



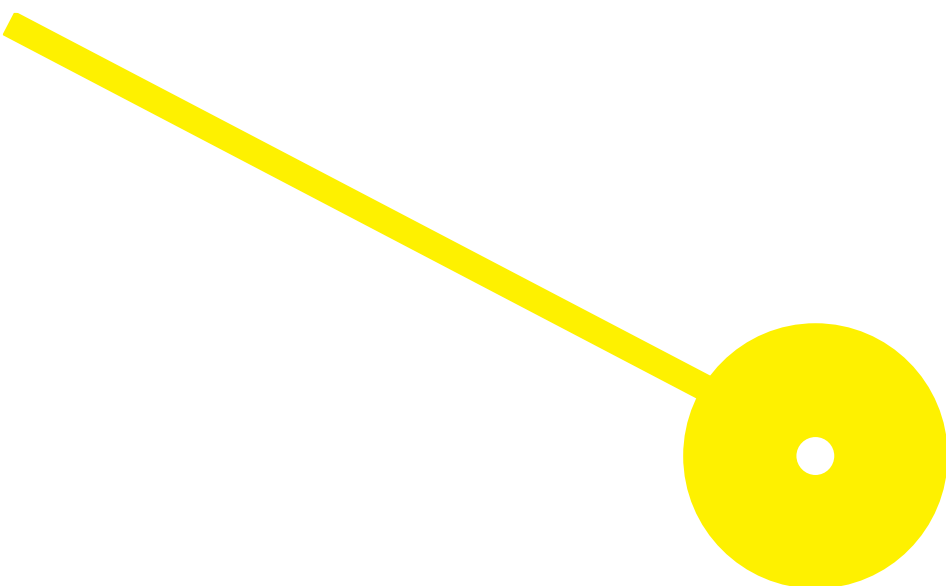
MESTRADO

TÉCNICAS LABORATORIAIS EM BIOPATOLOGIA – PATOLOGIA MOLECULAR

Implementação do rastreio molecular do cancro do colo do útero em Angola – Projeto Piloto

Patrícia Isabel Ribeiro Andrade

09/2024





ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE



Implementação de rastreio molecular do cancro do colo do útero em Angola – Projeto Piloto

Autor

Patrícia Isabel Ribeiro Andrade

Orientador(es)

Prof. Doutor Hélder Henrique Ribeiro Rocha, Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto (E2S|P.Porto)

Mestre Luís Augusto Cirnes Cardoso, Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto, E2S|P.Porto

Prof. Doutora Regina Augusta Alves Pereira da Silva, E2S|P.Porto

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

Dissertação realizada com o apoio da Roche e Macrolab através de consórcio, no âmbito de implementação de metodologias moleculares de diagnóstico diferenciadoras e pioneiras no país, com o intuito de impulsionar e melhorar a estratégia de rastreio em Angola atuando assim no diagnóstico precoce e permitindo melhor follow-up dos pacientes.



Agradecimentos

Agradeço primeiramente aos meus pais por tornarem possível a minha formação académica e por todo o carinho e suporte ao longo da minha vida. E a todos que acompanharam o meu percurso profissional/pessoal e acreditaram em mim.

Deixo um agradecimento especial ao meu marido, pelo seu apoio incondicional, pelo permanente incentivo e preocupação com que sempre acompanhou este meu trabalho, agradeço ainda a paciência e amor demonstrados nos meus momentos menos bons.

Agradeço à Faculdade pela incrível formação académica.

Agradeço a todos os professores pela orientação académica, bem como pela sua disponibilidade em ajudar e facultar todas as sugestões que foram cruciais na minha aprendizagem e no sucesso deste projeto, em especial ao Prof. Hélder Rocha pelo tempo despendido.

Agradeço aos financiadores pelo apoio deste projeto (Roche/Macrolab), bem como seus profissionais de saúde.

Agradeço a todas as entidades públicas de saúde angolanas envolvidas tanto ativamente no gerar da evidência local, bem como todo o suporte adicional. Um bem-haja Ministério da Saúde, Direcção Nacional de Saúde Pública, Instituto Angolano de Controlo do Cancro, Maternidade Lucrecia Paim, Hospital Materno-Infantil Azancot Menezes, tal como seus respetivos representantes.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a concretização deste objetivo.

Desejo exprimir os meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que, de alguma forma, permitiram que esta tese se concretizasse e confiam no sucesso e futura implementação do projeto!

Resumo

O cancro cervical é um importante problema de saúde global e uma das principais causas de morte em mulheres de países com baixos rendimentos, sobretudo devido à falta de programas de rastreio eficazes. A infeção persistente pelo papilomavírus humano (HPV) é a principal causa, e os tipos de hrHPV aumentam significativamente o risco de cancro.

Este trabalho representa a primeira caracterização da prevalência do HPV e das lesões cervicais em Angola, visando demonstrar o valor de uma estratégia de rastreio que combine a genotipagem do HPV e a dupla marcação p16/Ki-67.

1153 amostras cervicovaginais de mulheres com 25 anos ou mais foram submetidas a genotipagem e diagnóstico citológico, seguido da dupla marcação nos casos positivos.

Os resultados demonstram uma elevada prevalência (18,2%) de HPV de alto risco em Angola. Mais de 55% das mulheres HPV-positivas apresentavam lesões citológicas. A dupla marcação revelou 50,9% de positividade entre as mulheres PAP-positivas/HPV-positivas, sublinhando o valor da triagem para identificar as mulheres de maior risco e melhorar a referência para colposcopia.

Este estudo apoia a utilização do teste HPV como método de rastreio primário para melhorar a deteção precoce e reduzir a mortalidade, mesmo em locais com poucos recursos, a par de esforços para melhorar a acessibilidade a cuidados preventivos.

Palavras-chave: Rastreio do cancro cervical; HPV; citologia; CINtec Plus; Angola.

Abstract

Cervical cancer remains a major global health issue and a leading cause of cancer-related deaths among women in low-income countries, primarily due to the lack of effective screening programs. Persistent human papillomavirus (HPV) infection is the primary cause, with high-risk types significantly increasing cancer risk.

This work represents the first-ever characterization of HPV prevalence and cervical lesions in Angola, aiming to demonstrate the value of implementing a screening strategy for early diagnosis, combining HPV genotyping and p16/Ki-67 dual-labeling.

A total of 1153 cervicovaginal samples from women aged 25 and above, underwent HPV genotyping and cytological diagnosis, followed by dual-labeling in positive cases.

Results show a high prevalence (18,2%) of high-risk HPV in Angola. Over 55% of HPV-positive women had cervical abnormalities. p16/Ki-67 labeling revealed 50,9% positivity among PAP-positive/HPV-positive women, emphasizing the value of triage tools to identify women at higher risk and improving colposcopy referrals.

This study supports using HPV testing as primary screening method to improve early detection and reduce mortality even in low-resource settings, alongside efforts to enhance accessibility to preventive care.

Keywords: Cervical cancer screening; HPV; cytology; CINtec Plus; Angola.

Índice

Índice de abreviaturas, acrónimos e sinais.....	VIII
Índice de tabelas.....	X
Índice de figuras.....	XI
1. Introdução.....	1
1.1. Panorama global do cancro.....	1
1.2. O cancro do colo do útero: uma perspetiva.....	3
1.2.1. Definição e tipos principais.....	3
1.2.2. Fatores de Risco.....	5
1.3. O papel do Vírus do Papiloma Humano no cancro cervical.....	5
1.3.1. Características e epidemiologia.....	5
1.3.2. Mecanismo de infeção e carcinogénese.....	7
1.4. Estratégias de prevenção e diagnóstico.....	11
1.4.1. Vacinação: prevenção primária.....	12
1.4.2. Rastreio: prevenção secundária e diagnóstico precoce.....	15
1.4.2.1. Citologia.....	15
1.4.2.2. Teste de HPV-DNA.....	17
1.4.2.3. Co-teste (Citologia + HPV-DNA).....	18
1.4.2.4. Inspeção visual com ácido acético (VIA).....	19
1.4.2.5. Biomarcadores de diagnóstico precoce.....	19
1.5. Desafios e Estratégias na Implementação de Programas de Rastreio.....	21
1.5.1. Otimização de recursos e recomendações globais.....	22
2. Objetivo.....	24
3. Métodos.....	25
3.1. Caracterização da amostra.....	25
3.2. Citologia.....	26
3.3. Teste molecular hrHPV.....	26
3.4. CINtec® PLUS.....	26
3.5. Análise estatística.....	27
4. Resultados.....	28
4.1. Caracterização da população em estudo.....	28

4.2.	Resultados da tipificação do vírus HPV	29
4.3.	Resultados do diagnóstico citológico.....	31
4.4.	Resultados da avaliação por CINtec® PLUS	33
4.5.	Correlação entre as diferentes metodologias.....	34
5.	Discussão.....	37
6.	Conclusão.....	48
7.	Bibliografia.....	49

Índice de abreviaturas, acrónimos e sinais

AGC – células glandulares atípicas (do inglês *atypical glandular cells*)

AIS – adenocarcinoma in situ (do inglês *adenocarcinoma in situ*)

ASC – células escamosas atípicas (do inglês *atypical squamous cells*)

ASCCP – *Australian Society for Colposcopy and Cervical Pathology*

ASC-H – células escamosas atípicas não se podendo excluir lesão de alto grau (do inglês *atypical squamous cells, cannot exclude a high-grade lesion*)

ASC-US – células escamosas atípicas de significado indeterminado (do inglês *atypical squamous cells of undetermined significance*)

CAP – *College of American Pathologists*

CCU – cancro do colo do útero

CIN – neoplasia intraepitelial cervical (do inglês *Cervical Intraepithelial Neoplasia*)

DST – doenças sexualmente transmissíveis

DS – dupla marcação (do inglês *Dual-Staining*)

E – *early*

EV – Epidermodisplasia verruciforme

FDA – *Food and Drug Administration*

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

HIC – Países de Alta Renda (do inglês *High Income Countries*)

HPV – Vírus Papiloma Humano (do inglês *Human PapillomaVirus*)

HrHPV – Vírus Papiloma Humano de alto risco (do inglês *High-risk Human Papillomavirus*)

HSIL – Lesão Intraepitelial de Alto Grau (do inglês *High-grade Squamous Intraepithelial Lesion*)

IARC – Agência Internacional de Pesquisa sobre o Cancro

L – *late*

LAST – *Lower Anogenital Squamous Terminology*

LCR – *long control region*

LMIC – Países de Baixa e Média Renda (do inglês *Low-and Middle-Income Countries*)

LSIL – lesão intreepitelial de baixo grau (do inglês *low-grade squamous intraepithelial lesion*)

OMS – Organização Mundial de Saúde

pAI – poliadenilação inicial

PALOP – países de língua oficial portuguesa

PAP – citologia Papanicolau

pAT – poliadenilação tardio

PI – promotor inicial

pRb – proteína retinoblastoma

PT – promotor tardio

PVs – Papilomavírus

SCC – carcinoma escamoso (do inglês *squamous cell carcinoma*)

SIL – lesões intraepiteliais escamosas (do inglês *squamous intraepithelial lesion*)

URR – *upstream regulatory region*

VIA – inspeção visual com ácido acético (do inglês *Visual inspection with acetic acid*)

VPP – Valor preditivo positivo

Índice de tabelas

Tabela 1: Tipos de HPV dos vários géneros, tropismos e as respetivas patologias associadas....	7
Tabela 2: Exemplos de alguns tipos de testes de HPV comercializados internacionalmente e suas características	17
Tabela 3: Estimativas de distribuição da população feminina em Angola e da amostragem incluída neste trabalho	29
Tabela 4: Distribuição etária do número e percentagem de casos positivos em cada teste	30
Tabela 5: Associação entre o grupo etário da mulher e o resultado da genotipagem de HPV	31
Tabela 6: Associação entre o grupo etário da mulher e o resultado do exame citológico	32
Tabela 7: Associação entre o resultado do teste hrHPV e o resultado da Citologia	35

Índice de figuras

Figura 1: Dados globais de incidência e mortalidade por cancro.	1
Figura 2: Distribuição da incidência e mortalidade do cancro do colo do útero em África,.....	2
Figura 3: Representação esquemática do colo uterino e seus epitélios, com destaque para zona de transformação.	3
Figura 4: Classificação Richart (Antiga) / classificação LAST (Atual).....	4
Figura 5: Organização genómica de um HPV alfa oncogénico e funções das proteínas virais.	6
Figura 6: Taxa de prevalência da infeção por HPV mundial	8
Figura 7: Comparação dos dez tipos oncogénicos de HPV mais frequentes no mundo entre mulheres com e sem lesões cervicais.....	9
Figura 8: Várias etapas envolvidas no ciclo replicativo de HPV de alto risco no epitélio cervical e proteínas intervenientes no processo.....	10
Figura 9: Progressão oncogénica do cancro do colo do útero.....	11
Figura 10: Intervenções programáticas para prevenção de infeções por HPV e cancro do colo do útero.	12
Figura 11: Representação da introdução do programa de vacinação nos diferentes continentes.	13
Figura 12: Comparação entre as estimativas de cobertura do programa de vacinação contra o HPV específico para meninas em países de alta renda (HIC) e de baixa/média renda (LMIC).	14
Figura 13: Representação da co-expressão p16/Ki-67.....	20
Figura 14: Algoritmo aprovado pela FDA para a triagem de mulheres com teste de hrHPV +.	21
Figura 15: Representação da dinâmica do material e métodos.....	25
Figura 16: Histograma da distribuição etária e estatística descritiva da população estudada.....	28
Figura 18: Distribuição do número de casos identificados para cada genótipo de hrHPV, classificação citológica e resultado de dupla marcação imunocitoquímica, de acordo com o grupo etário.....	33
Figura 19: Fluxograma que ilustra a distribuição da população analisada. As mulheres são divididas com base no estado de HPV. Dentro de cada grupo, são apresentados os resultados da citologia (Insatisfatório, NILM e >ASC-US), e a coloração dual p16/Ki-67 (CINtec®). Os resultados do CINtec® incluem negativo (CINtec-), positivo (CINtec+) e inconclusivo (CINtec Inc.).....	34
Figura 20: Fluxograma que ilustra a distribuição dos casos hrHPV +. Dentro de cada grupo, são apresentados os resultados da citologia (Insatisfatório, NILM e >ASC-US), e a coloração dual	

p16/Ki-67 (CINtec®). Os resultados do CINtec® incluem negativo (CINtec-), positivo (CINtec+) e inconclusivo (CINtec Inc.)36

