e no desenvolvimento de cancro cervical<sup>41,62</sup>.

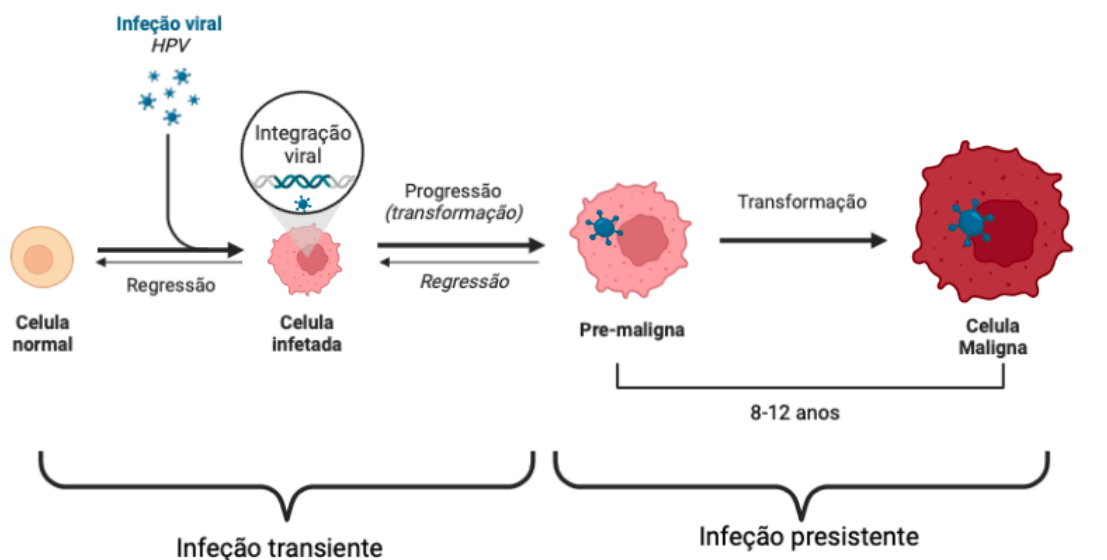


Figura 3. Infeção por HPV e progressão das lesões. A maioria das infeções são assintomáticas e eliminadas espontaneamente, apenas 10% das infeções se tornam persistentes podendo causar lesões pré-malignas, as quais podem regredir ou levar ao desenvolvimento de cancro.

#### 1.4. Papel das infeções múltiplas e reinfeções

Vários estudos têm sugerido que a infeção prolongada pelo mesmo genótipo de HPV é particularmente importante para o processo de carcinogénese<sup>63</sup>.

Independentemente do cancro do colo do útero ser tipicamente monoclonal, ou seja, cada caso está associado apenas a um genótipo de HPV, na carcinogénese a infeção por um genótipo não diminuiu a probabilidade de infeção concomitante por outros genótipos<sup>63</sup>.

A literatura indica que 20% a 30% das mulheres infetadas apresentam mais de um tipo de HPV, o que leva a concluir que em alguns casos a evolução para cancro não depende de apenas um tipo de HPV<sup>37</sup>.

Um estudo realizado recentemente nos Países Baixos revela a existência de infeções duplas, triplas e quadruplas em cerca de 25% das amostras analisadas. Atualmente, ainda não existe evidências científicas que comprovem se a infeção múltipla tem interferência direta ou imunológica na persistência de um dado genótipo ou na progressão da doença<sup>22,28,64</sup>.

Verifica-se a existência de um segundo pico de prevalência de ADN de HPV em mulheres na quarta e quinta década de vida, normalmente pós-menopausa. No entanto não está esclarecido a causa para este pico: se é explicada na totalidade por reativação viral e/ou por uma nova infeção, devido a uma diminuição da imunidade ou de outro mecanismo, ou se a reativação comporta risco oncogénico acrescido. Neste sentido, acrescenta-se que existem vários estudos que afirmam que quando uma nova infeção é causada pelo mesmo genótipo que uma anterior, trata-se frequentemente da mesma variante de HPV<sup>9,65,66</sup>.

## **1.5. Rastreio com base no diagnóstico molecular**

No que diz respeito ao cancro do colo uterino, importa distinguir rastreio oportunista, realizado no âmbito de uma consulta sem periodicidade definida, e rastreio organizado, uma medida de saúde pública, em que a população abrangida deve ser a máxima possível. O propósito de ambos é reduzir a incidência e mortalidade pela doença<sup>67,68</sup>.

É provável que ao longo do tempo, os métodos de rastreio mudem devido ao facto das mulheres mais jovens estarem vacinadas contra o HPV. Prevê-se que a citologia continue a ser utilizada como forma de monitorizar a eficácia da vacina e como método de rastreio na população não abrangida pela vacinação<sup>69</sup>.

Em Portugal, o rastreio do cancro do colo do útero foi iniciado em 1978 e atualmente a base populacional compreende mulheres com idade entre os 25 e os 64 anos, sendo realizado o teste de citologia cervicovaginal de cinco em cinco anos, se tiverem iniciado vida sexual. A partir dos 30 anos de idade o teste de pesquisa de HPV de alto risco é o teste recomendado para o rastreio do cancro do colo do útero, já que antes dos 30 anos a maioria (80%) das infeções são transitórias, podendo, por este motivo, o teste ser realizado de 5 em 5 anos graças à elevada sensibilidade e especificidade associada a um teste negativo<sup>70,71</sup>.

Em Portugal, o resultado citológico é atribuído com base na classificação de *Bethesda*. A classificação citohistopatológica constitui um procedimento muito importante em Oncologia, embora seja

necessário recorrer a outras formas de avaliação para o diagnóstico definitivo e, ou tratamento tornando-se imprescindível efetuar o estadiamento das lesões<sup>72,73</sup>.

Tabela 2. Organização do rastreio do Cancro do Colo do Útero em Portugal

<b>Início do Rastreio</b>	21 anos e/ou 3 anos após o início da atividade
<b>Opções e Periodicidade do Rastreio</b>	<u>&lt; 30 anos</u> : citologia de 3 em 3 anos <u>≥ 30 anos</u> : 3 opções de rastreio: 1. Teste de HPV e citologia reflexa (se HPV positivo) de 5/5 anos 2. Citologia com teste de HPV associado (Co-teste) de 5/5 anos 3. Citologia de 3/3 anos
	Mulheres com idade <u>≥ 65 anos</u> e que, durante os últimos 10 anos, tenham realizado pelo menos três citologias com resultados normais ou um teste de HPV negativo aos 65 anos, têm um risco muito reduzido de vir a desenvolver cancro, pelo que devem discutir com o seu médico a continuação do rastreio.
	Mulheres que tenham sido submetidas a histerectomia total não necessitam de realizar o rastreio do cancro do colo do útero, a não ser que a cirurgia tenha sido realizada para tratamento de lesões malignas ou pré-malignas.

O teste de citologia cervicovaginal, ou mais conhecido como teste de *Papanicolaou*, apresenta limitações e valores de sensibilidade que podem variar entre os 18.6–94%, e de especificidade entre 77.8–99.5%. A citologia em meio líquido permitiu aumentar francamente a sensibilidade para 76%<sup>74</sup>.

O teste de HPV, vulgarmente designado por genotipagem de HPV, deteta a presença da infeção para vários génotipos de HPV de alto risco, através de uma amostra citológica colhida por raspagem do epitélio do colo uterino. O teste de HPV representa uma abordagem mais sensível do que a citologia isolada no rastreio, com um valor preditivo negativo maior. Vários ensaios de HPV estão disponíveis comercialmente, mas apenas alguns são clinicamente validados e aprovados para triagem ou diagnóstico<sup>75,76</sup>.

Em Portugal, estão disponíveis vários testes moleculares para deteção de HPV. O teste de captura híbrida, permite realizar o despiste inicial da infeção, no entanto, apesar de ser dos primeiros a ser implementado em Portugal, não permite genotipar o HPV<sup>77</sup>.

O teste de genotipagem tem a vantagem de permitir identificar os tipos de HPV presentes na amostra, apresentando maior especificidade e valor prognóstico, embora apresente menor sensibilidade que a captura híbrida. A associação da citologia ao teste de HPV tem maior sensibilidade na deteção de lesões pré-malignas, possibilitando o alargamento do intervalo de rastreio nas mulheres de baixo risco<sup>75,76</sup>.

Outros testes complementares podem ser utilizados, como: o teste molecular para a avaliar a expressão de ácido ribonucleico (ARN) mensageiro E6/E7, que constitui um marcador de transformação neoplásica, permitindo diferenciar infecções transitórias de infecções persistentes com potencial oncológico; e o teste de detecção da p16/Ki67 (marcadores de desregulação do controlo do ciclo celular) que permite identificar se a mulher tem elevada probabilidade de progressão para lesões pré-malignas<sup>78</sup>.

Por meio do uso de métodos moleculares quantitativos, surgiu o conceito de “carga viral” na virologia clínica, tendo sido pela primeira vez descrito na literatura em 1987 num relatório sobre a infecção pelo VIH-1<sup>79</sup>.

A carga viral é geralmente definida como o número de partículas de vírus presentes na corrente sanguínea e/ou outras regiões do corpo, geralmente expressa como cópias de ácido nucleico por mililitro. A determinação da carga viral auxilia na definição do prognóstico de uma infecção, nas decisões de tratamento e na monitorização da sua eficácia<sup>80-83</sup>. Atualmente, a medição da carga viral é considerada essencial para avaliação da hepatite viral (como vírus da hepatite B (VHB) e vírus da hepatite C (VHC)), da infecção por VIH-1 e para monitorizar a infecção ou reativação pelo citomegalovírus (CMV) e pelo vírus de Epstein-Barr (EBV) em pacientes imunocomprometidos e/ou com cancro

A *Polymerase Chain Reaction* (PCR) é uma das técnicas mais utilizadas na área de biologia molecular. É um método muito sensível por amplificar regiões específicas de ADN, permitindo comparar diferentes amostras e quantificar, sem necessidade de um organismo vivo. A metodologia de PCR em tempo real quantitativo, conhecida pela sigla qPCR, é uma técnica de biologia molecular que permite a amplificação in vitro de ADN de forma rápida. A grande diferença desta metodologia é a detecção do ADN amplificado em tempo real a cada ciclo de amplificação devido à adição de um oligonucleotídeo marcado com um fluoróforo que se liga ao ADN-alvo<sup>84,85</sup>.

Para a quantificação, é usada uma curva padrão com ADN de interesse, em diluições de concentrações conhecidas que irá servir de referência e permitirá quantificar a amostra a analisar. Portanto, esta técnica permite a amplificação específica do genoma viral e sua quantificação em tempo real. No PCR em tempo real é continua a leitura do sinal de fluorescência a partir de uma ou mais reações em cadeia da polimerase ao longo de uma gama de ciclos. Na qPCR ocorre a conversão dos sinais fluorescentes de cada reação num valor numérico para cada amostra<sup>84,85</sup>.

Por sua vez, o produto de interesse pode ser quantificado de forma relativa ou absoluta. A quantificação absoluta utiliza padrões diluídos em série, com concentrações conhecidas. A curva padrão produz uma relação linear entre o *threshold cycle* (CT) e o ARN ou ADN complementar (cADN). Na quantificação relativa, as alterações na expressão génica são medidas com base num padrão externo ou numa amostra de referência, também conhecida como calibrador<sup>32</sup>.

As estimativas de carga viral também podem ser úteis para triagem, acompanhamento de mulheres já tratadas e para estudos epidemiológicos. As associações entre a carga viral de HPV e o risco de infecção

persistente e de lesões pré-cancerígenas cervicais são controversas, existindo estudos que mostraram associação contrariamente a outros estudos<sup>86-91</sup>.

Vários estudos sugerem que tanto o genótipo quanto uma carga viral elevada de ADN de HPV podem ser utilizados como marcadores para auxiliar na identificação e triagem de mulheres com risco acrescido de progressão para neoplasia, evitando gastos desnecessários em tratamentos invasivos em mulheres de baixo riscos<sup>86-93</sup>.

O significado dos estudos sobre o uso da carga viral em infecções por HPV como marcador de prognóstico de uma infecção viral, nas decisões de tratamento e na monitorização da sua eficácia, juntamente com a importância de novas avaliações moleculares emergentes em virologia clínica têm vindo a ser alvo de grande discussão pela pertinência na erradicação do cancro do colo do útero.

## **1.6. Objetivos**

O presente estudo tem como objetivo estimar a carga viral em mulheres infetadas com HPV de alto risco através de PCR semi-quantitativo e avaliar a associação da carga viral estimada com os dados clinicopatológicos das pacientes, incluindo o resultado citológico, o diagnóstico histológico, a idade das pacientes e a presença de coinfeção. Adicionalmente, pretende-se avaliar o valor da carga viral como fator prognóstico da evolução das lesões cervicais.

## 2. Métodos

### 2.1.1. Seleção da amostragem/recolha de dados

Foram consideradas para este estudo amostras de pacientes seguidas no serviço de ginecologia da Unidade Local de Saúde (ULS) de Matosinhos, Hospital Pedro Hispano, com resultado positivo para infeção por HPV de alto risco e co-teste de citologia cervical, no período compreendido entre 5 de abril de 2021 e 29 de dezembro de 2021. Foram considerados como critérios de exclusão: mau armazenamento/condicionamento das amostras e consequente escassez de amostra para análise.

Desta forma, foram considerados 365 casos como a amostra do presente estudo, tendo sido efetuado o levantamento/recolha de informação clínica pertinente de cada paciente, cumprindo a lei de proteção de dados e de ética que se encontra em vigor na ULS Matosinhos. Os dados recolhidos foram a idade da paciente, resultado citológico, diagnóstico histológico e dados da genotipagem de HPV, assim como diagnósticos anteriores ou posteriores, interpretados pela ULS Matosinhos.

As amostras de citologia foram avaliadas pelos citotécnicos e/ou citopatologistas de serviço, de acordo com a terminologia do sistema de *Bethesda*. O estudo histológico foi realizado por médicos anatomopatologistas de acordo com a terminologia do sistema de *Bethesda*, tendo sido denominados de "atipia/HPV" os casos em que no relatório estava descrito "não se observa displasia". A informação acerca do diagnóstico histológico estava disponível em 157 casos, tendo sido excluídas 17 amostras por falta de material biológico representativo para diagnóstico.

Desta amostra, foram identificadas 222 mulheres que apresentaram exame de genotipagem e/ou histologia e/ou citologia de *follow up*, tendo sido estes exames realizados entre 5 a 12 meses após a genotipagem positiva para HPV.

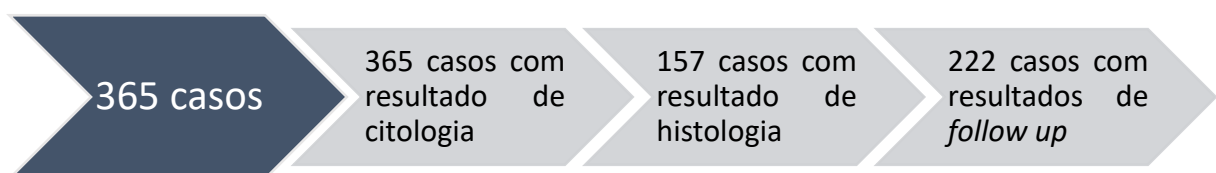


Figura 4. Número de amostras consideradas no estudo no global, e em cada uma das avaliações.

### 2.1.2. Genotipagem e determinação da carga viral de HPV

Todas as experiências descritas foram realizadas de acordo com as normas de biossegurança de acordo com o Manual de Biossegurança da ULS Matosinhos, usando o equipamento de proteção individual (EPI) e equipamento de proteção coletiva (EPC) recomendados. Cada etapa do processamento das amostras foi realizada em salas designadas para o efeito.

### **2.1.3. Extração e Genotipagem de HPV**

Para a extração dos ácidos nucleicos das amostras foi utilizado o kit "Sample Prep Kit 1"<sup>94</sup> da Alinity m, que é específico para isolar os ácidos nucleicos de amostras biológicas para amplificação pela técnica de PCR. A detecção da infecção por HPV foi determinada usando o sistema automatizado Alinity m com o kit "HR HPV AMP KIT"<sup>95</sup> da Alinity m, que permite a preparação de amostras de forma automática e a amplificação de PCR em tempo real e possui um software que integra os dois componentes.

Neste estudo, a detecção e a amplificação por PCR foram realizadas em um único tubo. O kit utilizado é qualitativo e detecta o ADN de 14 genótipos de HPV de alto risco: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68. Especificamente, o kit detecta os genótipos de HPV 16, 18 e 45 e agrupa os outros genótipos em dois grupos, o grupo A (31,33, 52 e 58), e o grupo B (35, 39, 51, 56, 59, 66 e 68).

O sistema também determina o valor CT de cada amostra, que corresponde ao limiar de fluorescência e sinaliza a zona de aumento exponencial do ADN amplificado do HPV detectado.

### **2.1.4. Construção de curvas padrão**

O sistema Alinity m permite a determinação do CT de amplificação viral em cada amostra, que por PCR corresponde a uma determinada carga viral.

Através de uma série crescente de diluições seriadas de amostras de concentração conhecida, cedidas pela Abbott Laboratórios, Lda (Portugal), foram construídas retas de calibração de amostras padrão de comparação com as amostras de carga viral de HPV desconhecido.

As amostras de referência diluídas foram introduzidas no Alinity m, e a sua extração e amplificação foram realizadas simultaneamente com as restantes amostras do estudo.

A utilização da técnica qPCR ao invés da técnica PCR convencional justifica-se neste contexto, pois as amostras que são submetidas ao PCR convencional são manipuladas pós PCR, os resultados são analisados por eletroforese em gel de agarose, o que adiciona tempo à análise, além de aumentar o risco de ocorrer contaminação, sendo o rendimento das amostras inferior.

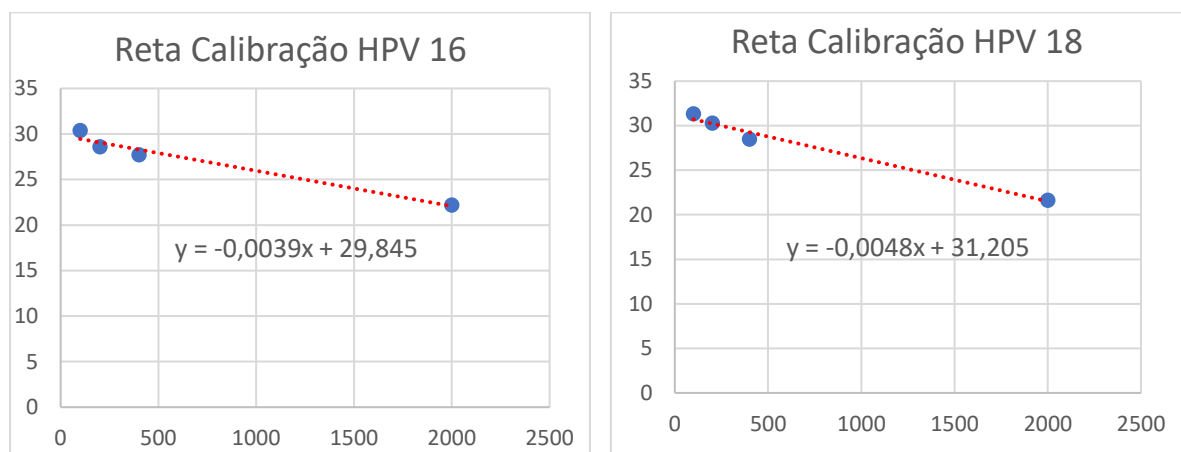


Figura 5. Curvas padrão de HPV16 e HPV18 utilizadas para o cálculo da carga viral das amostras em estudo.

### 2.1.5. Quantificação da carga viral

Uma vez obtidos os valores de CT das amostras padrão a inclinação da reta foi calculada entre as medições consecutivas de carga viral usando um modelo de regressão linear simples ( $y=a+bx$ ).

Depois de obtidas as retas de calibração de cada um dos genótipos em estudo os valores de CT obtidos nas amostras foram utilizados para quantificar a carga viral, produzindo um resultado expresso como o número de cópias (Cp) virais por mililitro (ml). Para a quantificação das amostras com a curva padrão foi considerado o resultado obtido pela reação e considerados fatores como o volume de RNA por reação e o volume de amostra utilizado para extração de ADN. Com base nestes parâmetros foi calculado um fator de conversão de copias/reação para cópias/mL.

Das 365 amostras utilizadas, em 51 amostras não foi possível fazer a correlação pois apresentaram um valor acima da linha de regressão, tendo sido consideradas não válidas. Assim, foram consideradas 314 amostras com resultado válido para quantificação viral; destas amostras 309 apresentavam resultado citológico e 138 apresentavam diagnóstico histológico, podendo ser analisados estatisticamente estes resultados com o resultado da quantificação viral.

### 2.3 Análise Estatística

A análise estatística e respetiva representação gráfica foi realizada recorrendo ao *GraphPad Prism* versão 9.4.1 (San Diego, Califórnia). Nesta análise foram consideradas como variáveis a carga viral, a idade das pacientes, o resultado da citologia, o diagnóstico histológico e o resultado da genotipagem, tendo sido elaboradas tabelas descritivas. Para indicar significado estatístico foi considerado um valor de  $p < 0,05$ . Foi efetuado o teste de normalidade de *D'Agostino & Pearson* para determinação da normalidade das amostras. Consoante o resultado, foram aplicados os testes paramétricos de ANOVA com pós-teste de *Bonferroni*, e não paramétricos de *Kruskal-Wallis* com pós-teste de *Dunn*, para avaliar a diferença entre médias da carga viral nas diferentes variáveis em estudo. Foi utilizado o teste do Qui-Quadrado para

analisar a associação entre a carga viral <2000 Cp/mL e o grau de displasia, tendo ainda sido realizado o cálculo da sensibilidade e especificidade da carga viral como fator de diagnóstico.

### 3. Resultados

#### 3.1 Idade das mulheres e genotipagem

Foi realizado o seguimento de 365 mulheres com teste positivo para HPV de alto risco, sendo que 64 (17,53%) tinham idade inferior a 30 anos, 154 (42,19%) tinham entre 31-45 anos e 147 (49,27%) tinham mais de 46 anos. A média de idade das mulheres foi de 42,5 anos e a mediana de 43 anos, com idades entre os 18 e os 66 anos.

De entre as 365 mulheres, 278 (76,16%) apresentavam infecção por HPV de outros tipos que não o 16 e o 18. No global, a infecção pelos vírus do grupo B é a mais frequente, particularmente em mulheres mais jovens (<30 anos), sendo detetado em 160 mulheres (43,84%) isoladamente, e em 42 mulheres (11,51%) em associação com outros tipos de HPV de alto risco. O HPV 16 foi detetado em 46 mulheres (12,60%) isoladamente e associado a outros tipos de HPV de alto risco em 19 mulheres (5,2%). O HPV 18 foi detetado em 20 mulheres (5,48%) isoladamente e associado a outros tipos de HPV de alto risco em 6 mulheres (1,64%). O HPV 16 e 18 são mais frequentes nas mulheres com mais de 31 anos, existindo 78 casos (21,37%) quando comparado com as mulheres mais jovens.