Figura 21: Exemplo de possível algoritmo futuro, adaptado do algoritmo atualmente implementado, com inclusão dos testes com marcadores moleculares..... 47

1. Introdução

O cancro é uma doença complexa e multifatorial que, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), é uma das principais causas de morte no mundo, juntamente com as doenças cerebrovasculares e cardiovasculares.¹ Existem diversos sinónimos da palavra cancro, tais como tumor ou neoplasia. Etimologicamente neoplasia significa “crescimento de novo” e pode ser classificada como benigna ou maligna. Atualmente a designação de cancro mais aceite é a de neoplasia maligna e refere-se, de forma simplificada, ao crescimento anormal de tecido, resultante de uma proliferação celular involuntariamente rápida que persiste após o crescimento normal do tecido ter cessado ou abrandado consideravelmente.²

1.1. Panorama global do cancro

Segundo estimativas da Agência Internacional de Pesquisa sobre o Cancro (IARC) a incidência global de cancro tem aumentado, atingindo quase 20 milhões de novos casos e perto de 10 milhões de mortes em 2022 (Figura 1).³ Uma em cada cinco pessoas no mundo desenvolve cancro durante a vida, sendo que um em cada nove homens e uma em cada 12 mulheres morrem da doença.³

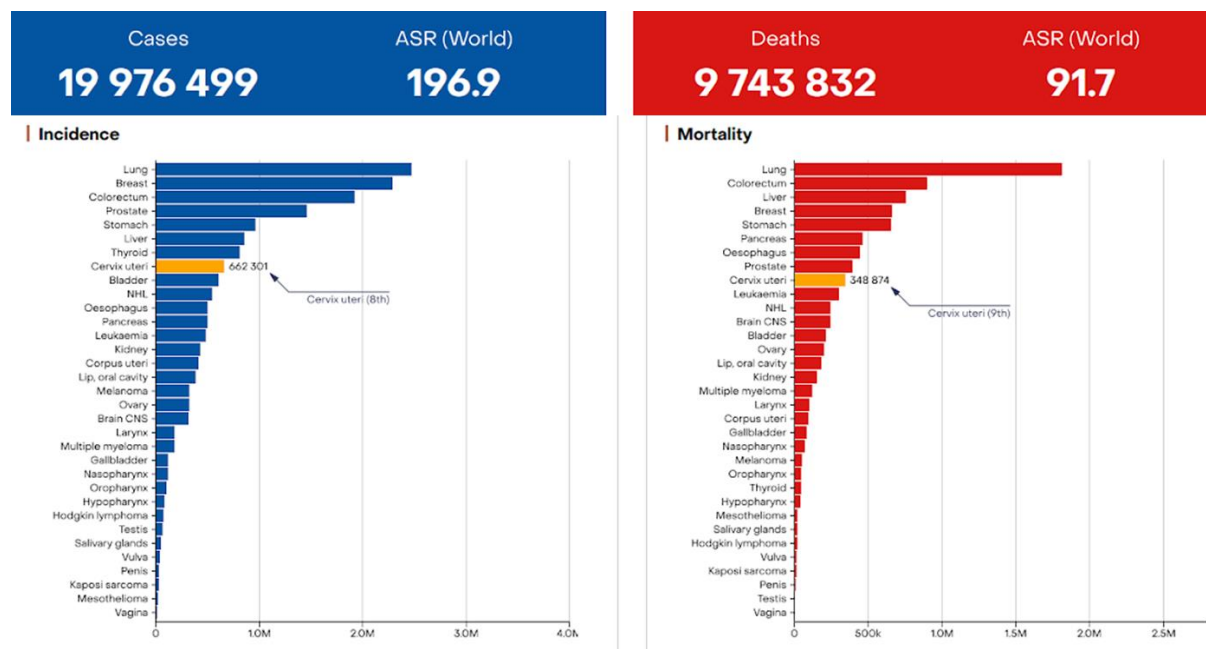


Figura 1: Dados globais de incidência e mortalidade por cancro. Adaptado de Bray *et al.*³

O cancro do colo do útero (CCU) é o quarto tipo mais comum entre as mulheres, a nível global, segundo a mais recente estimativa. Em todo o mundo, ocorreram aproximadamente 662 301

novos casos de cancro do colo do útero e 348 874 mortes no ano de 2022 (Figura 1). O cancro cervical é o tipo de cancro mais comum em 25 países e a principal causa de morte por cancro em 37, todos localizados na África Subsaariana, América do Sul e Sudeste Asiático.⁴

Em África, o CCU é o segundo tipo de cancro mais comum, com 125 699 novos casos e representa o segundo maior número de mortes por cancro, com 80614 mortes em 2022, apenas atrás do cancro da mama (Figura 2). Nos países com elevada prevalência de infeção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), mais de metade dos casos de cancro do colo do útero ocorrem em mulheres seropositivas.⁴

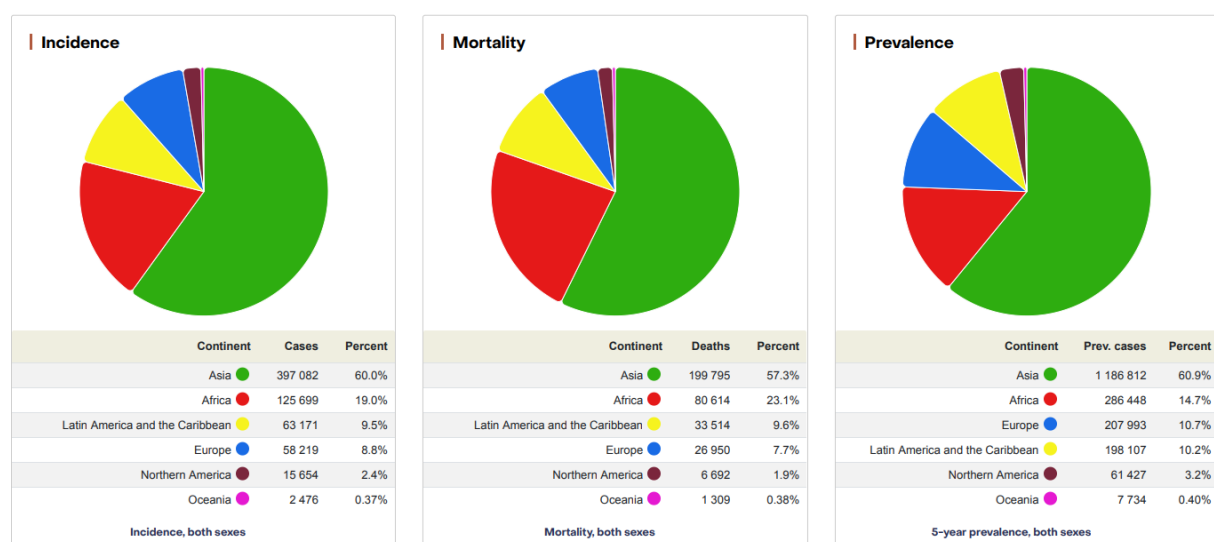


Figura 2: Distribuição da incidência e mortalidade do cancro do colo do útero em África. Adaptado de Bray *et al.*³

África é desproporcionalmente afetada pelo cancro do colo do útero. Em 2022, a percentagem de mulheres que morre por CCU é de 70% enquanto em muitos países de elevado rendimento, essa percentagem desce para 30%.¹ Esta situação deve-se não só a fatores socioeconómicos e culturais, mas também ao fraco acesso aos serviços de saúde. Por outro lado, as mulheres que vivem com o HIV têm uma probabilidade seis vezes maior de desenvolver cancro do colo do útero, mesmo em idade precoce, do que as seronegativas. Esta associação contribui significativamente para o pesado fardo da morbilidade e mortalidade na região, refletindo as desigualdades e disparidades geográficas, de género e socioeconómicas.⁵

Atualmente, em África, o rastreio de lesões pré-cancerosas de colo de útero é incipiente e cobre menos de 10% da população alvo, devido à existência de muito poucas unidades sanitárias públicas e privadas para realização de testes de rastreio. A maioria das mulheres com lesões no

colo do útero acodem tardiamente aos poucos centros com capacidade de rastrear e tratar potenciais lesões pré-cancerosas o que leva a que apenas uma fração dos casos seja diagnosticada, e já numa fase avançada da doença. O acesso ao tratamento (por exemplo, à cirurgia, radioterapia ou quimioterapia) numa fase tão avançada resulta, geralmente, numa elevada taxa de mortalidade. A mortalidade entre as mulheres diagnosticada com CCU varia significativamente de acordo com o estágio do diagnóstico e o acesso ao tratamento. Consequentemente, entre 37% e 77% das mulheres diagnosticadas com CCU morrem nos cinco anos subsequentes ao diagnóstico.⁶

1.2. O cancro do colo do útero: uma perspetiva

1.2.1. Definição e tipos principais

O colo do útero é a região mais baixa e estreita do útero e faz a ligação à vagina. Este pode ser dividido em ectocérvix, que se projeta para dentro da vagina e é revestido por epitélio escamoso; e endocérvix, um canal que passa do óstio interno para o óstio externo e é revestido por epitélio colunar. Praticamente todos os carcinomas do colo do útero têm origem na zona de transformação, que circunda o óstio externo. A zona de transformação é uma área de metaplasia escamosa entre a junção escamo colunar original e atual.⁷

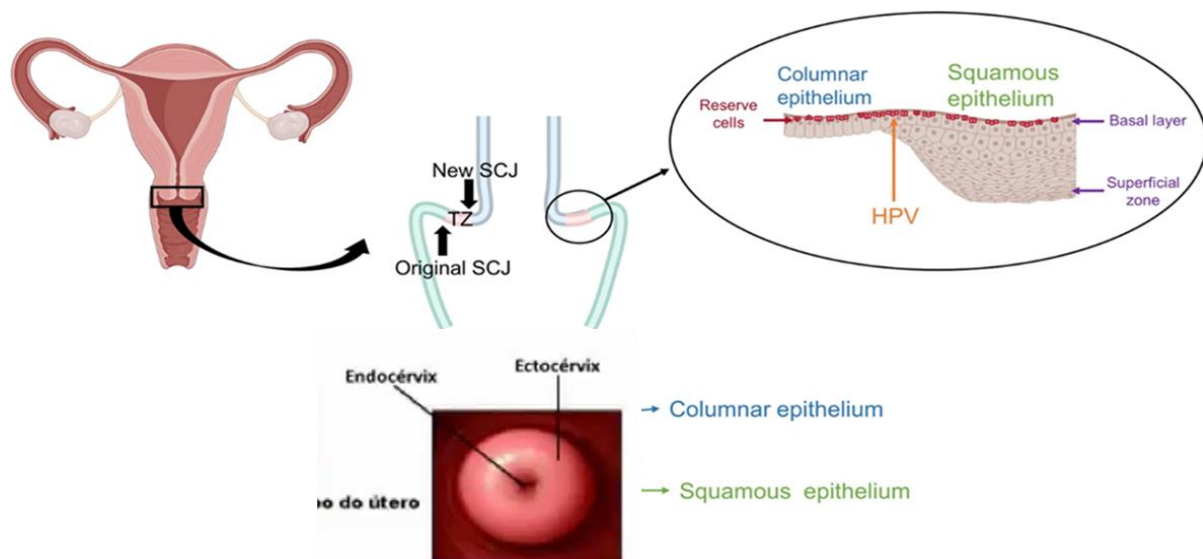
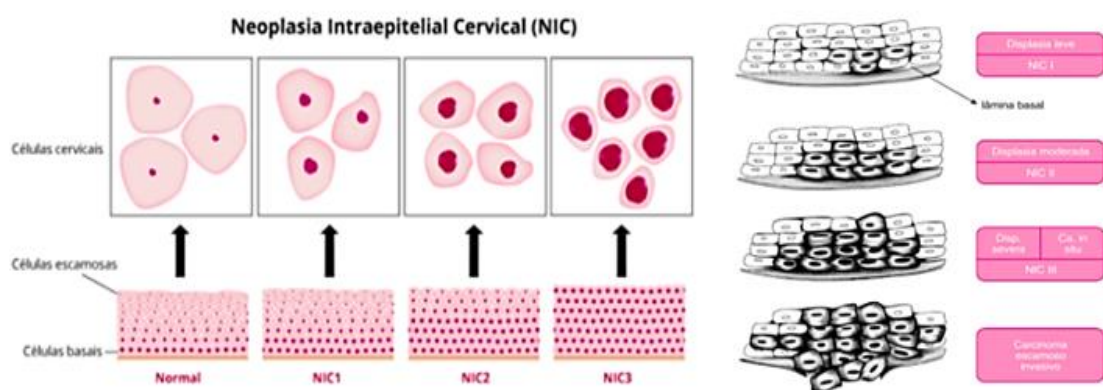


Figura 3: Representação esquemática do colo uterino e seus epitélios, com destaque para zona de transformação. Adaptado de Kusakabe *et al.*⁸

Até 2014, a nomenclatura histológica descrevia as lesões do colo do útero como neoplasias intraepiteliais cervicais (CIN) e dividia-as em três níveis de gravidade (CIN1, CIN2 e CIN3), nos

quais CIN1 corresponde a lesões de baixo grau e CIN 2 e CIN3 correspondem a lesões de alto grau.⁹ A terminologia, atualmente adotada baseia-se na classificação LAST (*Lower Anogenital Squamous Terminology*), na qual se designam lesões intraepiteliais escamosas (SIL), e permite uniformizar as designações em todos os órgãos do trato genital inferior (vulva e vagina), ânus e pênis.¹¹ Segundo esta classificação as lesões dividem-se em: LSIL (lesão intraepitelial escamosa de baixo grau) – representa a manifestação clínica e morfológica de uma infecção produtiva por HPV com baixo risco associado de cancro concomitante ou futuro; HSIL (lesão intraepitelial escamosa de alto grau) – pré-cancerosa; e carcinoma ou adenocarcinoma.⁹



Classificação baseada em Richart	Classificação LAST
Colo do Útero	
CIN 1: Neoplasia intraepitelial de grau 1	LSIL: low-grade squamous intraepithelial lesion
CIN 2: Neoplasia intraepitelial de grau 2	HSIL: high-grade squamous intraepithelial lesion
CIN 3: Neoplasia intraepitelial de Grau 3	
CIS: Carcinoma in-situ	
Carcinoma microinvasivo	Carcinoma escamoso superficialmente invasivo