Das 365 amostras, em 14,25% foi detetado mais de um tipo/grupo de HPV de alto risco, revelando a existência de coinfeções. Contudo, devido à metodologia utilizada para deteção de HPV no presente estudo, é possível que a taxa de coinfeções esteja subvalorizada, por não ser possível distinguir entre infecção única ou coinfeção nas classes de HPV do grupo A e grupo B. Na Tabela 3 está representada a distribuição da genotipagem realizada, por faixa etária.

Tabela 3. Distribuição das amostras com base na genotipagem e faixa etária.

Genotipagem	≤30		[31-45]		≥46		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
HPV16	2	0,55	24	6,58	20	5,48	46	12,60
HPV18	1	0,27	11	3,01	8	2,19	20	5,48
HPV45	1	0,27	6	1,64	4	1,1	11	3,01
Grupo A	14	3,84	34	9,32	28	7,67	76	20,82
Grupo B	35	9,59	54	14,79	71	19,45	160	43,84
Grupo A e B	7	1,92	9	2,47	4	1,1	20	5,48
HPV16 / HPV18	-	-	3	0,82	1	0,27	4	1,1
HPV16 / outros	2	0,55	6	1,64	7	1,92	15	4,11
HPV18 / outros	-	-	1	0,27	1	0,27	2	0,55
HPV45 / outros	2	0,55	6	1,64	3	0,82	11	3,01
Total	64	17,53	154	42,19	147	49,27	365	100

No grupo estudado, 161 (44,11%) mulheres apresentavam genotipagem anterior para HPV de alto risco, revelando que a infecção é persistente nestes casos.

### 3.2 Genotipagem e correlação citohistológica

A análise da relação entre diagnóstico citológico e a genotipagem também foi efetuada nas 365 amostras (Tabela 4), sendo o resultado de ASC-US o mais atribuído (41,37% dos casos) para todos os tipos de vírus de alto risco, à exceção do vírus do tipo 18. As lesões escamosas intraepiteliais de alto grau (HSIL) foram observadas essencialmente em mulheres com infecção por vírus do tipo 16.

Tabela 4. Distribuição das amostras com base na genotipagem e no exame citopatológico

Genotipagem	NILM		Alterações reativas*		ASC-US		LSIL		ASC-H / HSIL		AGC		Total	
	N	%	N	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
HPV16	4	1,1	5	1,37	17	4,66	6	1,64	14	3,84	1	0,27	49	13,42
HPV18	-	-	9	2,47	8	2,19	3	0,82	-	-	-	-	20	5,48
HPV45	2	0,55	2	0,55	7	1,92	1	0,27	-	-	-	-	10	2,74
Grupo A	12	3,29	7	1,92	31	8,49	18	4,93	8	2,19	1	0,27	77	21,1
Grupo B	18	4,93	25	6,85	68	18,63	43	11,78	7	1,92	-	-	161	44,11
Grupo A e B	1	0,27	3	0,82	8	2,19	7	1,92	-	-	-	-	19	5,21
HPV16/HPV18	-	-	2	0,55	1	0,27	-	-	1	0,27	-	-	4	1,1
HPV16/outros	-	-	2	0,55	5	1,37	4	1,1	2	0,55	-	-	13	3,56
HPV18/outros	-	-	-	-	1	0,27	-	-	-	-	1	0,27	2	0,55
HPV45/outros	-	-	-	-	5	1,37	3	0,82	2	0,55	-	-	10	2,74
<b>Total</b>	<b>37</b>	<b>10,14</b>	<b>55</b>	<b>15,07</b>	<b>151</b>	<b>41,37</b>	<b>85</b>	<b>23,29</b>	<b>18</b>	<b>9,31</b>	<b>3</b>	<b>0,82</b>	<b>365</b>	<b>100</b>

\*padrão atrófico/alterações reativas à inflamação

Em 157 amostras, foi possível analisar a relação entre diagnóstico histológico e a genotipagem (Tabela 5). Nesta análise, verifica-se que o diagnóstico histológico mais frequente é o de neoplasia cervical intraepitelial grau 1 (CIN1), em 71,34% dos casos, seguindo-se o de neoplasia cervical intraepitelial grau 2 (CIN2), em 13,38% dos casos. O resultado de CIN2 e neoplasia cervical intraepitelial grau 3 (CIN3) é mais frequente em mulheres HPV16 positivas. Considerando os casos de infecção única por HPV e os de coinfeção com este genótipo, totalizam-se 15 casos (45%) de todos os casos de CIN2 e CIN3.

Tabela 5. Distribuição das amostras com base na genotipagem e do exame histopatológico.

Genotipagem	Negativo		Atipia / HPV		CIN1		CIN2		CIN3		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	N	%	n	%
HPV16	-	-	2	1,27	14	8,92	9	5,73	4	2,55	29	18,47
HPV18	-	-	-	-	8	5,10	-	-	-	-	11	7,01
HPV45	-	-	-	-	7	4,46	-	-	-	-	8	5,10
Grupo A	1	0,64	3	1,91	23	14,65	7	4,46	3	1,91	40	25,48
Grupo B	1	0,64	4	2,55	45	28,66	3	1,91	1	0,64	61	38,85
Grupo A e B	-	-	-	-	5	3,18	1	0,64	1	0,64	8	5,10
HPV16/HPV18	-	-	-	-	2	1,27	-	-	1	0,64	3	1,91
HPV16 / outros	1	0,64	-	-	5	3,18	-	-	1	0,64	8	5,10
HPV18 / outros	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0
HPV45 / outros	-	-	-	-	3	1,91	1	0,64	1	0,64	4	2,55
<b>Total</b>	<b>3</b>	<b>1,91</b>	<b>9</b>	<b>5,73</b>	<b>112</b>	<b>71,34</b>	<b>21</b>	<b>13,38</b>	<b>12</b>	<b>7,64</b>	<b>157</b>	<b>100</b>

### 3.3 Determinação da carga viral

Com base na curva padrão construída, foi possível determinar a carga viral presente nas amostras em estudo. A Tabela 6 regista os valores em média para os diferentes genótipos de HPV, isolados ou em associação com outro tipo de vírus. Da análise dos resultados é possível verificar que a média é mais elevada para o HPV16, Grupo A e Grupos B, apesar de se verificar em todos os grupos uma grande discrepância entre o mínimo e máximo de carga viral determinada para cada genótipo.

Tabela 6. Quantificação da carga viral de acordo com os diferentes genótipos/grupos.

Genotipagem	n	Média (Cp/mL)	Mínimo e máximo (Cp/mL)	Mediana (Cp/mL)
HPV16	41	2215	119 - 4950	2153
HPV18	16	1595	47 - 3572	1735
HPV45	10	1479	119 - 2637	1702
Grupo A	66	2283	289 - 4248	2422
Grupo B	130	2119	188 - 4395	1989
Grupo A e B	20	2349	910 - 4447	1939
HPV 16 / HPV 18	4	2214	751 - 3829	1460
HPV 16 / outros	15	2399	771 - 3490	2612
HPV 18 / outros	2	1713	1061 - 2558	1061
HPV 45 / outros	11	2214	598 - 3235	2305

Das amostras analisadas podemos verificar que a média da carga viral é mais elevada nos genótipos em coinfeção do que nos genótipos isolados, verificando-se assim uma tendência na carga viral

dos genótipos em coinfeção em relação aos genótipos isolados, sem significância estatística, tal como mostra a Figura 6. Em amostras que apresentam infeção por mais de um genótipo/grupo de HPV o número de cópias é sempre elevado para ambos os genótipos/grupos (Anexo I).

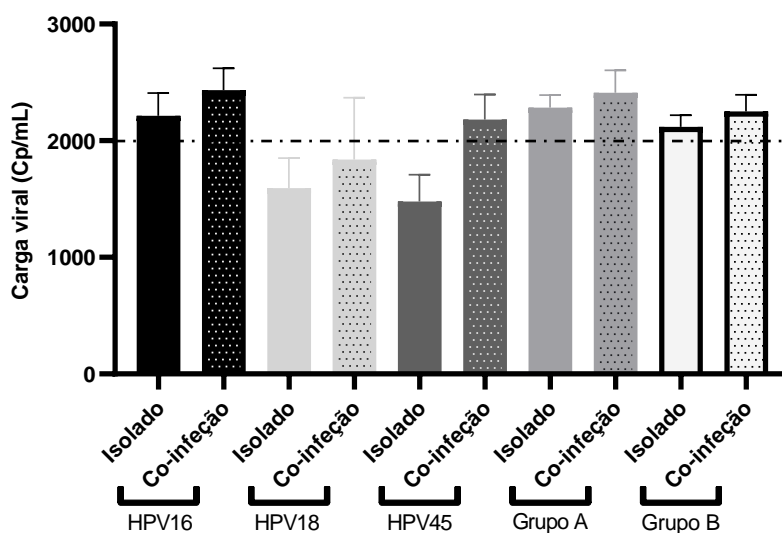


Figura 6. Distribuição das amostras de acordo com o genótipo e a carga viral. Os resultados estão expressos segundo a média das amostras e o erro médio padrão.

### 3.4 Associação da carga viral com a idade

Das 309 amostras com avaliação da carga viral, é possível verificar o decréscimo da carga viral com o aumento da idade, sem significância estatística, de acordo com os dados da Tabela 7 e da Figura 7.

Tabela 7. Quantificação da carga viral de acordo com os diferentes grupos de idade.

Idade	n	Média (Cp/mL)	Mínimo e máximo (Cp/mL)	Mediana (Cp/mL)
≤30	54	2401	433 - 4171	2325
[31 - 45]	130	2136	47 - 4950	2126
≥46	125	2097	119 - 4573	2049

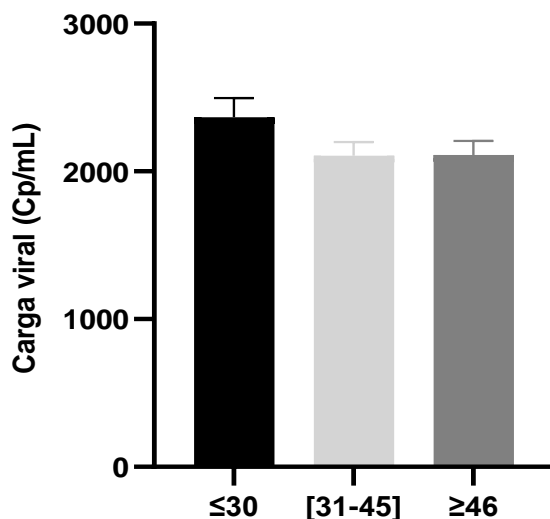


Figura 7. Distribuição das amostras de acordo com a idade e a carga viral. Os resultados estão expressos segundo a média das amostras e o erro médio padrão.

Quando agrupadas as mulheres com idade igual ou inferior a 30 anos e as mulheres com mais de 30 anos, não foi possível observar diferenças estatisticamente significativas ( $p=0,0969$ ).

### 3.5 Associação da carga viral com o resultado citológico

A análise da associação entre o resultado citológico e a carga viral, foi realizada nas 239 amostras com informação disponível para o efeito. Alguns resultados citológicos foram agrupados, por se verificar que apresentam carga viral semelhante: NILM e Alterações reativas ( $p>0,9999$ ); e ASC-H e HSIL ( $p>0,9999$ ). Da análise efetuada, é possível verificar que a média da carga viral é superior em LSIL e ASC-H/HSIL, de acordo com os dados da Tabela 8. A Figura 8 mostra que as categorias de LSIL e ASC-H/HSIL apresentam valores de carga viral superiores, geralmente superiores a 2500 Cp/mL, quando comparados com dos casos com resultado citológico de NILM (LSIL vs NILM,  $p<0,0001$ ; ASC-H/HSIL vs NILM,  $p<0,05$ ), e de ASC-US (LSIL vs ASC-US,  $p<0,0001$ ; ASC-H/HSIL vs ASC-US,  $p<0,001$ ).

Tabela 8. Quantificação da carga viral de acordo com os diferentes resultados citológicos.

Resultado Citológico	N	Média (Cp/mL)	Mínimo e máximo (Cp/mL)	Mediana (Cp/mL)
NILM	29	1780	119-3564	1721
Alterações reativas /ASC-US	174	1731	47-4171	1696
LSIL	75	3095	433-4950	3173
ASC-H / HSIL	34	2538	1560-3740	2423
AGC	2	1959	1061-3468	1349

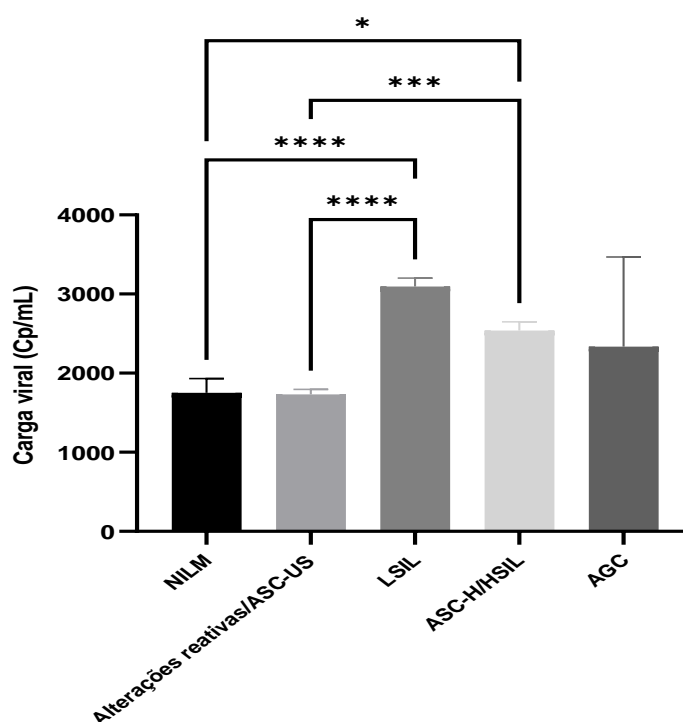


Figura 8. Distribuição das amostras de acordo com o resultado citológico e a carga viral. Os resultados estão expressos segundo a média das amostras e o erro médio padrão. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$

### 3.6 Associação da carga viral com o diagnóstico histológico

A análise da associação entre o diagnóstico histológico e a carga viral, foi realizada nas 138 amostras com informação disponível para o efeito. Da análise efetuada, é possível verificar que a média da carga viral aumenta com o grau de neoplasia, de acordo com os dados da Tabela 9.

Tabela 9. Quantificação da carga viral de acordo com os diferentes resultados histológicos.

Histologia	n	Média (Cp/mL)	Mínimo e máximo (Cp/mL)	Mediana (Cp/mL)
Negativo	3	2713	2133-3490	2614
Atipia / HPV	9	1801	119-3564	1935
CIN1	95	1936	119-4395	1894
CIN2/3	31	2295	910-3928	2289

No entanto, os casos com diagnóstico negativo e Atipia/HPV apresentam um valor de média e de desvio padrão elevado devido aos valores díspares e a um número de amostras muito reduzido, não tendo sido possível obter significância estatística. Na Figura 9 é possível verificar que a carga viral varia com o diagnóstico histológico (CIN1 vs CIN2/3) estando situações de displasia moderada ou severa associadas a níveis de carga viral superiores a 2000 Cp/mL. Contudo, não foi possível verificar diferenças estatisticamente significativas ( $p=0,078$ ).

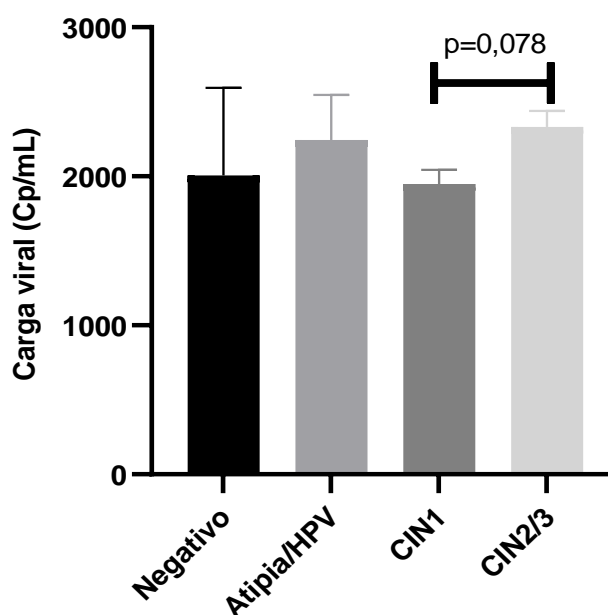


Figura 9. Distribuição das amostras de acordo com o diagnóstico histológico e a carga viral. Os resultados estão expressos segundo a média das amostras e o erro médio padrão

Um facto a salientar é a discrepância observada entre os resultados citológicos e os respetivos resultados histológicos, identificados na Tabela 10, juntamente com a respetiva carga viral média. Das 157

mulheres que apresentavam resultado da citologia e diagnóstico histológico, apenas 52 (33,12%) casos se mostram concordantes. Das 33 amostras com resultado de HSIL, a maioria apresenta concordância citohistológica (57,58%). A maioria dos casos de não concordância pertencem a lesões com resultado citológico de ASC-US e diagnóstico histológico de CIN1.

Tabela 10. Associação entre a carga viral e o diagnóstico citológico e histológico.

Res citológico \ Dx histológico	NILM n ( $\bar{x}$ =Cp/mL)	Alterações reativas/ ASC-US n ( $\bar{x}$ =Cp/mL)	LSIL n ( $\bar{x}$ =Cp/mL)	ASC-H/HSIL n ( $\bar{x}$ =Cp/mL)	Média (Cp/mL) / desvio padrão
<b>Negativo</b>	1 (2298)	1 (2133)	1 (3224)	0	<b>2542±594</b>
<b>Atipia/HPV</b>	3 (1911)	5 (1450)	0	1 (3224)	<b>1800±1171</b>
<b>CIN1</b>	8 (1300)	72 (1616)	27 (2949)	4 (2181)	<b>1940±1018</b>
<b>CIN2/CIN3</b>	1 (1423)	8 (1886)	5 (2328)	19 (2449)	<b>2287±720</b>
<b>Carga viral <math>\bar{x}</math>±<math>\sigma</math>=(Cp/mL)</b>	<b>1544±972</b>	<b>1627±862</b>	<b>2851±817</b>	<b>2436±578</b>	

Contudo, quando analisados os dados da Tabela 10 é perceptível um desvio padrão globalmente menor entre casos com o mesmo resultado citológico do que entre casos com o mesmo diagnóstico histológico. Para além disso, dos 5 casos de resultado citológico ASC-H/HSIL, cuja confirmação histológica foi possível, 4 (20%) revelaram resultado de CIN2/3 no *follow up*; por sua vez, dos 9 casos de diagnóstico histológico de CIN2/CIN3 cujo resultado citológico foi muito discrepante, o *follow up* revelou que 5 (45% dos casos) mantiveram o diagnóstico de CIN2/3 em *follow up*, num dos casos (11%) o diagnóstico de *follow up* mostrou regressão da lesão sendo o diagnóstico de CIN1, não existindo dados de *follow up* para os restantes casos; o caso de histologia negativo/citologia LSIL manteve o resultado de LSIL no *follow up*.

### 3.7 Follow up das pacientes

Das 365 pacientes, apenas 222 mulheres realizaram exames de *follow up*, apresentando exame de genotipagem e/ou diagnóstico de histologia e/ou resultado de citologia, tal como demonstrado na Tabela 11.

Tabela 11. Avaliação do *follow up* para mulheres com uma carga viral inferior e superior a 2000 Cp/mL.

		<2000	≥2000	Total	
Genotipagem de <i>follow up</i> (119 mulheres)	Positivo para outro genótipo	1 (50%)	1 (50%)	2	
	Positivo para o mesmo genótipo	36 (52%)	33 (48%)	69	
	Negativaram	25 (52%)	23 (48%)	48	
Resultado citológico de <i>follow up</i> (152 mulheres)	NILM	21 (46%)	25 (54%)	46	} p=0,0676
	Alterações reativas/ ASC-US	28 (44%)	35 (56%)	63	
	LSIL	8 (27%)	22 (73%)	30	
	ASC-H/HSIL	2 (17%)	10 (83%)	12	
	AGC	1 (100%)	0	1	
Diagnóstico histológico de <i>follow up</i> (115 mulheres)	Atipia/HPV	2 (22%)	7 (78%)	9	} p=0,0235
	CIN1	31 (51%)	30 (49%)	61	
	CIN2/3	13 (29%)	32 (71%)	45	

Os dados mostram que não existe associação entre a carga viral e a persistência da infecção ( $p < 0,05$ ), explicada pelo facto da proporção de mulheres cuja infecção negativou, manteve resultado positivo para o mesmo genótipo ou em que se verificou reinfeção por novo genótipo, ser semelhante entre mulheres com carga viral acima ou abaixo dos 2000 Cp/mL, de acordo com a Tabela 11.

É perceptível que há uma maior proporção de mulheres com resultado citológico de LSIL e HSIL, assim como de CIN 2/3 quando a carga viral estimada foi superior a 2000 Cp/mL, em comparação com as situações de *follow up* morfológico de gravidade inferior. Usando como critério de doença a confirmação no *follow up* de CIN2/3, verifica-se que a carga viral elevada se revela um fator preditor de doença com uma sensibilidade de 71% e de especificidade de 47% e que existe associação entre a carga viral superior e o grau da lesão no diagnóstico histológico (CIN1 vs CIN2/3) ( $p = 0,0235$ ). É possível verificar que o número de casos com carga viral superior a 2000 Cp/mL varia com o resultado citológico (NILM vs ASC-H/HSIL), apesar de não ser atingida a significância estatística ( $p = 0,0676$ ). Quando analisada a associação entre a carga viral e o resultado citológico de *follow up* em mulheres com idade acima ou abaixo dos 30 anos verifica-se que as mulheres mais novas tendem a apresentar uma maior carga viral em relação às mulheres com uma idade superior, embora estas diferenças não tenham significância estatística, de acordo com os dados da Figura 10. Por sua vez, independentemente da faixa etária, a carga viral é mais elevada quando existe LSIL ou HSIL, em comparação com os grupos sem lesão. Estas diferenças são estatisticamente significativas em mulheres com idade igual superior a 30 anos (ASC-

H/HSIL vs >30 NILM,  $p<0,01$ ; >30 LSIL vs >30 NILM,  $p<0,0001$ ; >30 ASC-H/HSIL vs >30 alterações reativas/ASC-US,  $p<0,01$ ; >30 LSIL vs >30 alterações reativas/ASC-US,  $p<0,0001$ ). Estas associações não se verificam em mulheres com menos de 30 anos provavelmente devido ao número de amostras ser reduzido.