Figura 4: Classificação Richart (Antiga) / classificação LAST (Atual). Adaptado de Bhatla *et al.*⁹

Histologicamente, o carcinoma de células escamosas (epidermóide ou pavimentoso) é o mais frequente, compreendendo a aproximadamente 90% dos CCU. A maioria dos restantes 10% corresponde a adenocarcinomas. Também é possível encontrar carcinomas adeno-escamosos e de pequenas células (mais raramente), bem como casos pontuais de sarcomas primários do colo do útero e linfomas malignos primários e secundários do colo do útero.¹⁰

1.2.2. Fatores de Risco

Existem diversos fatores relacionados com o desenvolvimento desta neoplasia, mas a infecção com estirpes oncogénicas do HPV é o principal fator de risco para o seu desenvolvimento. É uma das infeções sexualmente transmissíveis mais comuns sendo altamente prevalente na população sexualmente ativa, especialmente entre os 16 e 25 anos de idade^{10,11}

A infecção por HPV, por si só, não leva ao desenvolvimento de cancro, no entanto, 99% das mulheres com cancro do colo do útero estão infetadas por estirpes de HPV de alto risco.¹² O vírus tem um papel como iniciador da transformação maligna e existem diversos cofatores que irão promover o seu desenvolvimento: predisposição genética, a existência de outras doenças sexualmente transmissíveis (DST), e.g. *Herpes simplex* tipo 2 e *Chlamydia trachomatis*, o início precoce da atividade sexual, o uso de contraceptivos orais, depressão do sistema imunitário (e.g. HIV), o número de gravidezes, as deficiências nutricionais (nomeadamente baixos níveis de vitamina A e C e de ácido fólico), a existência de múltiplos parceiros sexuais, a história sexual dos parceiros, as características demográficas e os hábitos alcoólicos e tabágicos.¹³

1.3. O papel do Vírus do Papiloma Humano no cancro cervical

1.3.1. Características e epidemiologia

A família *Papillomaviridae* é uma das mais antigas famílias virais, estando a evoluir em conjunto com os seus hospedeiros há mais de 400 milhões de anos.¹² Os papilomavírus (PVs) compreendem um grupo diversificado de vírus que infetam diversas espécies animais, desde mamíferos terrestres e aquáticos, aves e répteis.¹⁴ Os HPVs são vírus não-encapsulados com 50–60 nm de diâmetro, contendo uma única molécula circular de DNA de cadeia dupla com aproximadamente 8000 pb.⁷ Até à data, mais de 300 PVs diferentes foram identificados e o seu genoma completamente sequenciado, incluindo cerca de 200 capazes de infetar o ser humano.¹⁵ De uma maneira geral cada genótipo tem um hospedeiro específico e existe também uma preferência de determinados tipos de PVs para infetar locais anatómicos distintos, onde causam lesões com características clínicas distintas, desde lesões benignas, como verrugas, até lesões inaparentes ou lesões precursoras assintomáticas, que podem, em alguns casos, progredir para neoplasia.¹⁶

Apesar dos PVs serem um grupo de vírus consideravelmente heterogéneo, a estrutura e organização do seu genoma é semelhante e pode ser dividida em três regiões: uma região reguladora LCR (*long control region*), que também é designada de URR (*upstream regulatory*

region); uma região codificante E (*early*) que codifica entre três a seis proteínas envolvidas na replicação viral e na transformação celular; e uma região codificante L (*late*) que codifica as duas proteínas da cápside (L2 e L1).⁷ A região LCR é constituída pela origem de replicação, também designada por *ori*. Estão ainda presentes o promotor inicial (PI), promotor tardio (PT) e locais de poliadenilação inicial e tardio (pAI e pAT).¹¹

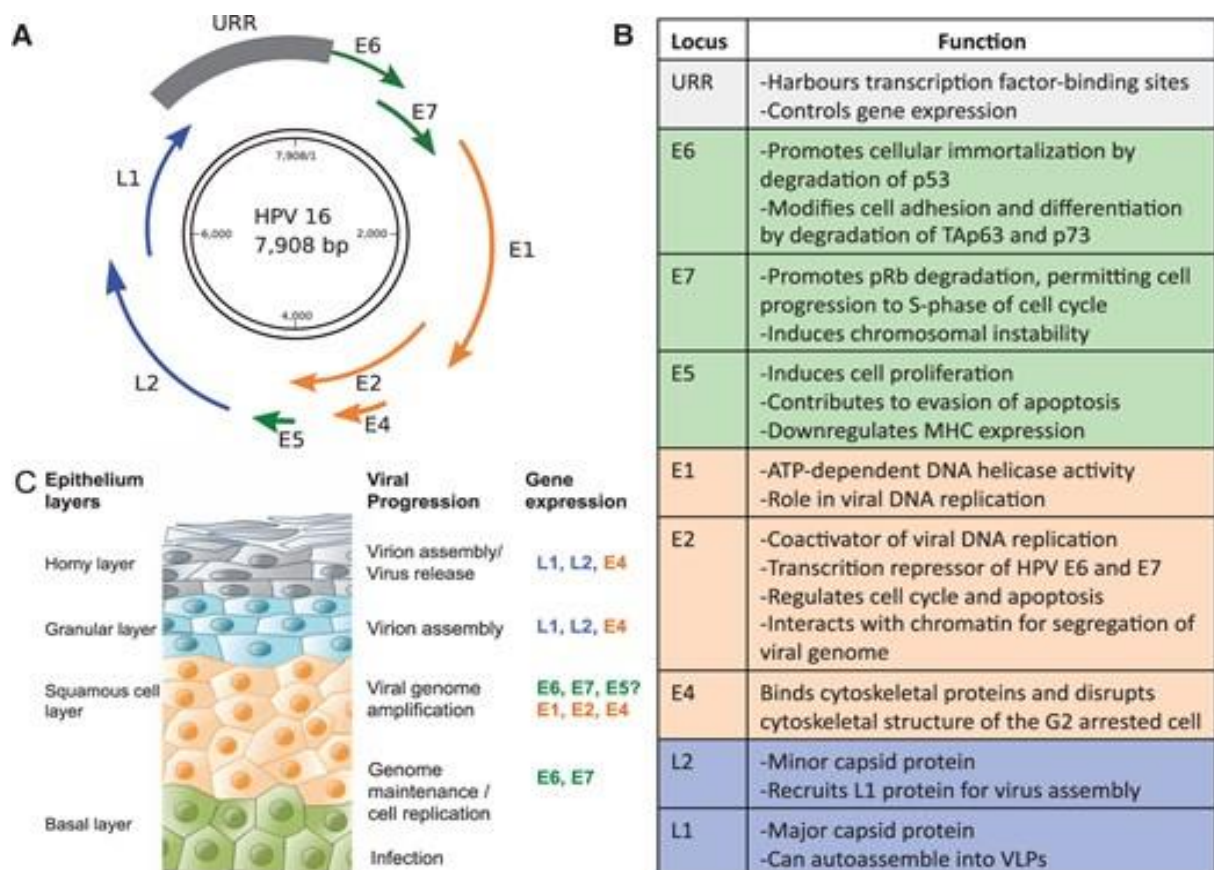


Figura 5: Organização genômica de um HPV alfa oncogénico e funções das proteínas virais. Adaptado de Bravo & Féliz-Sánchez.⁷

Em termos taxonómicos os PVs podem ser agrupados em géneros e espécies,¹⁷ no entanto, a classificação clinicamente mais relevante é a que define diferentes tipos de HPV, i.e. dois genomas de HPV que partilham mais de 90% de identidade nucleotídica do gene L1 pertencem ao mesmo tipo de HPV (Tabela 1).¹⁸ No entanto, tipos de HPV semelhantes podem apresentar fenótipos bastante distintos. Por exemplo, cerca de 85% da sequência dos tipos 6 e 11 são semelhantes, no entanto o HPV 6 está mais associado ao aparecimento de verrugas genitais, enquanto o tipo 11 é a causa primária do aparecimento de papilomas na laringe. Da mesma forma, o tipo 13 que possui 78% da sua sequência semelhante ao tipo 6 e 11, não está relacionado de forma causal a nenhuma das condições anteriores.^{19,20}

Consideram-se ainda 3 grupos gerais de HPV consoante o seu tropismo para determinado tecido: tropismo para o epitélio cutâneo, para a mucosa ou cutâneo associado a Epidermodisplasia Verruciforme (EV). Os HPVs com tropismo para a mucosa dividem-se entre baixo ou alto risco consoante a sua capacidade oncogénica.²⁰ Os tipos de alto risco são aproximadamente 15 e estão associados ao surgimento de cancros anogenitais, nomeadamente o cancro do colo do útero. Por outro lado, os tipos de baixo risco são responsáveis pelo aparecimento de verrugas genitais benignas (condiloma acuminado).²¹

Tabela 1: Tipos de HPV dos vários géneros, tropismos e as respetivas patologias associadas. Adaptado de Harden & Munger.²²

Género	Tropismo	Tipo de HPV	Doença
Alfa	Mucosa (alto risco)	HPV16	Carcinoma cervical das células escamosas (~50%) Adenocarcinoma cervical (~35%) Cancro orofaríngeo (~25%)
		HPV18	Carcinoma cervical das células escamosas (~20%) Adenocarcinoma cervical (~35%)
		HPV31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59	Carcinoma cervical das células escamosas (~30%)
	Mucosa (baixo risco)	HPV6, 11	Lesões genitais benignas Papilomatose respiratória
		HPV13, 32	Hiperplasia epitelial focal (Doença de Heck)
	Mu	Cutâneo (benigno)	HPV2, 3, 27, 57
HPV1			Verrugas cutâneas
Beta	Cutâneo	HPV5, 8	EV
		HPV 9, 12, 14, 15, 17, 19-25, 36-38, 47, 49, 75, 76, 80, 92, 93, 96, 98-100, 104, 105, 107, 110, 111, 113, 115, 118, 120, 122, 124, 143, 145, 150-152, 159	Provavelmente associada á EV
Gama		HPV4, 48, 50, 60, 65, 88, 95, 101, 103, 108, 109, 112, 115, 116, 119, 121, 123, 126-142, 144, 146-149, 153-158, 161-170	Desconhecido

1.3.2. Mecanismo de infeção e carcinogénese

A principal forma de transmissão do HPV é a atividade sexual de qualquer tipo, podendo ocorrer, inclusive, a deposição do vírus nos dedos por contato genital e a autoinoculação. A transmissão

pode ocorrer por contacto direto com lesões da pele ou mucosas infetadas, ou de forma indireta por instrumentos infetados que fiquem em contacto com microlesões, traumatismos ou macerações. Ainda que rara, a transmissão vertical pode ocorrer durante o parto normal por contacto direto com células infetadas.²³

As estimativas apontam para que mais de 80% das mulheres e homens sexualmente ativos terão adquirido pelo menos uma infecção por HPV até aos 45 anos.²⁴ Em média, 12% das mulheres em todo o mundo possuem uma infecção cervical detetável por HPV, no entanto estes valores apresentam variações geográficas e etárias, sendo globalmente mais prevalente em mulheres com menos de 30 anos e nas regiões da África Subariana (24%), América Latina e Caraíbas (16%), Europa de Leste (14%) e Sudeste Asiático (14%).²⁵ (Figura 6)

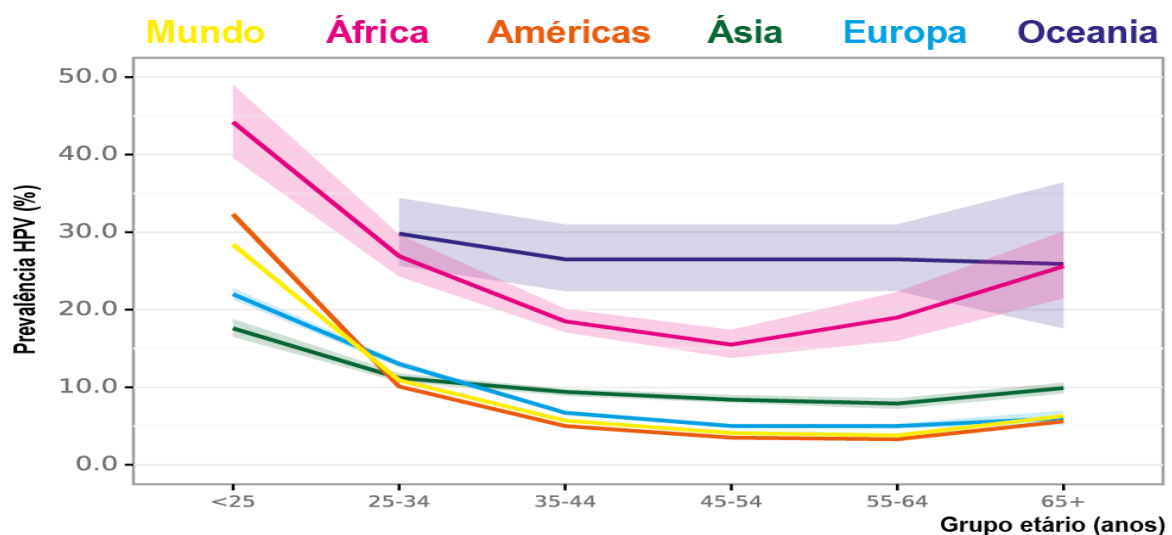


Figura 6: Taxa de prevalência da infecção por HPV mundial. Adaptado de Bruni *et al.*²⁶

Os tipos de HPV mais comumente encontrados, mesmo em mulheres com achados citológicos normais em todo o mundo são os tipos oncogénicos, nomeadamente, os tipos de HPV16, 18, 31, 51, 52 e 53 (Figura 7). No entanto, os tipos de HPV16 e 18 são responsáveis por cerca de 70% dos casos de cancro cervical no mundo.²⁶ Nos homens, as estimativas apontam para uma prevalência global de 31% para qualquer tipo de HPV e 21% para os HPV de alto risco, sendo o HPV16 o mais prevalente. Estes valores apontam para a ideia de que os homens sexualmente ativos, além de poderem sofrer morbilidades relacionadas com HPV, são um reservatório da infecção por HPV sexualmente transmissível²⁷

Os HPV têm uma elevada afinidade para células basais do epitélio escamoso estratificado, que se encontram na camada mais profunda do mesmo. Estas células atuam como células

estaminais e, por isso, sofrem divisão celular de forma a substituir as células libertadas da camada superficial do epitélio. Desta forma, o ciclo de vida viral está intimamente ligado à divisão e diferenciação das células infetadas.²⁸ Num cenário normal, as células diferenciadas não conseguem realizar a síntese do DNA. Porém, a ação das proteínas E6 e E7 do HPV é capaz de ativar os intervenientes necessários para que se realize a síntese do DNA viral, mantendo estas células na fase S do ciclo celular de forma que mantenham a maquinaria necessária para replicar o seu DNA.²⁹

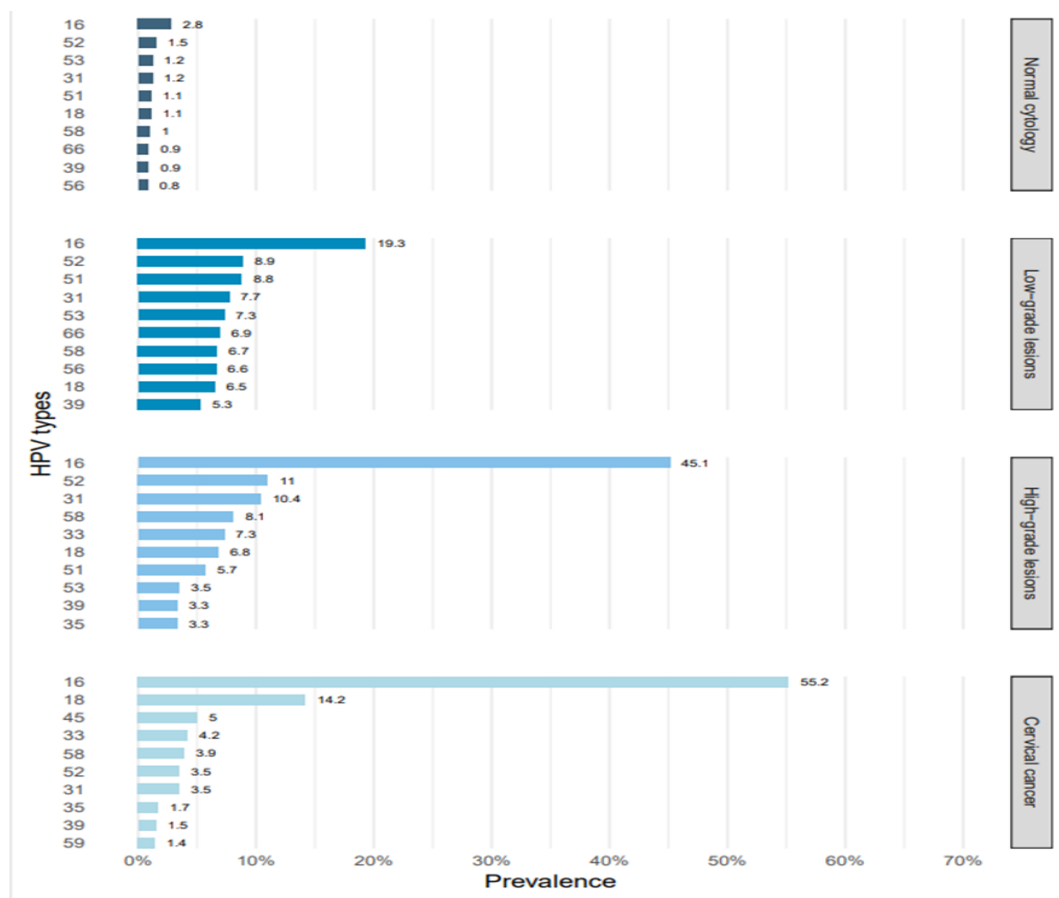


Figura 7: Comparação dos dez tipos oncogénicos de HPV mais frequentes no mundo entre mulheres com e sem lesões cervicais. Adaptado de Bruni *et al.*²⁶

Após a infeção, a carcinogénese leva algum tempo e as lesões pré-cancerígenas podem regredir espontaneamente, ou evoluir para cancro. Para que o cancro apareça tem de existir uma infeção crónica.³⁰ (Figura 8) Este processo requer uma expressão aumentada das oncoproteínas E6 e E7, presentes nos genótipos de alto risco, e que desempenham várias funções, tais como, indução da proliferação celular descontrolada de células indiferenciadas; angiogénese; evasão ao sistema

imunitário; inibição da apoptose; transformação das células do hospedeiro para que o vírus se possa replicar.³¹

A replicação do DNA viral leva à lesão do DNA nas células onde a replicação viral está a ocorrer. Durante a reparação e replicação celular das células do hospedeiro, o HPV aproveita para introduzir o seu material genético no genoma do hospedeiro, isto conseqüentemente leva a uma perda do gene viral E2 que anteriormente reprimia a expressão dos genes E6 e E7, mantendo a atividade destas proteínas em níveis baixos.³¹ A desregulação destes oncogenes tem a capacidade de imortalizar as células hospedeiras desencadeando o processo de transformação maligna.³²

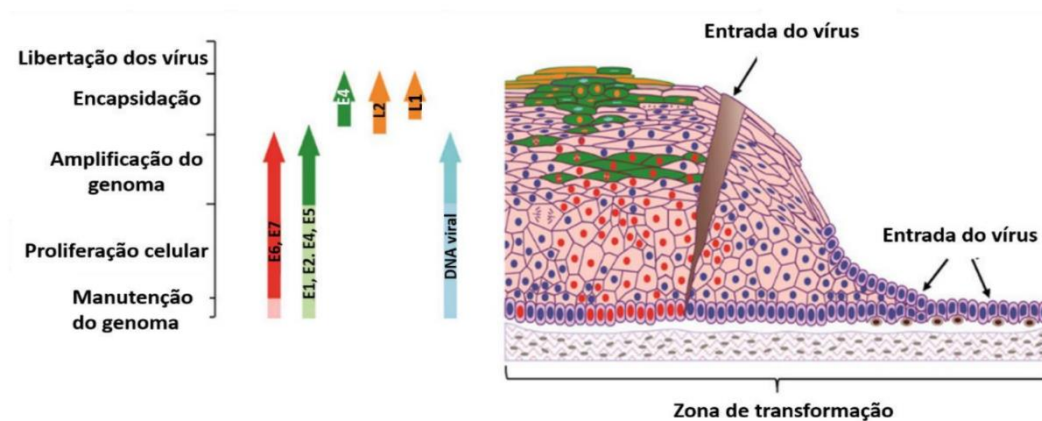


Figura 8: Várias etapas envolvidas no ciclo replicativo de HPVs de alto risco no epitélio cervical e proteínas intervenientes no processo. Adaptado de Doorbar *et al.*³³

A oncoproteína E6 tem como função principal degradar a proteína p53, codificada por um gene supressor tumoral. Esta proteína bloqueia o ciclo celular de células com mutações³¹ e tem ainda a capacidade de induzir a telomerase, assim não ocorre o encurtamento dos telómeros e há uma proliferação celular descontrolada.³⁴ Por sua vez, a E7 degrada a proteína retinoblastoma (pRb), o que, tal como no processo anterior, leva a uma proliferação celular descontrolada.²⁹ A pRb é uma proteína reguladora da transição das células da fase G1 à fase S, assim quando há degradação da mesma por ação da E7, a ciclina que é um dos fatores responsáveis pela ativação da fase S, fica livre e não controla as células normais das modificadas. Não havendo controle na replicação celular, nem reparação do DNA, há um crescimento celular descontrolado.³⁴ A oncoproteína E5 é a menos estudada e também a mais pequena. Esta reduz a concentração de leucócitos, diminuindo a resposta imunitária do hospedeiro.²⁹

A progressão da neoplasia é geralmente um processo gradual ao longo de anos. Esta mudança não é unidirecional, mas sim caracterizada por uma sucessão de processos de progressão e

regressão entre as diferentes fases.³⁵ (Figura 9) A forma como a lesão irá progredir ao longo do tempo é imprevisível, sabe-se que 40 a 60% das lesões LSIL regredem espontaneamente, no entanto cerca de 10 a 20% irão progredir até HSIL ou mais.³⁶⁻³⁸ Esta variabilidade encontra-se também associada com o tipo de HPV detetado na lesão. A infeção pelos genótipos de alto risco 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 e 58 apresentam um risco pelo menos duas vezes superior de desenvolvimento de HSIL nos 5 anos seguintes. Da mesma forma, as lesões cervicais com estes genótipos têm uma probabilidade de persistir durante pelo menos o dobro do tempo. Pelo que a genotipagem destes tipos de HPV pode ser um importante fator preditivo da probabilidade de desenvolvimento de SIL ou carcinoma invasivo.³⁹

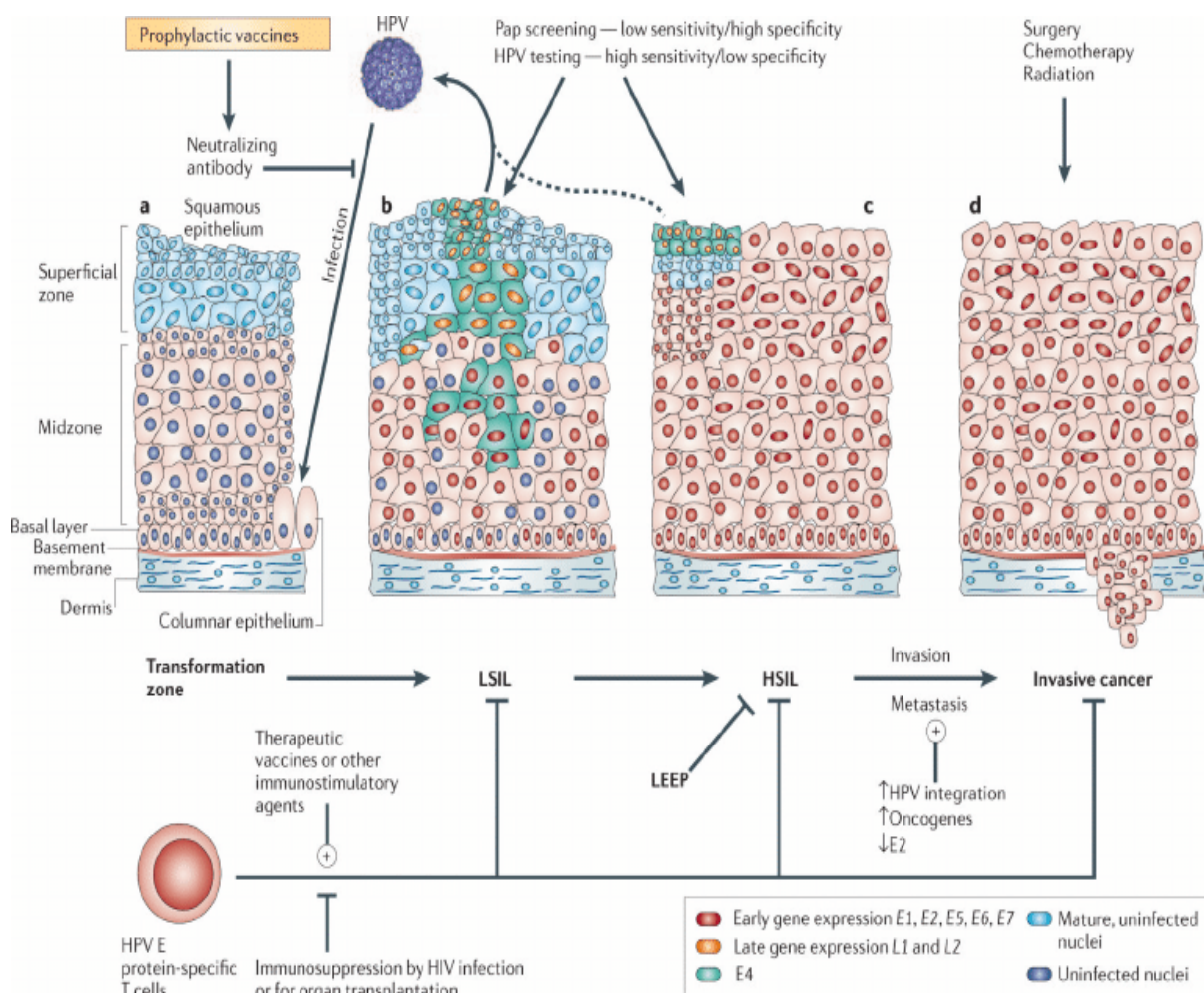


Figura 9: Progressão oncogénica do cancro do colo do útero. Adaptado de Roden & Wu⁴⁰

1.4. Estratégias de prevenção e diagnóstico

A implementação de programas adequados e generalizados de prevenção e diagnóstico do cancro cervical permitiria reduzir significativamente o fardo associado a esta patologia. Este objetivo pode ser atingido através da implementação de estratégias eficazes de prevenção

primária, secundária e terciária, com vista à redução do número de infeções por HPV, deteção e tratamento atempado de lesões pré-cancerígenas e ainda o fornecimento de tratamentos e cuidados paliativos adequados a doentes com cancro invasivo.⁴¹ (Figura 10)

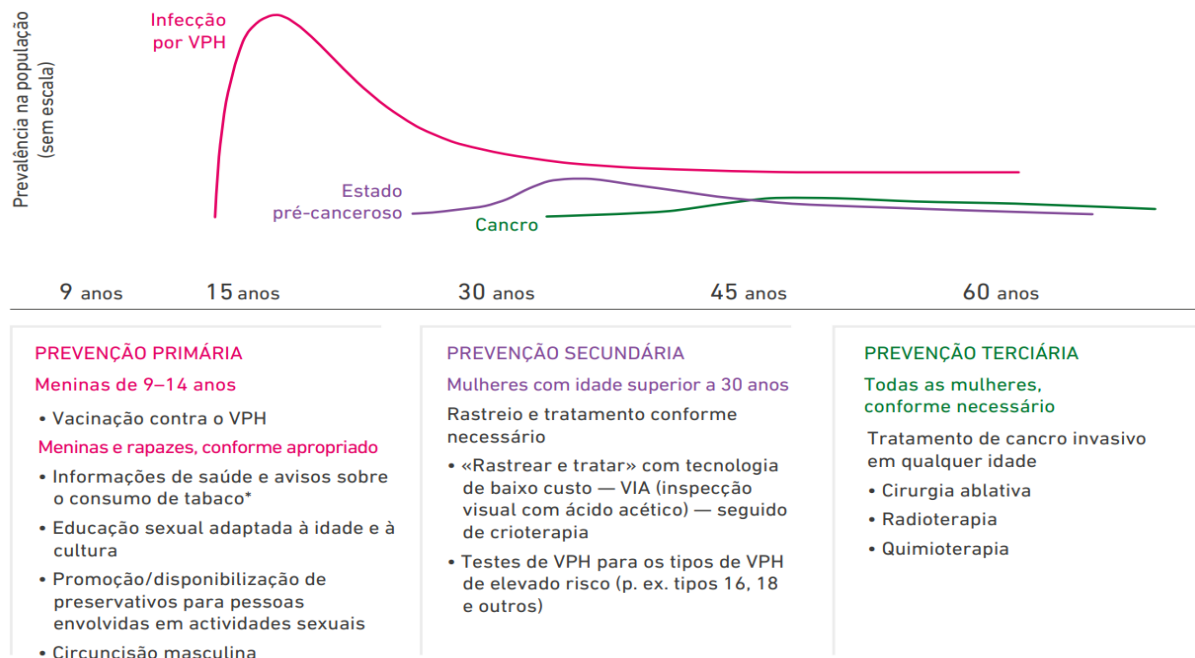


Figura 10: Intervenções programáticas para prevenção de infeções por HPV e cancro do colo do útero. Adaptado de WHO⁴¹

1.4.1. Vacinação: prevenção primária

A constatação, no início da década de 1980, de que a infeção por alguns tipos de HPV estava fortemente associada ao desenvolvimento de alguns tipos de cancro levou a uma forte aposta na investigação para o desenvolvimento de vacinas contra este vírus, como forma de prevenção e até tratamento das lesões associadas à infeção por HPV. Atualmente, existem seis vacinas contra o HPV disponibilizadas comercialmente e aprovadas para uso profilático. Todas elas são compostas por partículas semelhantes ao vírus baseadas na proteína L1, que não têm capacidade de infeção, mas produzem uma resposta imunitária do indivíduo.⁴² A principal diferença entre elas reside sobretudo na sua valência, isto é, na quantidade de genótipos de HPV diferentes para os quais oferecem proteção.