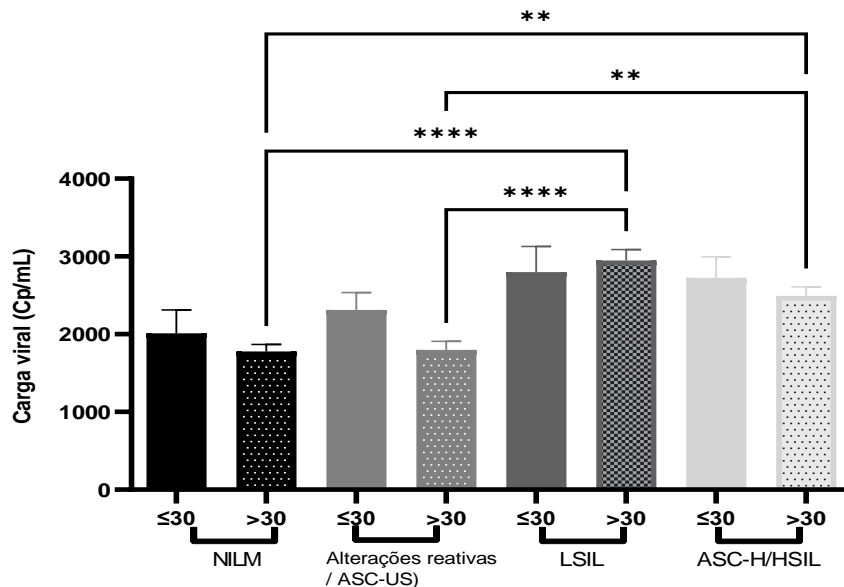


Figura 10. Representação gráfica da carga viral, de acordo com o resultado citológico, em mulheres com idade inferior ou superior a 30 anos. Os resultados estão expressos segundo a média das amostras e o erro médio padrão. \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ ; \*\*\*\* $p<0,0001$

Quando se compara a carga viral com o diagnóstico histológico de *follow up*, verifica-se que a carga viral é inferior em mulheres com idade superior a 30 anos. Apesar de não ser possível obter diferenças estatisticamente significativas em nenhum dos grupos histológicos, verifica-se uma tendência acentuada nos casos de Atipia/HPV versus CIN1 ( $p=0,056$ ). Para além disso, verifica-se, a tendência para o aumento da carga viral em mulheres com histologia de *follow up* de displasia moderada ou severa, apesar de, tal como na histologia inicial (Figura 11) a diferença não atingir a significância estatística ( $p=0,085$ ).

Da consulta da restante informação clínica, é possível aferir que 44 pacientes foram submetidas a tratamento cirúrgico, existindo casos em que este tratamento foi ineficaz na eliminação do vírus. Nestes casos, a carga viral da genotipagem realizada anteriormente foi superior a 2000 Cp/mL. Por sua vez, a infeção regrediu em 31 mulheres (a maioria com genotipagem para o grupo A ou B, 1 caso de HPV16 e 1 caso de HPV45) sem qualquer tipo de cirurgia, não sendo possível, no entanto, averiguar se foi realizado outro tipo de tratamento.

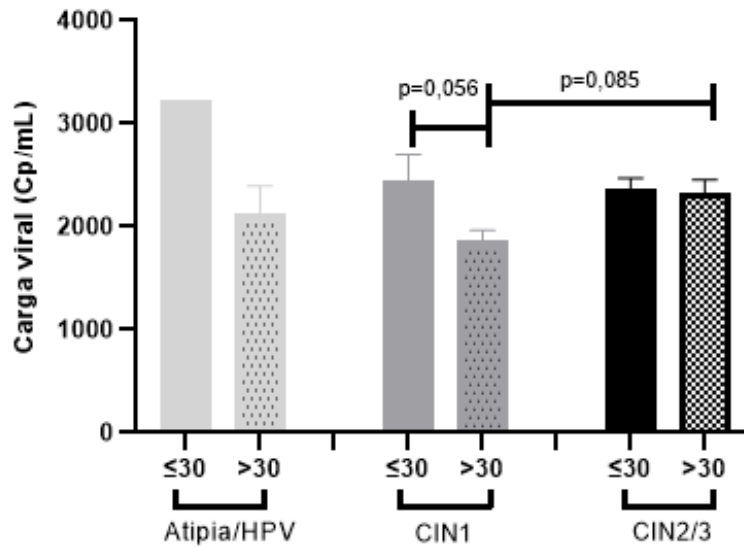


Figura 11. Representação gráfica da carga viral, de acordo com o resultado histológico, em mulheres com idade inferior ou superior a 30 anos. Os resultados estão expressos segundo a média das amostras e o erro médio padrão.

Dos 70 casos em que foi possível comparar a histologia de *follow up* com a histologia anterior, 11 mulheres mostraram uma evolução da lesão (a maioria de LSIL/CIN1 para HSIL/CIN2), sendo a média da carga viral da genotipagem realizada anteriormente superior a 2400 Cp/mL, e apenas de 1670 Cp/mL nos casos em que o diagnóstico histológico se manteve. Apenas em 2 casos se verificou regressão da lesão, com uma média de 2171 Cp/mL (Tabela 12). A análise estatística realizada mostra que não há associação entre a carga viral superior a 2000 Cp/mL e a evolução da lesão cervical no *follow up* nos casos considerados ( $p > 0,05$ ).

Tabela 12. Avaliação do diagnóstico histológico inicial versus *follow up*.

		n ( $\bar{x}$ =Cp/mL)	
Diagnóstico histológico inicial vs <i>follow up</i>	Regressão	2	(2171)
	Progressão	11	(2425)
	Inalterado	57	(1670)

Foram identificadas 156 mulheres que não apresentaram exame de genotipagem, histologia ou de citologia de repetição. A avaliação precisa desta frequência pode estar limitada pelo período de abrangência do estudo e a impossibilidade de rastrear mulheres que migram para unidades básicas de saúde atendidas por outros laboratórios ou para o sistema de saúde privado.

### 3. Discussão

O impacto da carga viral nas infeções por HPV de alto risco, enquanto fator de pior prognóstico para o desenvolvimento de lesões cervicais, continua por esclarecer. Estudos mostraram que em infeções por HPV, cargas virais elevadas com resultado citológico de NILM são um risco para o desenvolvimento de *carcinoma in situ*, e até carcinoma cervical invasor<sup>86</sup>. Para além disso, outros estudos verificaram que a carga viral do HPV é um marcador de risco para carcinoma invasivo, sendo sugerido que existe uma associação entre a carga viral elevada e a persistência da infeção por HPV<sup>86-93,96</sup>.

No decorrer do presente estudo, identificaram-se algumas limitações, como o período do estudo, por não ser o mais adequado para realizar um *follow up* completo de todos os casos. Tentou-se atenuar este obstáculo pelo facto de se tratar de um estudo com uma amostra contemplando um grande número de mulheres com HPV positivo de alto risco (365 amostras) onde todas possuíam resultado de citologia e/ou diagnóstico histológico aquando da genotipagem, e em que a maioria apresentou registos de genotipagem e/ou citologia e/ou histologia de *follow up*. Na população em estudo, concluiu-se que o número maior de casos positivos de HPV correspondia a mulheres com mais de 30 anos, representando 91,46% das 365 mulheres com infeção. As mulheres consideradas neste estudo constituem a população de seguimento em consulta de ginecologia do Hospital, existindo um maior número de pacientes com história clínica prévia de lesão e, portanto, são mulheres mais velhas.

Outra limitação foi o facto do número de casos de mulheres com idade inferior a 30 anos ser reduzido, não sendo possível estabelecer algumas associações entre as variáveis em estudo.

A maioria das mulheres deste estudo apresentou uma genotipagem positiva para o grupo B (que contempla os genótipos 35, 39, 51, 56, 59, 66 e 68). Esta informação é particularmente importante, considerando que os genótipos de HPV16 e HPV18 são descritos como os mais prevalentes e os genótipos apresentados no grupo B não estão contemplados nas vacinas existentes no mercado. Devido à implementação da vacinação, com a vacina quadrivalente desde 2008, e mais recentemente nonavalente que acrescentou 5 genótipos de elevado risco oncogénico (tipo 31, 45, 22, 52 e 58), a incidência de infeções por determinados genótipos está a diminuir e com provável tendência a desaparecer, e outros genótipos de HPV de alto risco envolvidos em lesões intraepiteliais podem ocupar esse nicho biológico<sup>36-38</sup>.

Embora nos últimos anos tenham sido desenvolvidas vacinas que parecem ser eficazes contra o HPV16 e o HPV18, as características intrínsecas da infeção (principalmente assintomática, com progressão lenta e outros genótipos de alto risco implicados) tornam essencial rastrear as mulheres e estabelecer os genótipos do vírus presente. Nesse contexto, estudos como este contribuem para um melhor conhecimento acerca da monitorização e tratamento das mulheres com infeção por HPV.

Na maioria das mulheres com infecção por HPV de alto risco, o resultado citológico foi de ASC-US, o qual apresenta características citomorfológicas sobreponíveis com atipia estando descrito que apresentam um risco aumentado de desenvolvimento de lesões pavimentosas cervicais<sup>97,98</sup>.

Dufloth et al.<sup>5</sup> demonstraram que a faixa etária com maior frequência de ASC-US é entre os 20 e os 29 anos, e que pode ser atribuído a fatores intrínsecos ou extrínsecos às mulheres, entre eles, a maior variabilidade de parceiros, o que aumenta a probabilidade de infecções recorrentes e transitórias pelo HPV<sup>99,100</sup>.

Por sua vez, de entre os 33 casos de diagnóstico de CIN2/CIN3 detetados, 28 (84,85%) pertenciam a mulheres com idade superior a 30 anos. De acordo com a literatura, esta faixa etária está mais associada ao desenvolvimento de lesões de displasia moderada ou grave, essencialmente dado o tempo necessário desde a infecção até ao desenvolvimento do processo displásico. Por sua vez, mulheres mais novas apresentaram raras lesões CIN3 e ausência de lesões invasivas, uma maior taxa de regressão da infecção, elevada frequência de alterações citológicas *minor* e de lesões de baixo grau com baixo grau histológico, cujo prognóstico usual é a regressão completa<sup>101</sup>.

Das 365 amostras em estudo, em 14,25% foi detetado mais de um tipo/grupo de HPV de alto risco. Neste trabalho, o número de coinfeções encontrado foi inferior ao descrito noutros estudos, o que poderá provavelmente dever-se ao facto da maioria das mulheres ter mais de 30 anos, onde está descrita uma menor taxa de coinfeções<sup>102-105</sup>. Por outro lado, a metodologia utilizada não permite distinguir coinfeções de infecções por um único genótipo nos grupos A e B. Assim, realça-se a importância de um ensaio de diagnóstico com a capacidade de identificar e quantificar tipos individuais de HPV, essencialmente em estudos desta natureza.

Um fator controverso na progressão e persistência da infecção pelo HPV é a presença de coinfeções, existindo estudos que consideram a coinfeção um fator de risco para a persistência do HPV e para lesões cervicais pré-invasivas e invasivas<sup>106,107</sup>. No presente estudo, a carga viral em amostras com mais de um genótipo foi sempre elevada para todos os genótipos presentes, sendo a média da carga viral mais elevada nos genótipos em coinfeção do que no grupo de casos com infecção com os respetivos genótipos isolados, independentemente do genótipo e da existência ou não de lesão<sup>107</sup>.