A primeira vacina a ser desenvolvida e aprovada pela norte-americana *Food and Drug Administration* (FDA) em 2006 foi a vacina quadrivalente Gardasil®. Esta oferece proteção contra os dois tipos de HPV mais oncogénicos e responsáveis por quase 70% dos cancros cervicais, o HPV16 e o HPV18, e ainda contra o HPV6 e 11, responsáveis por aproximadamente 90% das verrugas genitais benignas.⁴³ Quase em paralelo foi aprovada pela Agência Europeia do Medicamento (EMA) em 2007 e pela FDA, em 2008, a vacina Cervarix®, que oferece proteção

contra os dois tipos mais oncogénicos de HPV (16 e 18).⁴⁴ Posteriormente, a Gardasil 9® foi licenciada em 2014 e veio oferecer uma proteção mais ampla, incluindo cinco tipos adicionais de HPV (HPV31, 33, 45, 53 e 58). Mais recentemente foram aprovadas na China duas novas vacinas bivalentes contra o HPV (Walrinvax® e Cecolin®) e na Índia uma vacina quadrivalente (Cervavac®).⁴⁵

A posição da OMS sobre a vacinação contra o HPV defende que o público-alvo da vacinação sejam os jovens adolescentes entre os 9 e 14 anos de idade. Apesar da vacinação precoce de raparigas ser uma estratégia eficaz e eficiente em termos de custos para prevenir o cancro do colo do útero, esta estratégia será ineficiente na erradicação da infeção por HPV e suas consequências.⁴⁶ A vacinação de ambos os sexos terá um papel crucial na eliminação dos cancros relacionados com o HPV⁴⁷ uma vez que a evidência demonstra que as infeções por HPV ocorrem com maior frequência nos homens do que nas mulheres.⁴⁸ Assim, a vacinação masculina precoce contra o HPV é eficaz na prevenção de verrugas anogenitais, cancro do pénis e anorretal, mas também na prevenção e transmissão de infeções assintomáticas.⁴⁹

Desta forma, em diversos países foram já iniciados programas de vacinação generalizados da população adolescente do sexo feminino ou de ambos os sexos. (Figura 11) Em Junho de 2020, 107 dos 194 Estados-Membros da OMS haviam introduzido a vacinação contra o HPV em todo o país ou parcialmente. No entanto, apenas 33 destes programas incluíam a vacinação de rapazes, maioritariamente na Europa, Américas e Austrália. Estes dados traduzem-se numa estimativa global de cerca de 15% das raparigas e 4% dos rapazes vacinados com o esquema completo da vacina, e 20% e 5% receberam pelo menos uma dose, respetivamente.⁵⁰



Figura 11: Representação da introdução do programa de vacinação nos diferentes continentes. Adaptado de Bruni *et al.*⁵⁰

Em Portugal, a vacina tetravalente foi incluída no Plano Nacional de Vacinação a partir de março de 2008 para raparigas com 13 anos de idade. Desde 2017, foi introduzida a vacinação com Gardasil® 9 a todas as raparigas aos 10 anos de idade, e desde outubro de 2020, a vacinação foi alargada aos rapazes nascidos a partir de 2009.⁵¹

Nos países de baixo e médio rendimento, tem havido um esforço e investimento na vacinação contra o HPV para combater o cancro do colo do útero. Em 2019, 87% dos programas de vacinação iniciados foram em países deste grupo, nomeadamente seis na África Subsaariana (Gâmbia, Libéria, Costa do Marfim, Quênia, Malawi e Zâmbia), cinco na América Latina e Caribe (Costa Rica, Dominica, Granada, São Cristóvão e Nevis e Santa Lúcia) e três na Ásia e Pacífico (Uzbequistão, Maldivas e Ilhas Salomão). (Figura 12) Apesar disso, as taxas de vacinação ainda são baixas.⁵⁰

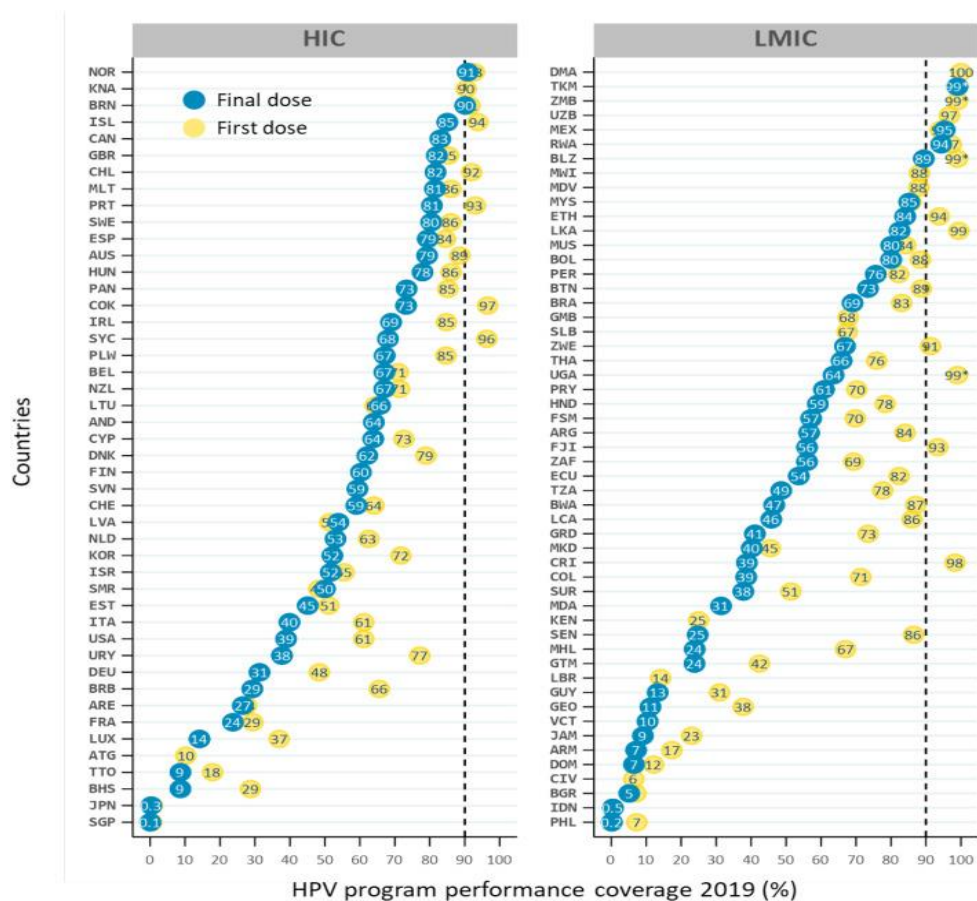


Figura 12: Comparação entre as estimativas de cobertura do programa de vacinação contra o HPV específico para meninas em países de alta renda (HIC) e de baixa/média renda (LMIC). Adaptado de Bruni *et al.*⁵⁰

Em Angola, foi recentemente aprovada a introdução da vacinação das meninas pré-adolescentes com a vacina chinesa Cecolin® como uma medida efetiva de prevenção de cancro de colo de útero nas raparigas. As metas de cobertura nacional em 2024 são de vacinar 90% das raparigas

do país entre os 9 e os 13 anos de idade com uma dose da vacina, através da vacinação nas escolas de 95% das raparigas matriculadas e de 80% das raparigas na mesma faixa etária que se encontram fora do sistema escolar.

1.4.2. Rastreio: prevenção secundária e diagnóstico precoce

A introdução de programas de rastreio do cancro do colo do útero a partir da década de 1960 em vários países da Europa, América do Norte e Japão foi uma das principais responsáveis por uma acentuada diminuição na sua incidência e mortalidade. Até então as taxas de incidência nestas regiões eram idênticas às verificadas atualmente nos países em desenvolvimento e, nos países pioneiros, verificaram-se reduções de até 80% na taxa de mortalidade por CCU nas três décadas seguintes.⁵²

Para que um programa de rastreio seja bem-sucedido, este deve ter em consideração diversos parâmetros na escolha do teste de rastreio: validade, fiabilidade, segurança, aceitabilidade, simplicidade e custo. Um teste de rastreio válido e fiável deve ser reprodutível e apresentar uma elevada sensibilidade e especificidade, tendo em conta a população-alvo e as condições em que vai ser utilizada. Atualmente, diferentes métodos são utilizados para a deteção de lesões causadas por HPV ou do próprio vírus, sendo os mais utilizados a citologia e os testes moleculares para deteção de HPV, que podem ser utilizados de forma isolada ou em combinação.

1.4.2.1. Citologia

A citologia, no contexto do rastreio de CCU, é o método através do qual se efetua uma colheita de células do colo, com o objetivo de identificar anormalidades celulares na zona de transformação.⁵³ Este é o principal local onde ocorrem as alterações displásicas e neoplásicas, o que torna necessário a colheita de uma boa amostra desta região.^{53,54} Após a colheita, o material pode ser estendido numa lâmina de vidro ou disperso num meio líquido fixador.⁵⁴ Existem, assim, dois tipos de citologia exfoliativa cervical: a convencional e a realizada em meio líquido.

O rastreio por citologia esfoliativa constituiu o principal contributo para a grande redução na mortalidade por cancro do colo do útero nos países desenvolvidos.⁵⁵ A citologia em meio líquido permite ultrapassar algumas das limitações de colheita da citologia convencional, possibilitando um processamento das lâminas mais homogêneo e menos citologias insatisfatórias. Além disso, permite a automatização, com processamento de grandes volumes de amostras e redução dos custos para os laboratórios, possibilitando ainda a realização de testes complementares na mesma amostra, como a pesquisa de HPV, ou outras DST.^{55,56} No entanto, não há diferenças na

sensibilidade e especificidade para as lesões de alto grau relativamente à citologia convencional.⁵⁶

O rastreio citológico apresenta fraca reprodutibilidade inter-observador e elevada taxa de falsos negativos, decorrentes do facto de o resultado citológico ser dependente da interpretação do patologista sendo, por isso, subjetivo. Esta variabilidade pode resultar em abordagens diagnósticas e terapêuticas consideravelmente diferentes.⁵⁷ De forma a uniformizar terminologias e otimizar a gestão de pacientes foi desenvolvido o Sistema de Bethesda, que introduziu um modelo de relatório padronizado em citologia cervicovaginal, que para além da sua reprodutibilidade, reflete o conhecimento mais atual sobre o cancro do colo do útero. Assim, as alterações citológicas encontradas no colo do útero são designadas SIL e dividem-se em: Lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL), quando se verificam alterações celulares ligeiras, geralmente oriundas de infeções por HPV autolimitadas; e Lesão intraepitelial de alto grau (HSIL), quando as alterações apresentam alto risco de malignidade. Quando o grau de atipia não é suficiente para determinar lesão intraepitelial escamosa, utiliza-se a terminologia ASC. Esta divide-se em ASC-US e ASC-H. São consideradas ainda as alterações compatíveis com carcinoma de células pavimentosas e as lesões que têm origem em células glandulares, sendo incluídas as células glandulares atípicas (AGC) e o adenocarcinoma do colo do útero.⁷

Apesar de a citologia ter reduzido a incidência e a mortalidade por carcinoma de células escamosas na maioria dos países desenvolvidos, é menos eficaz na deteção e prevenção de adenocarcinomas, apresentando baixa sensibilidade na deteção de adenocarcinoma in situ (AIS) e lesões precursoras.⁵⁵

A natureza subjetiva da citologia acentuou-se na era pós-vacinação. A menor prevalência de lesões intraepiteliais nas coortes vacinadas condiciona uma menor precisão na interpretação das alterações citológicas pelos citopatologistas, resultando numa redução da sensibilidade e do valor preditivo positivo (VPP) de 50-70% para 10-20% para CIN2+, comprometendo a eficiência do programa de rastreio na população vacinada.⁵⁸ Para além disto, em mulheres vacinadas os resultados anormais da citologia passam a consistir maioritariamente em pequenas anormalidades causadas por genótipos de menor potencial oncogénico.⁵⁹ Assim, embora haja menos mulheres com alterações escamosas, a prevalência de anormalidades benignas e lesões de baixo grau ou de grau indeterminado permanecerão as mesmas, levando à redução na discriminação de lesões escamosas verdadeiras de outras condições benignas.⁵⁵

1.4.2.2. Teste de HPV-DNA

O teste de HPV permite identificar a presença de alguns genótipos de hrHPV em esfregaços cervicovaginais. O princípio deste teste assenta no conhecimento de que a infeção pelo hrHPV é condição necessária para o desenvolvimento do cancro do colo do útero e que o DNA do HPV está presente em 99.7% dos cancros invasivos.⁵⁶ O teste de HPV tem tido um número crescente de aplicações clínicas. Entre elas destacam-se a triagem da citologia ASC-US, na qual apresenta maior acuidade para deteção de CIN2+ do que a citologia, e a vigilância pós-colposcopia ou pós-tratamento, nas quais apresenta uma sensibilidade elevada na deteção de doença residual/recorrência.⁵⁶

Como método primário de rastreio do cancro do colo, o teste de HPV revelou uma proteção para carcinoma invasivo 60-70% superior à citologia, sendo que um teste de HPV negativo apresenta um risco cumulativo de desenvolver lesão de CIN3+ nos três anos seguintes significativamente inferior ao de um resultado citológico negativo (risco de 0,069% após teste de HPV negativo vs. risco de 0,11% após citologia negativa).⁶⁰ O teste de HPV apresenta ainda um valor preditivo negativo que ronda os 100% e é mais reprodutível que a citologia.⁵⁶

O teste de HPV tem elevada sensibilidade na deteção de CIN2+ (8-30% superior à citologia), embora tenha menor especificidade do que a citologia (4-12% inferior), especialmente em mulheres jovens.^{56,61} Isto deve-se principalmente à deteção de infeções transitórias que ainda não produziram alterações citológicas, já que as mulheres jovens apresentam maior prevalência de infeção, mas também maior capacidade de resolução espontânea das mesmas.⁶²

Tabela 2: Exemplos de alguns tipos de testes de HPV comercializados internacionalmente e suas características. Adaptado de Moutinho *et al.*⁵⁶

Nome e empresa	Método	Genótipo	Utilidade
Hybrid Capture 2 (HC2)	DNA (amplificação de sinal)	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68	Teste primário ≥ 30 anos Co-teste com citologia (deteção HPV alto risco)
Cervista HPV HR	DNA (amplificação de sinal)	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68	Teste primário ≥ 30 anos Co-teste com citologia (deteção HPV alto risco)
Cervista HPV-16, 18	DNA (Amplificação de sinal)	16, 18	Co-teste: Cervista HPV HR (+) e citologia (-) (deteção de HPV 16 e 18)

Cobas HPV test	DNA (amplificação do alvo)	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68	Co-teste com citologia (deteção HPV alto risco) Pode ser método primário de rastreio ≥ 25 anos
BD Onclarity HPV assay	DNA (amplificação do alvo)	16, 18, 45, 31, 33, 35, 39, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68	Co-teste com citologia (deteção HPV alto risco) Pode ser método primário de rastreio ≥ 25 anos
Aptima HPV assay	Deteção de E6/E7 mRNA por RT-PCR	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68	Teste primário ≥ 30 anos Co-teste com citologia (deteção HPV alto risco)
Aptima HPV 16 18/45 Genotype Assay	Deteção de E6/E7 mRNA por RT-PCR	16, 18, 45	Co-teste quando Aptima HPV assay é (+)

1.4.2.3. Co-teste (Citologia + HPV-DNA)

O co-teste é a realização de rastreio utilizando a citologia e o teste de HPV em simultâneo. Até 2018, várias organizações americanas recomendaram o co-teste como o método de rastreio preferencial para mulheres na faixa etária dos 30 aos 65 anos.⁶³ O co-teste mostrou uma sensibilidade 42% superior na deteção de CIN2+ e 33% superior na deteção de CIN3+ do que a citologia isolada, mas uma especificidade mais baixa em 6% e 8% respetivamente.⁶¹ Comparando com o teste de HPV isolado, o co-teste apresentou uma sensibilidade 5% e 2% maior na deteção de CIN2+ e CIN3+, respetivamente, mas menor especificidade.⁶⁴

No entanto, o co-teste sistemático resulta em custos mais altos do que o teste de HPV isolado, bem como em maiores taxas de encaminhamento para colposcopia, apresentando menor VPP para deteção de CIN2+ entre as mulheres encaminhadas. As evidências disponíveis em vários ensaios clínicos não indicam que efetuar co-teste a todas as mulheres seja mais protetor do que realizar o teste de HPV primário.⁶⁴ Deste modo, para evitar eventuais danos e custos desnecessários, apenas um teste primário (citologia ou teste de HPV) deve ser usado em qualquer idade no rastreio do CCU.⁶⁴

1.4.2.4. Inspeção visual com ácido acético (VIA)

Os programas de rastreio com base na citologia ou em testes moleculares requerem infraestruturas (laboratórios) e técnicos qualificados, bem como um sistema de controlo de qualidade bem definido. Estes recursos revelam-se caros e difíceis de implementar para muitos países com baixos recursos, o que se constata pela disparidade global observada nas taxas de cancro do colo do útero.⁶⁴

A inspeção visual com ácido acético (VIA) foi implementada em ambientes e países com recursos e acesso limitados aos cuidados de saúde devido ao seu baixo custo e baixos requisitos de infraestrutura. Em ensaios de intervenção randomizados realizados na Índia verificou-se uma redução significativa na mortalidade em comparação com a não realização de nenhum rastreio após uma única rodada ou várias rodadas da inspeção visual com ácido acético. A redução da incidência de cancro do colo do útero após a triagem foi observada em apenas um desses ensaios. Além disso, um estudo randomizado e controlado conduzido na África do Sul mostrou uma redução na deteção de CIN2+ 6 meses após a triagem por este método. Desta forma, a VIA tem sido estabelecida como uma boa alternativa para reduzir a mortalidade associada ao cancro do colo do útero, podendo mesmo reduzir a incidência da doença.⁶⁵

1.4.2.5. Biomarcadores de diagnóstico precoce

Apesar dos programas de rastreio recomendados para o cancro do colo do útero e da implementação de campanhas de vacinação em curso, as taxas de morbilidade e mortalidade desta patologia continuam a crescer nos anos mais recentes.⁶⁶ Assim a procura por novos marcadores genéticos, moleculares ou imunocitoquímicos que possam auxiliar no diagnóstico precoce de lesões pré-cancerígenas e na caracterização das alterações neoplásicas é de extrema importância.

A progressão de infeção transitória para infeção transformadora caracteriza-se por um aumento significativo da expressão do mRNA dos oncogenes E6/E7, assim a deteção da expressão do mRNA destes oncogenes pode ser utilizada como marcador preditivo do risco de progressão da lesão.⁶⁷ Durante o processo, a expressão destes oncogenes virais afeta também a expressão e função de diversos genes e proteínas do hospedeiro, através de interações proteicas ou devido a acumulação de alterações epigenéticas em genes supressores tumorais, e.g. as regiões promotoras de genes supressores tumorais podem tornar-se hipermetiladas, levando à diminuição da expressão de proteínas reguladoras.^{68,69} Estas alterações nos padrões de metilação ocorrem no início da carcinogénese e são frequentemente retidas e mantidas em

tumores invasivos, sendo o aumento dos níveis de metilação proporcional à gravidade da lesão. Os testes de metilação são testes promissores na triagem de testes HPV positivos, apresentando uma sensibilidade e especificidade muito elevada na detecção de lesões HSIL e carcinoma invasivo).⁷⁰

Dois dos biomarcadores melhor estudados e utilizados na detecção e caracterização de infecções por HPV são as proteínas p16INK4a e Ki-67. A proteína p16INK4a é uma proteína reguladora do ciclo celular, que atua como supressor tumoral por bloqueio da fosforilação da proteína RB (pRB). A inativação da pRB pela E7 resulta no aumento da produção da p16INK4a por um mecanismo de feedback negativo, sendo esta proteína um marcador direto da atividade oncogénica do HPV, da qual pode resultar um cancro invasivo. A proteína Ki-67 é expressa no núcleo de células em fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e M), sendo por isso um bom marcador de proliferação celular.⁷¹ A expressão simultânea dos marcadores p16 e Ki-67 deve-se excluir mutuamente sob condições fisiológicas normais, uma vez que possuem efeitos antagónicos: enquanto p16 tem atividade antiproliferativa, Ki-67 é expresso em células em divisão. Portanto, acredita-se que a co-expressão dos dois marcadores poderá identificar as células em verdadeira transformação oncogénica, por identificar células com ciclo celular anormal.⁷² (Figura 13)

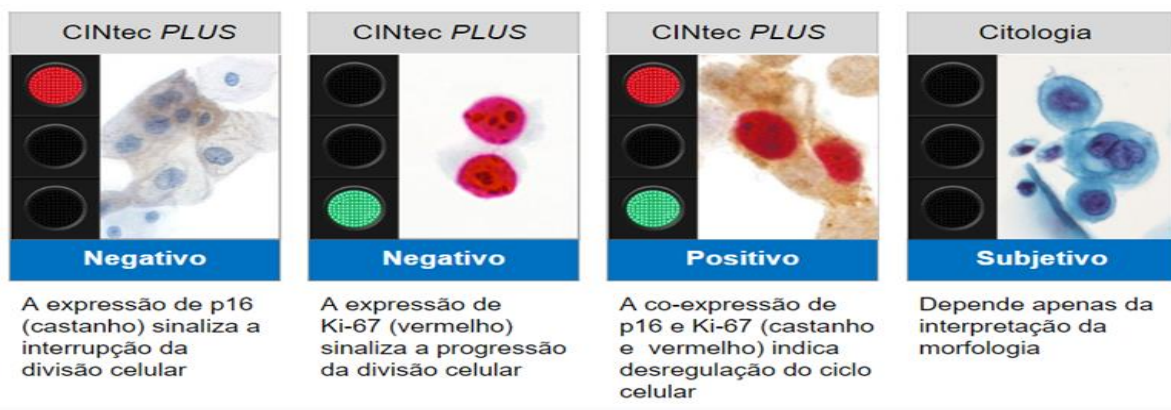


Figura 13: Representação da co-expressão p16/Ki-67. Adaptado de Roche.⁷²

Diversos estudos demonstram que detecção conjunta por imunocitoquímica destes dois marcadores apresenta elevada sensibilidade e especificidade (95%) na detecção de HSIL, com elevado VPP, sendo um método eficiente na triagem de testes HPV positivos, com a vantagem de reduzir a referência para colposcopia.^{73,74} Assim, a metodologia CINtec® PLUS foi desenvolvida e já aprovada para utilização na triagem de mulheres com teste HPV positivo.⁷¹ Este método deteta dois produtos de reação diferentes: um precipitado castanho no núcleo e/ou citoplasma de células que sobre-expressam p16INK4a, e um precipitado vermelho no núcleo de

células com expressão de Ki-67. A presença da marcação simultânea na mesma célula é definida como CINtec® PLUS positiva.⁷¹



Figura 14: Algoritmo aprovado pela FDA para a triagem de mulheres com teste de hrHPV +. Adaptado de Roche⁷²

1.5. Desafios e Estratégias na Implementação de Programas de Rastreamento

O rastreamento do cancro cervical é feito a nível mundial de variadas formas. De uma maneira geral existem duas categorias de rastreamento: 1) o rastreamento organizado, de base populacional e 2) o rastreamento oportunista, em que o teste de rastreamento é realizado no âmbito de uma consulta sem periodicidade definida. O rastreamento organizado é mais abrangente, económico e permite um maior controlo da qualidade do resultado, é uma medida de Saúde Pública e deve abranger toda a população. Estes rastreios, para além de ajudarem a identificar lesões precursoras de cancro e estádios iniciais da doença, ajudam ainda a promover a literacia em saúde.⁵⁹ Ao contrário do rastreamento organizado, o rastreamento oportunista é considerado um cuidado de saúde personalizado uma vez que é realizado a pedido do indivíduo ou porque o teste lhe foi proposto pelo seu profissional de saúde. Desta forma, este tipo de rastreamento é caracterizado por uma grande heterogeneidade no acesso, com uma elevada participação de certas partes da população, que são rastreadas com demasiada frequência, combinada com uma baixa participação noutros grupos, sobretudo de estatuto socioeconómico mais baixo.⁷⁵

Em países de baixos recursos, como alguns países africanos, os programas de rastreamento são muito difíceis de implementar. No entanto tem sido feito um esforço para implementar programas de rastreamento adequados à realidade de cada país e, na sua maioria, já existe algum tipo de protocolo ou projeto-piloto de rastreamento quer seja pela utilização do método de inspeção visual seguido do tratamento de lesões identificadas por crioterapia, pela utilização da citologia ou mesmo alguns

exemplos onde começa a ser explorado o teste de HPV (e.g. Camarões e Ruanda). No entanto, à data, apenas a África do Sul tem um programa de rastreio de base populacional organizado.⁶⁵ De uma forma geral, as diretrizes recomendam o rastreio citológico em intervalos de 3 a 5 anos quando os resultados dos testes são normais, geralmente começando aos 20–30 anos de idade (preferencialmente a partir dos 25 anos) e terminando aos 60–65 anos. Com os avanços nos métodos moleculares, as recomendações têm sido atualizadas para a realização de testes primários para o HPV num intervalo de pelo menos 5 anos, a iniciar aos 30–35 anos de idade.⁴² Independentemente dos métodos de rastreio primário utilizados em cada país, existe uma preocupação comum com as mulheres que nunca ou irregularmente participam no rastreio do CCU. Uma opção para estas mulheres é a auto-amostragem com kits oferecidos nas comunidades ou enviados por correio para as suas casas. A Holanda é o país europeu com maior sucesso na transição do programa de rastreio do CCU de uma estratégia baseada em citologia para o teste de HPV. Foi também o primeiro país a incluir a auto-colheita para teste de HPV no programa de rastreio. Habitualmente, as amostras são colhidas pelos clínicos gerais, no entanto, a opção de auto-amostragem é oferecida às mulheres que faltam ao rastreio. Para amostras positivas para HPV, a citologia é usada como teste de triagem. Estratégias semelhantes têm sido implementadas noutros países da Europa do Norte, Canadá e Austrália.^{66,76}

1.5.1. Otimização de recursos e recomendações globais

A melhor estratégia de prevenção do CCU combina a vacinação contra o HPV com o rastreio do CCU, idealmente com iguais taxas de cobertura e adesão. Com os resultados verificados até hoje pela implementação de programas de rastreio, percebeu-se que é fundamental continuar a apostar nesta medida de prevenção, tornando prioritária a estruturação de programas de rastreio organizado em detrimento do rastreio oportunista. Para que estas estratégias sejam eficazes e tenham resultados favoráveis a curto e longo prazo é essencial dar conhecimento da existência das mesmas à população-alvo, fornecendo informação qualificada e segura, de modo a aumentar as taxas de adesão.⁶³

Com esta mudança de paradigma surgem novos desafios que devem ser considerados de forma a otimizar o rastreio, evitando gastos desnecessários, sobrecarga das unidades de colposcopia e possível iatrogenia. Esta otimização pode ser feita através da triagem de resultados positivos do teste de HPV, nomeadamente através dos biomarcadores, que incluem a dupla marcação p16INK4a/Ki-67 e os testes de metilação. É, no entanto, necessário ter em conta os recursos

financeiros de cada país e sistema de saúde e a possível dificuldade de acesso a estes métodos numa perspetiva quotidiana.⁹

Têm sido efetuados estudos do impacto económico da inclusão destes marcadores em programas de rastreio, tendo-se observado que a sua inclusão num contexto de triagem de testes HPV positivos e citologias reflexas de baixo grau (ASC-US/LSIL) possibilitará uma redução significativa das mulheres referenciadas para as unidades de colposcopia, com redução da sobrecarga destas unidades, minimizando a ansiedade e a iatrogenia associadas.⁵⁹

2. Objetivo

Este estudo é de grande impacto, uma vez que em Angola, não existe ainda nenhum programa de rastreio organizado, o rastreio oportunista ou em pequeno programa-piloto realiza-se por VIA ou muitas das vezes inicia-se por colposcopia. Até à data, ainda não existem planos para a implementação do rastreio molecular nem existem estudos sobre a prevalência do vírus HPV na população. Neste sentido o projeto teve como objetivo recolher dados observacionais sobre as taxas de positividade para genótipos de hrHPV e citologia de dupla coloração (DS) p16/Ki-67, correlacionando estes dados com os resultados da citologia Papanicolau (PAP).