Neste estudo, analisando a relação entre a carga viral e a idade, verifica-se que uma carga viral mais baixa se correlaciona com uma idade mais avançada, resultados que vão de encontro a estes achados. Flores R *et al.* relataram que a carga viral de HPV de alto risco diminuiu com a idade, sendo significativamente maior em mulheres mais jovens<sup>108</sup>. No entanto, existem estudos de base populacional, que mostraram que a carga viral de HPV é maior em idades mais avançadas<sup>109-111</sup>.

A carga viral pode estar relacionada com o equilíbrio entre a aquisição de novas infecções de HPV de alto grau e a eliminação do vírus pelo sistema imunológico. Mulheres mais jovens podem apresentar novas exposições ao HPV, quando uma resposta imunológica ao HPV ainda não foi estabelecida. Por sua vez,

mulheres mais velhas são mais propensas a apresentar distúrbios fisiológicos e imunológicos durante a transição da menopausa, sendo menos provável a eliminação espontânea de uma infecção por HPV<sup>112-114</sup>.

Na população em estudo, quando comparados os genótipos e o diagnóstico histológico, foi possível observar que o HPV16, HPVs do grupo A e do grupo B estão relacionados com um maior número de diagnóstico de lesões pavimentosas, tendo apresentado, em média, uma maior carga viral. Curiosamente, nos tipos de vírus HPV 18 e HPV45 a carga viral não está relacionada com a existência de lesões, embora tenha sido observada uma ligeira tendência de aumento da carga viral em situações de lesão. Estes resultados são concordantes com outros estudos já publicados<sup>115,116</sup>.

Quando analisada a associação da carga viral com o resultado citológico, verificamos que a carga viral é significativamente superior nos casos de LSIL e ASC-H/HSIL quando comparados com os casos de resultado citológico de NILM e ASC-US/alterações reativas, com significado estatístico (NILM (LSIL vs NILM,  $p < 0,0001$ ; ASC-H/HSIL vs NILM,  $p < 0,05$ ), e de ASC-US (LSIL vs ASC-US,  $p < 0,0001$ ; ASC-H/HSIL vs ASC-US,  $p < 0,001$ ).

Por sua vez, amostras com diagnóstico histológico de CIN2/3 possuem em média uma maior carga viral do que amostras com diagnóstico de CIN1, sendo ainda possível verificar que situações de displasia moderada ou severa estão associadas a níveis de carga viral superiores a 2000 Cp/mL ( $p = 0,078$ ). O facto de haver uma maior associação entre a carga viral e o resultado citológico é facilmente justificado com a amostra sobre a qual recaem os diferentes exames: a genotipagem e o estudo citológico foram efetuados na mesma amostra, ao passo que a histologia foi realizada numa amostra diferente, com os potenciais problemas associados à amostragem<sup>107,117,118</sup>.

Foram identificados 222 casos que apresentaram exame de genotipagem e/ou histologia e/ou citologia de *follow up*, sobre o quais foi efetuada uma análise entre a carga viral avaliada inicialmente o resultado do *follow up*.

O grau do resultado citológico de *follow up* e a carga viral estão associados. De uma forma geral, em ambos os grupos de idades (acima e abaixo dos 30 anos), verifica-se que a carga viral foi mais elevada quando existe LSIL ou HSIL quando comparada à encontrada nos grupos sem lesão, sendo estas diferenças estatisticamente significativas no grupo de mulheres com idade superior a 30 anos ) (ASC-H/HSIL vs >30 NILM,  $p < 0,01$ ; >30 LSIL vs >30 NILM,  $p < 0,0001$ ; >30 ASC-H/HSIL vs >30 alterações reativas/ASC-US,  $p < 0,01$ ; >30 LSIL vs >30 alterações reativas/ASC-US,  $p < 0,0001$ ).

Para além disso, verificou-se que no *follow up* das pacientes, os casos com uma carga viral superior a 2000 Cp/mL apresentam uma percentagem mais elevada de lesões de maior grau (tanto na citologia como na histologia) mostrando que a carga viral pode ser um potencial fator preditivo para desenvolvimento de CIN2/3 ( $p = 0,0235$ ).

Por outro lado, os resultados deste estudo não corroboram a associação estabelecida anteriormente acerca da associação entre a carga viral e a persistência do vírus<sup>119</sup>. Verificou-se uma proporção

semelhante de casos nas situações em que a infecção por HPV persiste e em que a infecção negativa, independentemente da carga viral. Isto sugere que os genótipos possuem características especiais (variante genotípica, integração, etc.) independente de outros marcadores infecciosos, como a carga viral. Contudo, seria necessário um período de *follow up* mais longo, de modo a ser definido o curso da infecção permitindo tirar conclusões acerca deste tópico.

O mecanismo pelo qual a carga viral e a progressão neoplásica estão associadas está pouco explorado. Alguns autores sugerem que a desregulação celular, devido à integração do vírus, e consequente progressão da doença são eventos que propiciam a reprodução viral, e não o inverso, ou seja, o aumento da carga viral é uma condição para a progressão para carcinoma<sup>120-122</sup>. No entanto, será necessário realizar mais estudos com uma maior amostragem de pacientes, com diferentes genótipos, envolvendo acompanhamento a longo prazo de cada um deles para ajudar a clarificar esta situação.

Outros métodos de quantificação viral poderiam ter sido utilizados para estimar a carga viral na amostra, possivelmente com resultados diferentes dos deste estudo. Nesses métodos estão incluídos o Digital Droplet PCR<sup>123</sup>, TaqMan-based qPCR<sup>116,124</sup>, Linear Array<sup>125</sup>, Captura Híbrida<sup>119</sup> e *low-stringency* PCR<sup>126</sup>. Contudo, quando comparados com qPCR, esses métodos são mais demorados e mais trabalhosos e requerem condições controladas da amostra. As técnicas baseadas em PCR usadas para medir a carga viral, em geral, são reprodutíveis e adaptáveis a testes em larga escala em estudos epidemiológicos<sup>123</sup>.

Como a replicação viral geralmente precede o desenvolvimento da patologia associada ao vírus e a diminuição da carga viral durante o período de *follow up* precede a eliminação do vírus, em diferentes tipos de genótipos, a capacidade de quantificar a carga viral do HPV em pacientes com risco acrescido de doença pode ser um indicador de prognóstico muito útil<sup>122,127,128</sup>.

Apesar de serem necessários mais estudos, no global, os resultados deste estudo revelam que a carga viral está associada com o desenvolvimento de displasia, verificando-se que uma carga viral superior a 2000 Cp/mL pode ser um indicador de pior prognóstico, por estar relacionada com um elevado número de casos em que há progressão da lesão, no *follow up*.

#### **4. Conclusão**

O presente estudo é pioneiro em Portugal e contribui substancialmente para um maior conhecimento da epidemiologia, virulência do HPV de alto risco, assim como do seu papel no desenvolvimento de lesões cervicais.

Os resultados deste estudo mostram que a carga viral está associada com o grau de lesão na citologia, verificando-se que uma carga viral superior a 2000 Cp/mL pode ser um indicador de pior prognóstico, com uma maior proporção de mulheres com resultado histológico de CIN2/3, no *follow up*.

Apesar de ser necessário alargar a análise a um maior número de pacientes, o presente estudo transversal confirma que cargas virais altas estão relacionadas com o desenvolvimento de displasia, sendo a carga viral um potencial fator a considerar na definição do prognóstico das pacientes com infeção por HPV de alto risco.

O uso da genotipagem tem-se revelado muito promissor, sendo os resultados deste estudo uma mais-valia para a estratificação de mulheres com infeção por HPV, à luz das mais atuais diretrizes da prática clínica nesta área. Assim, na era da vacinação e implementação generalizada do rastreio molecular, abre-se caminho para a aplicação de novas abordagens diagnósticas que contemplem a carga viral no prognóstico da displasia cervical.

## Referências Bibliográficas

1. World Health Organization; [cited 2022Sep19]. Available from: <https://www.iarc.who.int/featured-news/iarc-marks-cervical-cancer-awareness-month-2022/>
2. Fact Sheets by Population. Globocan.iarc.fr. 2020 [cited 2022Sep19]. Available from: [http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_population.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx)
3. InfoCancro – Tudo sobre cancro. InfoCancro – [www.infocancro.com](http://www.infocancro.com). [cited 2022Sep19]. Available from: <https://www.infocancro.pt/tipos-de-cancro/cancro-do-colo-do-utero/cancro-do-colo-do-utero-enquadramento/>
4. WHO/ICO Information Centre on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Cancers. Summary Report Update. [cited 2022Sep19]. Available from: <http://apps.who.int/hpvcentre/statistics/dynamic/ico/methodologies.pdf>
5. Beers MH. Manual Merck de Informação Médica. Barcelona: Oceano; 2008.
6. Hopkins TG, Wood NJ, West RM, Darling JC. UK health professionals' attitudes and knowledge regarding human papillomavirus (HPV) vaccination: A West Yorkshire study. *Journal of Paediatrics and Child Health*. 2009;45(11):652–5.
7. Burd, EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol* 2003; 16:1–17.
8. Soper D. Reducing the health burden of HPV infection through vaccination. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*. 2006;2006:1–5.
9. Schiffman M, Doorbar J, Wentzensen N, de Sanjosé S, Fakhry C, Monk BJ, et al. Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nature Reviews Disease Primers*. 2016;2(1).
10. Bosch FX. HPV vaccines and cervical cancer. *Annals of Oncology*. 2008;19:v48–v51.
11. Joura EA., Ault KA., Bosch FX. Attribution of 12 high-risk human papillomavirus genotypes to infection and cervical disease. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2014;23(10):1997–08.
12. Serrano B, De Sanjosé S, Tous S. Human papillomavirus genotype attribution for HPVs 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 and 58 in female anogenital lesions. *European Journal of Cancer*. 2015;51(13):1732–41.
13. Serrano B, Alemany L, Tous S. Potential impact of a nine-valent vaccine in human papillomavirus related cervical disease. *Infectious Agents and Cancer*. 2012;7(1):38.
14. Sanjose S, Quint WGV, Alemany L. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *The Lancet Oncology*. 2010;11(11):1048–56.

15. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*. 2010;401(1):70–79.
16. Pista A, de Oliveira CF, Cunha MJ, Paixao MT, Real O. Prevalence of human papillomavirus infection in women in Portugal. *International Journal of Gynecological Cancer*. 2011;21(6):1150–8.
17. Poljak M, Kocjan BJ. Commercially available assays for multiplex detection of alpha human papillomaviruses. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2010;8(10):1139–62.
18. Arbyn M, Depuydt C, Benoy I, Bogers J, Cuschieri K, Schmitt M, et al. Valgent: A protocol for clinical validation of human papillomavirus assays. *Journal of Clinical Virology*. 2016;76.
19. Chan PK, Picconi MA, Cheung TH, Giovannelli L, Park JS. Laboratory and clinical aspects of human papillomavirus testing. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 2012;49(4):117–36.
20. Cuzick J, Wheeler C. Need for expanded HPV genotyping for cervical screening. *Papillomavirus Research*. 2016;2:112–5.
21. Molano M, Posso H, Weiderpass E, et al. Prevalence and determinants of HPV infection among Colombian women with normal cytology. *The British Journal of Cancer*. 2002;87:324–33
22. Jacobs MV, Walboomers JM, Snijders PJ, et al. Distribution of 37 mucosotropic HPV types in women with cytologically normal cervical smears: the age-related patterns for high-risk and low-risk types. *The International Journal of Cancer*. 2000;87:221–7
23. Kjaer SK, van den Brule AJ, Bock JE, et al. Determinants for genital human papillomavirus (HPV) infection in 1000 randomly chosen young Danish women with normal Pap smear: are there different risk profiles for oncogenic and nononcogenic HPV types? *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 1997;6:799–805
24. Lazcano-Ponce E, Herrero R, Muñoz N, et al. Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology. *The International Journal of Cancer*. 2001;91:412–20.
25. Woodman CB, Collins S, Winter H, et al. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *The Lancet* 2001;357:1831–6.
26. Lacey CJN. Therapy for genital human papillomavirus-related disease. *Journal of Clinical Virology*. 2005;32:82–90.
27. Lacey CJN, Lowndes CM, Shah KV. Chapter 4: Burden and management of non-cancerous HPV-related conditions: HPV-6/11 disease. *Vaccine*. 2006;24.
28. Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *Journal of Clinical Virology*. 2005;32:16–24.
29. Hellner K, Dorrell L. Recent advances in understanding and preventing human papillomavirus-related disease. *F1000Research*. 2017;6:269.

30. Gao G, Smith DI. Human papillomavirus and the development of different cancers. *Cytogenetic and Genome Research*. 2016;150(3-4):185–93.
31. Martín-Hernán F, Sánchez-Hernández JG, Cano J, Campo J, del Romero J. Oral cancer, HPV infection and evidence of sexual transmission. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*. 2013;
32. ANDERSON RM, MEDLEY GF, MAY RM, JOHNSON AM. A preliminary study of the transmission dynamics of the human immunodeficiency virus (VIH), the causative agent of AIDS. *Mathematical Medicine and Biology*. 1986;3(4):229–63.
33. Muñoz N, Castellsagué X, de González AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 2006;24.
34. Parkin DM, Bray F. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine*. 2006;24.
35. Ema. Cervarix [Internet]. European Medicines Agency. 2022 [cited 2022Sep19]. Available from: [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages%2Fmedicines%2Fhuman%2Fmedicines%2FO+00721%2Fhuman\\_med\\_000694.jsp&mid=WCOb01ac058001d124](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages%2Fmedicines%2Fhuman%2Fmedicines%2FO+00721%2Fhuman_med_000694.jsp&mid=WCOb01ac058001d124)
36. DGS [Internet]. A vacinação contra o HPV (HPV) em Portugal. [cited 2022Sep19]. Available from: <https://www.dgs.pt/documentos-e-publicacoes/boletim-vacinacao-edicao-especial-abril-2014-pdf.aspx>
37. Diário da República [Internet]. Despacho Ministerial n.º 8378/2008. Diário da República, 2.ª série – n.º 57 de 20 de Março de 2008. [cited 2022Sep19]. Available from: <https://files.dre.pt/gratuitos/2s/2008/03/2S057A0000S00.pdf>
38. Programa Nacional de Vacinação [Internet]. DGS. 2022 [cited 2022Sep19]. Available from: <https://www.dgs.pt/documentos-e-publicacoes/boletim-n-5-do-programa-nacional-de-vacinacao-abril-2022-pdf.aspx>
39. Jorgensen JH, Pfaller MA. Manual of clinical microbiology, 11th edition. *Manual of Clinical Microbiology*. 2015;:1783–95.
40. Bernard H-U. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *Journal of Clinical Virology*. 2005;32:1–6.
41. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology*. 2005;32:7–15.
42. Ganguly N, Parihar SP. Human papillomavirus E6 and E7 Oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. *Journal of Biosciences*. 2009;34(1):113–23.
43. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: From basic studies to clinical application. *Nature Reviews Cancer*. 2002;2(5):342–50.
44. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science*. 2006;110(5):525–41.

45. de Villiers E-M, Gunst K. Characterization of seven novel human papillomavirus types isolated from cutaneous tissue, but also present in mucosal lesions. *Journal of General Virology*. 2009;90(8):1999–2004.
46. Doorbar J. Papillomavirus life cycle organization and Biomarker Selection. *Disease Markers*. 2007;23(4):297–313.
47. Fehrmann F, Laimins LA. Human papillomaviruses: Targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene*. 2003;22(33):5201–7.
48. Gusho E, Laimins L. Human Papillomaviruses Target the ADN Damage Repair and Innate Immune Response Pathways to Allow for Persistent Infection. *Viruses*. 2021;13(7):1390
49. Anna Szymonowicz K, Chen J. Biological and clinical aspects of HPV-related cancers. *Cancer Biology and Medicine*. 2020;17(4):864–78.
50. Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*. 1993;75:495–505.
51. Scheffner M, Huibregtse JM, Howley PM. Identification of a human ubiquitin-conjugating enzyme that mediates the E6-AP-dependent ubiquitination of p53. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91:897–801.
52. Talis AL, Huibregtse JM, Howley PM. The role of E6AP in the regulation of p53 protein levels in human papillomavirus (HPV)-positive and HPV-negative cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273:6439–45.
53. Li S, Hong X, Wei Z, Xie M, Li W, Liu G, et al. Ubiquitination of the HPV oncoprotein E6 is critical for E6/E6AP-mediated p53 degradation. *Frontiers Microbiology*. 2019;10:2483.
54. Mietz JA, Unger T, Huibregtse JM, Howley PM. The transcriptional transactivation function of wild-type p53 is inhibited by SV40 large T-antigen and by HPV-16 E6 oncoprotein. *EMBO Journal*. 1992;11:5013–20.
55. Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM. Cloning and expression of the cADN for E6-AP, a protein that mediates the interaction of the human papillomavirus E6 oncoprotein with p53. *Molecular and Cellular Biology*. 1993;13:775–84.
56. Boyer SN, Wazer DE, Band V. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Research*. 1996;56:4620–4.
57. Ho GYF, Burk RD, Klein S, Kadish AS, Chang CJ, Palan P, et al. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *Journal of the National Cancer Institute*. 1995;87:1365–71.

58. Bernard X, Robinson P, Nominé Y, Masson M, Charbonnier S, Ramirez-Ramos JR, et al. Proteasomal Degradation of p53 by Human Papillomavirus E6 Oncoprotein Relies on the Structural Integrity of P53 Core Domain. *PLoS ONE*. 2011;6(10);
59. Banks L, Grm H, Bergant M. Human papillomavirus infection, cancer & therapy. *Indian Journal of Medical Research*. 2009; 130:277–85.
60. Vinokurova S, et al. Type-Dependent Integration Frequency of Human Papillomavirus Genomes in Cervical Lesions. *Cancer Research*. 2008; 68:307–13
61. Gay L, Melenotte C, Lakbar I, Mezouar S, Devaux C, Raoult D, et al. Sexual dimorphism and gender in infectious diseases. *Frontiers in Immunology*. 2021;12.
62. Ovestad IT, Gudlaugsson E, Skaland I, et al. Local immune response in the microenvironment of CIN2–3 with and without spontaneous regression. *Mod Pathol*. 2010; 23(9):1231–40.
63. DeSalle R, et al. The carcinogenicity of human papillomavirus types reflects viral evolution. *Virology* 2005; 337:76–84.
64. Moscicki A-B, Shiboski S, Hills NK, Powell KJ, Jay N, Hanson EN, et al. Regression of low-grade squamous intra-epithelial lesions in young women. *The Lancet*. 2004;364(9446):1678–83.
65. de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus ADN in women with normal cytology: A meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*. 2007;7(7):453–9.
66. Moscicki AB, Ellenberg JH, Farhat S, Xu J. Persistence of Human Papillomavirus Infection in VIH-Infected and Uninfected Adolescent Girls: Risk Factors and Differences, by Phylogenetic Type. *Journal of Infectious Diseases*. 2004; 190: 37–45.
67. 2022. Redirecting. [online] Available at: <<https://answers.microsoft.com/en-us/windows/forum/all/cusersusernamedocumentsfile-folder-name-refers-to/9e70e0ed-0bea-40bd-88f3-2fb16f00ca0a>> [Accessed 18 September 2022].
68. Rastreios [Internet]. ARS. [cited 2022Sep19]. Available from: <https://www.arsnorte.min-saude.pt/rastreios/cancro-do-colo-do-utero/>
69. Gravitt PE, Belinson JL, Salmeron J, Shah KV. Looking ahead: a case for human papillomavirus testing of self-sampled vaginal specimens as a cervical cancer screening strategy. *International Journal of Cancer*. 2011;129(3):517–27.
70. Franco EL, Cuzick J. Cervical cancer screening following prophylactic human papillomavirus vaccination. *Vaccine*. 2008;26.
71. Mendes D., Mesher D., Pista A., Baguelin M., Jit M. Understanding differences in cervical cancer incidence in western europe: comparing Portugal and england. *European Journal of Public Health*. 2018;28(2):343–347

72. Miranda N, Portugal C. Avaliação e Monitorização dos rastreios oncológicos organizados de base populacional de Portugal: Relatório de 2015 [Internet]. Avaliação e Monitorização dos Rastreios Oncológicos Organizados de Base Populacional de Portugal: Relatório de 2015. Direção-Geral da Saúde; 2016 [cited 2022Sep19]. Available from: <https://comum.rcaap.pt/handle/10400.26/15603>
73. The Bethesda System for reporting cervical cytology. 2004;
74. Stanley M. Human papillomavirus vaccines versus cervical cancer screening. *Clinical Oncology*. 2008;20(6):388-94.
75. Pereira A, Rocha AMAC, Tavares F. Página principal [Internet]. RepositriUM. 1970 [cited 2022Sep19]. Available from: <http://repositorium.uminho.pt/handle/1822/9687?mode=full>
76. Luhn P and Wentzensen N. HPV-based Tests for Cervical Cancer Screening and Management of Cervical Disease. *Current Obstetrics and Gynecology Reports*. 2013; 2:76-85.
77. Ronco G, Dillner J, Elfström KM, Tunesi S, Snijders PJ, Arbyn M, Kitchener H, Segnan N, Gilham C, Giorgi-Rossi P, Berkhof J, Peto J, Meijer CJ; International HPV screening working group. Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow up of four European randomised controlled trials. *Lancet*. 2014; 383:524-32.
78. Lie AK, Kristensen G. Human papillomavirus E6/E7 mRNA testing as a predictive marker for cervical carcinoma. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2008;8(4):405-15.
79. Salk J. Prospects for the control of AIDS by immunizing seropositive individuals. *Nature*. 1987; 327(6122):473-6.
80. Dioverti MV and Razonable RR. Clinical utility of cytomegalovirus viral load in solid organ transplant recipients. *Curr Opin Infect Dis*. 2015; 28(4):317-22.
81. Vora SB and Englund JA Cytomegalovirus in immunocompromised children. *Curr Opin Infect Dis*. 2015; 28(4):323-9.
82. Yip TT, Ngan RK, Fong AH, et al. Application of circulating plasma/serum EBV ADN in the clinical management of nasopharyngeal carcinoma. *Oral Oncol*. 2014; 50(6):527-38.
83. Ruf S and Wagner HJ. Determining EBV load: current best practice and future requirements. *Expert Rev Clin Immunol*. 2013; 9(2):139-51
84. Verhelst S, Poppe WAJ, Bogers JJ, Depuydt CE. Serial measurement of type-specific human papillomavirus load enables classification of cervical intraepithelial neoplasia lesions according to occurring human papillomavirus-induced pathway. *European Journal of Cancer Prevention*. 2017;26(2):156-64.
85. Depuydt CE, Criel AM, Benoy IH, Arbyn M, Vereecken AJ, Bogers JJ. Changes in type-specific human papillomavirus load predict progression to cervical cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2012;16(12):3096-104.