De forma a atingir estes objetivos globais, foram definidos vários objetivos específicos:

1. Determinar a prevalência de infeção do HPV com a caracterização de 14 subtipos de hrHPV e em específico dos subtipos 16 e 18, através do *cobas® HPV test* e comparar com a prevalência noutros países;
2. Avaliar a correlação da prevalência de alterações citológicas com o resultado do teste molecular de HPV;
3. Avaliar a correlação entre a dupla marcação (p16/Ki-67) e a citologia papanicolau em mulheres com teste molecular de HPV positivo prevendo o impacto no follow-up e referência para colposcopia e biópsia.

Desta forma, este trabalho pretende, em primeiro lugar, gerar um conjunto de evidências sobre a prevalência da infeção por HPV em Angola e a sua relação com a prevalência de lesões cervicais pré-malignas. Tem também como objetivo avaliar o impacto da implementação de novos métodos moleculares no rastreio do cancro cervical em Angola e de que forma a realização da triagem dos casos hrHPV positivos com DS p16/Ki-67, em vez da PAP, permitirá reduzir o número de referências para colposcopias desnecessárias.

3. Métodos

3.1. Caracterização da amostra

O tamanho da amostra foi selecionado tendo em consideração uma estimativa da casuística local de mulheres HPV-positivas e da prevalência de lesões de alto grau, tendo por base a positividade para HPV reportada noutros países da África Ocidental e a carga de doença reportada no país. Assumindo uma prevalência da infeção pelo hrHPV de 20% na população Angolana, foi necessário um tamanho mínimo de amostra de 1386 indivíduos (incluindo 231 indivíduos com a doença) para atingir um poder mínimo de 80% para detetar uma alteração no valor percentual da sensibilidade de um teste de triagem de 0.70 a 0.95, com base num nível de significância alvo de 0.05. Assim, foram recrutadas para este estudo 1420 mulheres, com idade igual ou superior a 25 anos, das quais 267 foram posteriormente excluídas (Figura 15).

Todas as mulheres inscritas foram registadas num *software*, bem como todos os resultados obtidos (PAP, teste HPV, DS). Todos os dados recolhidos/obtidos para determinar o desempenho do Teste de HPV-DNA no panorama da deteção precoce do cancro do colo do útero foram guardados para aperfeiçoamento dos serviços de saúde prestados, e criação de registo de dados oncológicos.

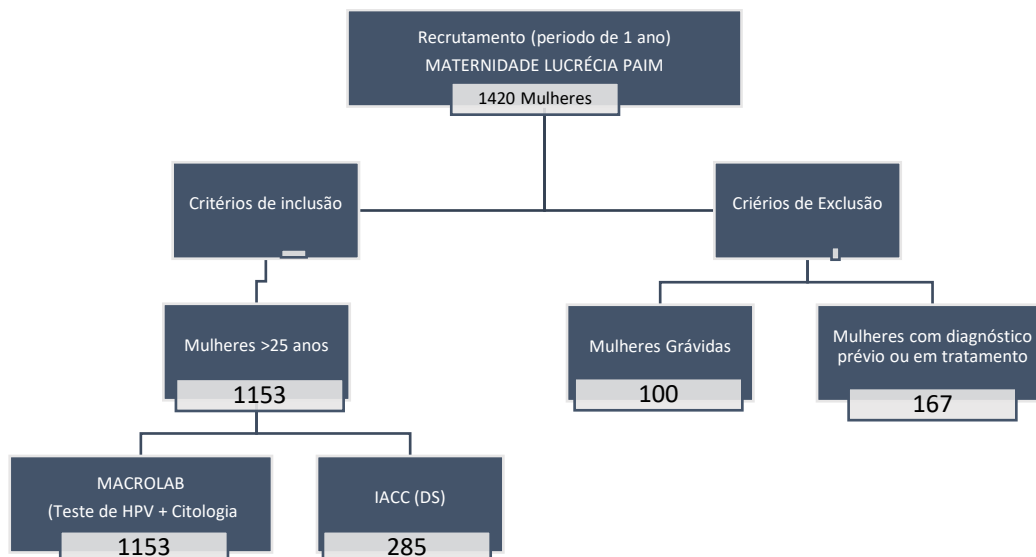


Figura 15: Representação da dinâmica do material e métodos.

As colheitas cervicovaginais foram realizadas com *cytobrush*, na Maternidade Lucrecia Paim (Maternidade de referência em Angola), no período de fevereiro de 2022 a fevereiro 2023. As amostras foram fixadas e acondicionadas em meio líquido *Roche Cell Collection Medium* (Roche, Sandhofer, Germany). E posteriormente submetidas a genotipagem de hrHPV e ao processamento citológico na Macrolab, um Centro de Diagnóstico Laboratorial com competência

em Anatomia Patológica e Biologia Molecular. A técnica de dupla marcação imunocitoquímica foi realizada no IACC (Instituto Angolano de Controle do Cancer).

3.2. Citologia

As amostras em meio líquido *Roche Cell Collection Medium* (Roche, Sandhofer, Germany), foram processadas por citocentrifugação, utilizando 2 mL de amostra, a uma rotação de 2000 rpm durante 5 min, na *Epredia™ Cytospin™ 4 Cyto centrifuge* (Epredia, Milano, Itália) para obter os esfregaços citológicos para microscopia ótica de acordo com o protocolo do fornecedor. Todas as lâminas foram coradas pela técnica de Papanicolaou com o corante nuclear Hematoxilina de Harris e citoplasmáticos *Cytopath EA50* e Orange G seguindo protocolo de acordo com as instruções da marca (Diapath, Bergamo, Itália) e montagem com *Entellan* (Merck, Darmstadt, Alemanha). O *screening* citológico e registo das alterações citológicas encontradas foi realizado de acordo com o sistema de Bethesda 2022.⁷⁷ Todos os casos foram vistos por um observador e revistos por um segundo. A interpretação de LSIL e HSIL manteve-se em todos os casos.

3.3. Teste molecular hrHPV

Para a deteção de subtipos de alto risco do Papilomavírus Humano utilizou-se um teste qualitativo *in vitro* – *kit HPV cobas® 4800* (Roche, Sandhofer, Alemanha). Este teste identifica especificamente os tipos HPV16 e HPV18 enquanto deteta simultaneamente os restantes tipos de alto risco (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 e 68).

Resumidamente, a extração de DNA foi realizada de forma automática utilizando o equipamento Cobas Z 480 e a amplificação foi realizada por PCR em tempo real no Cobas X 480 (Roche, Sandhofer, Alemanha) de acordo com o protocolo do fornecedor. O *kit* contém um conjunto de *primers* concebido para detetar e amplificar especificamente uma região de aproximadamente 200 nucleótidos na região L1 do genoma de cada um dos 14 subtipos de HPV incluídos. Os fragmentos amplificados são detetados pela ligação de sondas oligonucleotídicas fluorescentes. Adicionalmente, foram incluídos dois controlos externos: a enzima AmpErase para evitar os falsos positivos e a β -globina para evitar falsos negativos.

3.4. CINtec® PLUS

As amostras citológicas destinadas à coloração imunocitoquímica com CINtec® PLUS (Roche, Basileia, Suíça) foram armazenadas a 30 °C durante 6 semanas, seguidas de mais 12 semanas refrigeradas a 8 °C. Imediatamente após o processamento, as lâminas ThinPrep® foram fixadas

em etanol a 99% durante 30 minutos e secas ao ar durante a noite. A técnica iniciou-se com a recuperação antigénica (HIER – *Heat Induced Epitope Retrieval*) realizada de forma automatizada no Ventana BenchMark GX (Roche, Basileia, Suíça). A técnica de dupla marcação imunocitoquímica foi realizada no mesmo equipamento de acordo com as instruções de uso do CINtec® PLUS *kit* de citologia. Por fim, a montagem contemplou duas fases: a primeira aquosa, com CC/Mount™ 4 horas a 37°C; depois realizou-se a montagem definitiva, mergulhando as lâminas em xilol e depois montando-as com *Entellan* (Merck, Darmstadt, Alemanha).

As amostras foram divididas em séries de 10–30 amostras. Em cada série usou-se uma lâmina de controlo positivo (amostra de HSIL), preparada a fresco todos os dias, para ser utilizada em cada corrida. O controlo negativo é a própria amostra.

Uma vez que houve negatividade da técnica de DS em casos de citologia positiva procedeu-se à repetição da coloração imunocitoquímica diretamente nas lâminas utilizadas para diagnóstico citológico. Para tal, foi necessário remover as lamelas com xilol e realizar a descoloração citológica de acordo com o protocolo para CINtec® PLUS.

A avaliação das células num teste CINtec® PLUS seguiu critérios específicos para garantir uma análise precisa e as lâminas foram classificadas como positivas, negativas ou inconclusivas.

Considerou-se células positivas para DS as que apresentaram simultaneamente coloração vermelha no núcleo (Ki-67) e castanha no citoplasma (p16). Foi considerado resultado positivo, a presença de uma ou mais células com dupla marcação, i.e. basta uma célula para o caso ser considerado positivo. Considerou-se inconclusivo, casos em que as colorações foram fracas ou inconsistentes.

3.5. Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o software IBM SPSS Statistics, versão 28. As características demográficas da amostra estudada foram descritas utilizando estatísticas descritivas. Para variáveis contínuas, foram calculadas a média, o desvio padrão, a mediana, o erro padrão da média e os intervalos interquartis. Para variáveis categóricas, foram calculadas frequências absolutas e relativas. As associações entre as diferentes variáveis em estudo foram calculadas utilizando o teste do qui-quadrado (χ^2). A probabilidade do resultado de um determinado teste estar ligado ao resultado de um outro teste foi calculada através da análise de razão de chances (*odds ratio*, O.R.). Todos os testes estatísticos foram realizados com um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4. Resultados

4.1. Caracterização da população em estudo

Um total de 1420 mulheres foram convidadas a participar neste estudo, tendo sido incluídas 1153 mulheres, com idades entre 25 e 79 anos, o que corresponde a uma idade média de 42,9 anos e mediana de 43 anos (Figura 16). Esta população foi depois dividida em cinco grupos etários: (I) <35 anos (23,6%), (II) 35–44 anos (31,7%), (III) 45–54 anos (31%), (IV) 55–64 anos (12%) e (V) >65 anos (1,7%).

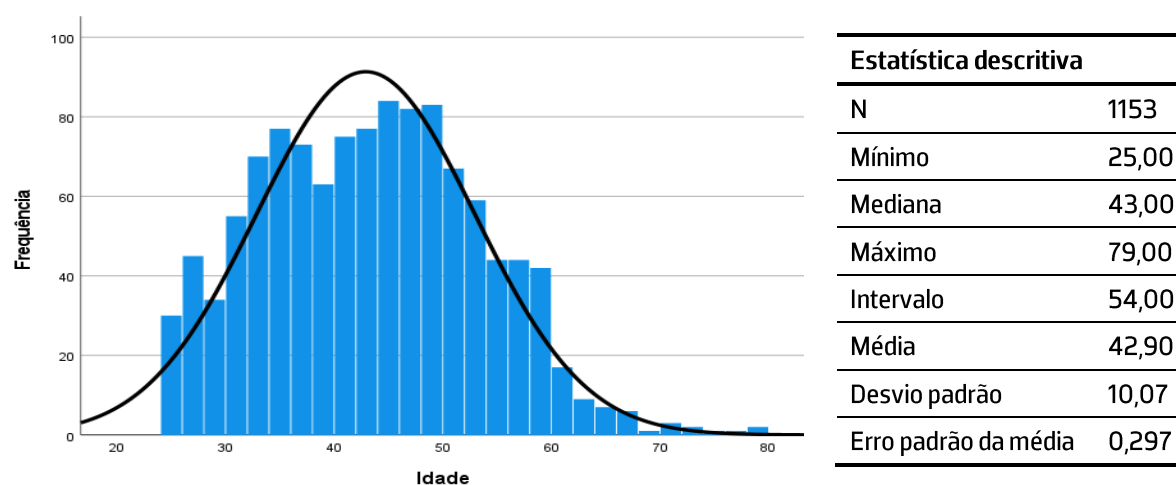


Figura 16: Histograma da distribuição etária e estatística descritiva da população estudada.