86. Moberg M, Gustavsson I, Gyllensten U. Type-specific associations of human papillomavirus load with risk of developing cervical carcinoma in situ. *International Journal of Cancer*. 2004;112:854–9.
87. Zhao X, Zhao S, Hu S, Zhao K, Zhang Q, Zhang X, et al. Role of human papillomavirus DNA load in predicting the long-term risk of cervical cancer: A 15-year prospective cohort study in China. *The Journal of Infectious Diseases*. 2018;219(2):215–22.
88. Cheung JL, Lo KW, Cheung TH, Tang JW, Chan PK. Viral load, E2 gene disruption status, and lineage of human papillomavirus type 16 infection in cervical neoplasia. *Journal of Infectious Diseases*. 2006;194:1706–12.
89. Andersson S, Safari H, Mints M, et al. Type distribution, viral load and integration status of high-risk human papillomaviruses in pre-stages of cervical cancer (CIN). *British Journal of Cancer*. 2005;92:2195–200.
90. Molano M, Van den Brule A, Plummer M, et al. Determinants of clearance of human papillomavirus infections in Colombian women with normal cytology: a population-based, 5-year follow up study. *American Journal of Epidemiology* 2003;158:486–94.
91. Kulmala SM, Shabalova IP, Petrovitchev N, et al. Type-specific persistence of high-risk human papillomavirus infections in the New Independent States of the former Soviet Union cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16:17–22.
92. Swan DC, Tucker RA, Tortolero-Luna G, et al. Human papillomavirus (HPV) ADN copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV type. *Journal Clinical Microbiol*. 1999;37:1030–4.
93. Ylitalo N, Sorensen P, Josefsson AM, et al. Consistent high viral load of human papillomavirus 16 and risk of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet*. 2000;355:2194–8.
94. Sample Prep Kit 1, Germany, Abbott Molecular Inc, 2018
95. HR HPV AMP Kit, Germany, Abbott Molecular Inc, 2020
96. Hortlund M, Mol T, Van de Pol F, Bogers J, Dillner J. Human papillomavirus load and genotype analysis improves the prediction of invasive cervical cancer. *International Journal of Cancer*. 2021;149(3):684–91.
97. Rousselin A, Dion L, Racin A, Lavoué V, Levêque J, Nyangoh Timoh K. La pratique du frottis Cervico-vaginal avant 25 ans. *Gynécologie Obstétrique Fertilité & Sénologie* . 2017;45(5):309–15.
98. Nayar R, Wilbur DC. The Pap Test and Bethesda 2014. *Acta Cytologica*. 2015;59(2):121–32.
99. Rousselin A, Dion L, Racin A, Lavoué V, Levêque J, Nyangoh Timoh K. La pratique du frottis Cervico-vaginal avant 25 ans. *Gynécologie Obstétrique Fertilité & Sénologie* . 2017;45(5):309–15.

100. Nayar R, Wilbur DC. The Pap Test and Bethesda 2014. *Acta Cytologica*. 2015;59(2):121–32.
101. Clements AE, Raker CA, Cooper AS, Boardman LA. Prevalence and patient characteristics associated with CIN 3 in adolescents. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 2011; 204.
102. Sohrabi A, Hajia M, Jamali F, Kharazi F. Is incidence of multiple HPV genotypes rising in genital infections? *Journal of Infection and Public Health*. 2017;10(6):730–3.
103. Shulman LP. Human papillomavirus infection with multiple types: Pattern of coinfection and risk of cervical disease. *Yearbook of Obstetrics, Gynecology and Women's Health*. 2011;2011:389–90.
104. Oyervides-Muñoz MA, Pérez-Maya AA, Sánchez-Domínguez CN, Berlanga-Garza A, Antonio-Macedo M, Valdéz-Chapa LD, et al. Multiple HPV infections and viral load association in persistent cervical lesions in Mexican women. *Viruses*. 2020;12(4):380.
105. Dickson EL, Vogel RI, Bliss RL, Downs LS. Multiple-type human papillomavirus (HPV) infections: A cross-sectional analysis of the prevalence of specific types in 309,000 women referred for HPV testing at the time of cervical cytology. *International Journal of Gynecologic Cancer*. 2013;23(7):1295–302.
106. Sasagawa T, Basha W, Yamazaki H, Inoue M. High-risk and multiple human papillomavirus infections associated with cervical abnormalities in Japanese women. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention*. 2001;10:45–52.
107. Schmitt M, Depuydt C, Benoy I, Bogers J, Antoine J, Arbyn M, et al. Multiple human papillomavirus infections with high viral loads are associated with cervical lesions but do not differentiate grades of cervical abnormalities. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013;51(5):1458–64.
108. Flores R, Papenfuss M, Klimecki WT, Giuliano AR. Cross-sectional analysis of oncogenic HPV viral load and cervical intraepithelial neoplasia. *International Journal of Cancer*. 2005;118(5):1187–93.
109. Clements AE, Raker CA, Cooper AS, Boardman LA. Prevalence and patient characteristics associated with CIN 3 in adolescents. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*. 2011; 204
110. Hernández-Hernández DM, Ornelas-Bernal L, Guido-Jiménez M, Apresa-García T, Alvarado-Cabrero I, Salcedo-Vargas M, et al. Association between high-risk human papillomavirus DNA load and precursor lesions of cervical cancer in Mexican women. *Gynecologic Oncology*. 2003;90(2):310–7.
111. Syrjänen K, Kulmala SM, Shabalova I, Petrovichev N, Kozachenko V, Zakharova T, et al. Epidemiological, clinical and viral determinants of the increased prevalence of high-risk human papillomavirus (HPV) infections in elderly women. *Euro Journal Gynecologic Oncology*. 2008;29:114–122

112. Syrjänen S, Shabalova I, Petrovichev N, Podistov J, Ivanchenko O, Zakharenko S, et al. Age-specific incidence and clearance of high-risk human papillomavirus infections in women in the former Soviet Union. *International Journal of STD & AIDS*. 2005;16(3):217–23.
113. Li W, Meng Y, Wang Y, Cheng X, Wang C, Xiao S, et al. Association of age and viral factors with high-risk HPV persistence: A retrospective follow up study. *Gynecologic Oncology*. 2019;154(2):345–53.
114. Althoff KN, Paul P, Burke AE, Viscidi R, Sangaramoorthy M, Gravitt PE. Correlates of cervicovaginal human papillomavirus detection in perimenopausal women. *J Womens Health (Larchmt)*. 2009;18:1341–6.
115. Morais AME, Morais CF, Morais CE, Anghebem-Oliveira MI, Merlin JC. ASC-US: uma revisão da literatura para responder aos problemas práticos do dia a dia do citologista. *Rev Bras Análises Clínicas*. 2011;43(4):309–20.
116. Gravitt PE, Peyton C, Wheeler C, Apple R, Higuchi R, Shah KV. Reproducibility of HPV 16 and HPV 18 viral load quantitation using taqman real-time PCR assays. *Journal of Virological Methods*. 2003;112(1-2):23–33.
117. DeMay R Mac. *The art & Science of Cytopathology*. Second. American Society for Clinical Pathology, editor. Chicago; 2012.
118. Pinto ÁP AP, Tuon FF, Bleggi Torres LF, Collaço LM. Limiting factors for cytopathological diagnosis of high-grade squamous intraepithelial lesions: a cytohistological correlation between findings in cervical smears and loop electrical excision procedure. *Diagnostic Cytopathology*. 2002;26(1):15–8.
119. Lu X, Wang T, Zhang Y, Liu Y. Analysis of influencing factors of viral load in patients with high-risk human papillomavirus. *Virology Journal*. 2021;18(1).
120. Tábora N, Bakkens JM, Massuger LF, Ferrera A, Melchers WJ. High HPV 16 viral load is associated with increased cervical dysplasia in Honduran women. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2008;78(5):843–6.
121. Zhang Y, Du H, Xiao A, Zhang W, Wang C, Huang X, et al. Verification of the association of the cycle threshold (CT) values from HPV testing on cobas4800 with the histologic grades of cervical lesions using data from two population-based cervical cancer screening trials. *Infectious Agents and Cancer*. 2022;17(1).
122. Depuydt CE, Thys S, Beert J, Jonckheere J, Salembier G, Bogers JJ. Linear viral load increase of a single HPV-type in women with multiple HPV infections predicts progression to cervical cancer. *International Journal of Cancer*. 2016;139(9):2021–32.
123. Lillsunde Larsson G, Helenius G. Digital droplet PCR (ddpcr) for the detection and quantification of HPV 16, 18, 33 and 45 – A Short report. *Cellular Oncology*. 2017;40(5):521–7.

124. Micalessi IM, Boulet GAV, Bogers JJ, Benoy IH, Depuydt CE. High-throughput detection, genotyping and quantification of the human papillomavirus using real-time PCR. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2012;50(4).
125. Wentzensen N, Gravitt PE, Long R, Schiffman M, Dunn ST, Carreon JD, et al. Human papillomavirus load measured by linear array correlates with quantitative PCR in cervical cytology specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012;50(5):1564–70.
126. Trevisan A, Schlecht NF, Ramanakumar AV, Villa LL, Franco EL. Human papillomavirus type 16 viral load measurement as a predictor of infection clearance. *Journal of General Virology*. 2013;94(8):1850–7.
127. Rotondo JC, Oton-Gonzalez L, Mazziotta C, Lanzillotti C, Iaquina MR, Tognon M, et al. Simultaneous detection and viral DNA load quantification of different human papillomavirus types in clinical specimens by the high analytical droplet digital PCR method. *Frontiers in Microbiology*. 2020;11.
128. Depuydt CE, Jonckheere J, Berth M, Salembier GM, Vereecken AJ, Bogers JJ. Serial type-specific human papillomavirus (HPV) load measurement allows differentiation between regressing cervical lesions and serial virion productive transient infections. *Cancer Medicine*. 2015;4(8):1294–302

## **ANEXOS**

Anexo I – Resultado da quantificação da carga viral em casos com mais de um genótipo

<b>Carga Viral (Cp/mL)</b>				
<b>HPV16</b>	<b>HPV18</b>	<b>HPV45</b>	<b>GRUPO A</b>	<b>GRUPO B</b>
3619	0			
1460	751			
1394	1382			
3829	3061			
2155		2528		
2735			2793	
3263			2872	
3114			2628	
1691			1607	
2940				2900
0				2426
2325				2271
2958				3490
2822				2792
2829				2779
2612				2545
771				1828
1553				880
1724				1742
	1884		2558	
	1349			1061
		2454	2414	0
		2163	2030	0
		2256	2498	2354
		2396		2471
		598		2119
		2444		3097
		2026		1938
		0		1983
		1712		1421
		3235		2426
			3944	3409
			1770	0
			1142	0
			1651	1195
			2205	1997
			4447	3861

<b>Carga Viral (Cp/mL)</b>				
<b>HPV16</b>	<b>HPV18</b>	<b>HPV45</b>	<b>GRUPO A</b>	<b>GRUPO B</b>
			3761	3719
			986	959
			2805	0
			3026	0
			1300	1939
			2930	0
			1886	1704
			1823	1564
			4365	3407
			3835	3121
			910	1428
			2677	2888
			1147	1164
			1579	1666