Estimativas do Instituto Nacional de Estatística (INE, 2016) apontam para uma população de 33 086 278 habitantes em Angola no ano de 2022, dos quais 51% são mulheres.⁷⁸ Destas, aproximadamente 64% têm menos de 25 anos, pelo que não fazem parte da população em estudo neste trabalho. Comparando a distribuição etária da população incluída neste estudo com a distribuição geral da população em Angola (Tabela 3) é possível verificar que existe uma ligeira sobre-representação das faixas etárias entre os 35 e 54 anos (62% das mulheres incluídas no trabalho contra 44% das mulheres habitantes em Angola) e uma sub-representação das mulheres com menos de 35 anos (24% contra 36% da população-alvo) e com mais de 65 anos (1,7% neste estudo contra 8% no total da população feminina em Angola).

Tabela 3: Estimativas de distribuição da população feminina em Angola e da amostragem incluída neste trabalho.

Distribuição etária das mulheres em Angola	População-alvo (excluindo <25A)	Distribuição etária neste estudo
<25A – ~64%		
25-35 – ~13%	<35A – ~36%	<35A – 23,6%
35-45 – ~9%	35-45 – ~25%	35-45 – 31,7%
45-55 – ~7%	45-55 – ~19%	45-55 – 31%
55-65 – ~5%	55-65 – ~14%	55-65 – 12%
>65A – ~3%	>65A – ~8%	>65A – 1,7%

4.2. Resultados da tipificação do vírus HPV

De entre as 1153 mulheres analisadas, 943 (81,8%) testaram negativo para qualquer um dos tipos de HPV analisados, enquanto 210 amostras (18,2%) testaram positivo para pelo menos um tipo de HPV de alto risco. Neste trabalho foram testados 14 tipos de HPV de alto risco diferentes: 12 tipos testados em conjunto (*cluster*), HPV16 e HPV18. Das 210 amostras positivas para hrHPV, mais de 80% (n=172) revelaram-se positivas para o *cluster*, 34 (16,2%) eram positivas para HPV16, e 25 (11,9%) testaram positivo para HPV18. De entre as amostras positivas, 190 eram positivas para apenas um dos grupos testados (*cluster* ou HPV16 ou HPV18), enquanto 20 amostras eram casos confirmados de coinfeção: nove amostras eram positivas para o *cluster* e HPV16 e dez testaram positivos para o *cluster* e HPV18. É ainda de realçar que uma amostra teve resultado positivo tanto para o *cluster* como para HPV16 e HPV18 (“triplo positivo”). (Tabela 4)

Fazendo uma análise por grupos etários, é possível verificar que 38,1% (n=80) das amostras positivas para hrHPV pertencem a mulheres com menos de 35 anos, 28,6% (n=60) em mulheres com entre 35 e 44 anos, 21,9% (n=46) na faixa etária entre 45 e 54 anos e apenas 11,4% (n=24) nas mulheres com mais de 55 anos. De forma similar, a taxa de positividade para hrHPV foi mais elevada na faixa etária mais jovem, com 29,4% das mulheres com menos de 35 anos a testarem positivo para pelo menos um dos tipos de HPV de alto risco em análise. Nos restantes grupos etários a taxa de positividade variou entre 12,9% (45-54 anos) e 16,4% (35-44 anos). A associação entre a idade da mulher e o resultado do teste hrHPV é suportada estatisticamente pelo teste qui-quadrado ($\chi^2 = 33,3$; $df = 4$; $p < 0,001$), o que sugere que a prevalência de infeção por HPV de alto risco varia significativamente entre as diferentes faixas etárias, sendo mais elevada em mulheres com idade inferior a 35 anos. (Tabela 4)

Tabela 4: Distribuição etária do número (n) e percentagem (%) de casos positivos em cada teste.

Grupo etário	HPV + n (%)	Genótipo hrHPV n (%)	PAP + n (%)	Resultado citológico n (%)	CINTEC+ n (%)		
<35 (n=272)	80 (29,4%)	Cluster	55 (20,2%)	67 (24,6%)	ASC-US	22 (8,1%)	26 (24,3%)
		HPV16	6 (2,2%)		LSIL	22 (8,1%)	
		HPV18	7 (2,6%)		ASC-H	3 (1,1%)	
		Cluster+HPV16	6 (2,2%)		HSIL	20 (7,3%)	
		Cluster+HPV18	6 (2,2%)				
35 - 44 (n=366)	60 (16,4%)	Cluster	43 (11,7%)	46 (12,6%)	ASC-US	15 (4,1%)	19 (26%)
		HPV16	8 (2,2%)		LSIL	12 (3,3%)	
		HPV18	3 (0,8%)		ASC-H	2 (0,6%)	
		Cluster+HPV16	2 (0,6%)		HSIL	17 (4,6%)	
		Cluster+HPV18	3 (0,8%)				
45 - 54 (n=357)	46 (12,9%)	Cluster	34 (9,5%)	51 (14,3%)	ASC-US	18 (5%)	18 (26,5%)
		HPV16	7 (2%)		LSIL	13 (3,6%)	
		HPV18	4 (1,1%)		ASC-H	3 (0,8%)	
		Cluster+HPV18	1 (0,3%)		HSIL	16 (4,5%)	
					AGC	1 (0,3%)	
55 - 64 (n=139)	21 (15,1%)	Cluster	18 (13%)	23 (16,5%)	ASC-US	7 (5%)	6 (18,75%)
		HPV16	2 (1,4%)		LSIL	2 (1,4%)	
		Cluster+HPV16	1 (0,7%)		ASC-H	2 (1,4%)	
≥65 (n=19)	3 (15,8%)	Cluster	2 (10,5%)	4 (21%)	ASC-US	3 (15,8%)	2 (25%)
		HPV16	1 (5,3%)		HSIL	1 (5,3%)	
Total (n=1153)	210 (18,2%)	Cluster	152 (13,2%)	191 (16,6%)	ASC-US	65 (5,6%)	71 (24,8%)
		HPV16	24 (2,1%)		LSIL	49 (4,3%)	
		HPV18	14 (1,2%)		ASC-H	10 (0,9%)	
		Cluster+HPV16	9 (0,8%)		HSIL	66 (5,7%)	
		Cluster+HPV18	10 (0,8%)		AGC	1 (0,1%)	
		Triplo +	1 (0,1%)				

Em termos de prevalência dos diferentes tipos de HPV, esta variou para os tipos testados em *cluster* entre aproximadamente 10% no grupo dos 45-54 anos e mais de 20% na faixa etária mais jovem (<35 anos). Relativamente ao HPV16, este apresentou uma prevalência global de cerca de 3%, sendo mais prevalente na faixa etária mais jovem (detetado em 4,4% das mulheres com menos de 35 anos). Quanto ao HPV18 é de destacar a ausência de deteção deste tipo de HPV em mulheres com idade igual ou superior a 55 anos. Nos restantes grupos etários, a sua prevalência variou entre os 1,4% em mulheres entre 45 e 54 anos e os 4,8% em mulheres com idade inferior a 35 anos. Estes dados revelam uma associação estatisticamente significativa entre a infeção por HPV e a idade da paciente ($\chi^2 = 47,2$; $df = 24$; $p = 0,003$) independentemente do tipo de HPV detetado, com todos os conjuntos analisados a apresentarem uma contagem de

casos superior ao esperado (à exceção do triplo positivo) no grupo de mulheres com menos de 35 anos. (Tabela 5)

Tabela 5- Associação entre o grupo etário da mulher e o resultado da genotipagem de HPV.

Grupo etário		Negativo	Cluster	Cluster +HPV16	Cluster+ HPV16+HPV18	Cluster +HPV18	HPV16	HPV18	Total
<35	Contagem	221	61	6	0	7	9	7	311
	Contagem Esperada	254,4	41,0	2,4	0,3	2,7	6,5	3,8	311
	Resíduos padronizados	-2,1	3,1	2,3	-0,5	2,6	1,0	1,7	
	Resíduos ajustados	-5,7	3,9	2,7	-0,6	3,1	1,2	2,0	
	Contagem	318	40	2	1	2	6	3	372
35-44	Contagem Esperada	304,2	49,0	2,9	0,3	3,2	7,7	4,5	372
	Resíduos padronizados	0,8	-1,3	-0,5	1,2	-0,7	-0,6	-0,7	
	Resíduos ajustados	2,2	-1,7	-0,6	1,4	-0,8	-0,8	-0,9	
	Contagem	290	33	0	0	1	7	4	335
	Contagem Esperada	274,0	44,2	2,6	0,3	2,9	7,0	4,1	335
45-54	Resíduos padronizados	1,0	-1,7	-1,6	-0,5	-1,1	0	0	
	Resíduos ajustados	2,7	-2,1	-1,9	-0,6	-1,3	0	0	
	Contagem	100	16	1	0	0	2	0	119
	Contagem Esperada	97,3	15,7	0,9	0,1	1,0	2,5	1,4	119
	Resíduos padronizados	0,3	0,1	0,1	-0,3	-1,0	-0,3	-1,2	
55-64	Resíduos ajustados	0,7	0,1	0,1	-0,3	-1,1	-0,3	-1,3	
	Contagem	14	2	0	0	0	0	0	16
	Contagem Esperada	13,1	2,1	0,1	0,0	0,1	0,3	0,2	16,0
	Resíduos padronizados	0,3	-0,1	-0,4	-0,1	-0,4	-0,6	-0,4	
	Resíduos ajustados	0,6	-0,1	-0,4	-0,1	-0,4	-0,6	-0,4	
≥65	Contagem	943	152	9	1	10	24	14	1153
	Contagem Esperada								
	Resíduos padronizados								
	Resíduos ajustados								
	Total								

4.3. Resultados do diagnóstico citológico

Após análise microscópica das preparações obtidas para diagnóstico citológico verificou-se que 472 (40,9%) amostras foram classificadas como Insatisfatórias para avaliação, 490 (42,5%)

foram classificadas como Negativas para Lesão Intraepitelial ou Neoplasia Maligna (NILM) e as restantes 191 (16,6%) foram classificadas como citologias positivas, isto é possuíam alterações compatíveis com diagnóstico de ASC-US ou lesão de grau superior. Destas, 65 amostras foram classificadas como ASC-US, 49 como LSIL, 10 amostras classificadas como ASC-H, 66 mulheres com HSIL e um caso de AGC. (Tabela 4)

As amostras contendo atipias de significado indeterminado apresentaram uma prevalência transversal a quase todas as faixas etárias à volta dos 5%, com uma incidência superior nas mulheres com idade inferior a 35 anos (8,1%) e nas mulheres com mais de 65 anos (15,8%), no entanto neste último grupo o número de casos detetados foi bastante reduzido (apenas 4 ≥ASC-US no total). Os casos de LSIL apresentaram uma prevalência superior nas mulheres mais jovens (8,1% no grupo com menos de 35 anos), apresentando depois uma tendência decrescente com a idade e não tendo sido detetado nenhum caso em mulheres com mais de 65 anos. Os casos de ASC-H foram reportados em menos de 1% das amostras analisadas, sendo a sua prevalência superior na faixa etária 55-64 anos (1,4%) e inexistente acima dos 65 anos. As lesões HSIL apresentaram uma prevalência global de 5,7%, com uma maior percentagem de casos positivos nos grupos etárias <35 anos e 55-64 anos (7,3 e 8,6%, respetivamente).

Tabela 6- Associação entre o grupo etário da mulher e o resultado do exame citológico.

		Insatisfatório	NILM	ASCUS	LSIL	ASC-H	HSIL	AGC	Total
<35	Contagem	121	114	24	25	3	24	0	311
	Contagem Esperada	127,3	132,2	17,5	13,2	2,7	17,8	0,3	311
	Resíduos padronizados	-0,6	-1,6	1,5	3,2	0,2	1,5	-0,5	
	Resíduos ajustados	-0,9	-2,4	1,9	3,9	0,2	1,8	-0,6	
35-44	Contagem	173	158	14	10	2	15	0	372
	Contagem Esperada	152,3	158,1	21,0	15,8	3,2	21,3	0,3	372
	Resíduos padronizados	1,7	0,0	-1,5	-1,5	-0,7	-1,4	-0,6	
	Resíduos ajustados	2,7	0,0	-1,9	-1,8	-0,8	-1,7	-0,7	
45-54	Contagem	141	143	20	12	3	15	1	335
	Contagem Esperada	137,1	142,4	18,9	14,2	2,9	19,2	0,3	335
	Resíduos padronizados	0,3	0,1	0,3	-0,6	0,1	-1,0	1,3	
	Resíduos ajustados	0,5	0,1	0,3	-0,7	0,1	-1,2	1,6	
55-64	Contagem	36	64	4	2	2	11	0	119
	Contagem Esperada	48,7	50,6	6,7	5,1	1,0	6,8	0,1	119
	Resíduos padronizados	-1,8	1,9	-1,0	-1,4	1,0	1,6	-0,3	
	Resíduos ajustados	-2,5	2,6	-1,1	-1,5	1,0	1,7	-0,3	
≥65	Contagem	1	11	3	0	0	1	0	16
	Contagem Esperada	6,5	6,8	0,9	0,7	0,1	0,9	0,0	16
	Resíduos padronizados	-2,2	1,6	2,2	-0,8	-0,4	0,1	-0,1	
	Resíduos ajustados	-2,8	2,1	2,3	-0,8	-0,4	0,1	-0,1	
Total		472	490	65	49	10	66	1	1153

O único caso de AGC reportado foi detetado numa mulher com 47 anos. Estes dados sustentam uma associação entre a idade e o resultado do exame citológico, com uma maior prevalência de citologias positivas em mulheres mais jovens ($\chi^2 = 39,5$; $df = 8$; $p < 0,001$). Todas as classes apresentam uma contagem de casos superior ao esperado no grupo etário com menos de 35 anos. De salientar também um aumento no número de casos observados de HSIL na faixa etária 55-64 anos. (Tabela 6)

4.4. Resultados da avaliação por CINtec® PLUS

A evidência aponta para a utilidade da utilização da DS com p16/Ki-67 para a triagem dos casos positivos para hrHPV com maior risco de progressão para lesão de alto grau, assim foi aplicada a metodologia CINtec® PLUS em todos os casos que testaram positivo no teste cobas® HPV.⁷¹ Além disso, foram incluídos todos os casos cuja citologia resultou num diagnóstico >ASC-US, mesmo que o teste para deteção de hrHPV tenha tido um resultado negativo (n=75). Desta forma, foi realizada a DS num total de 285 amostras, das quais 71 (24,9%) apresentaram marcação para ambos os marcadores imunocitoquímicos. No entanto, entre os casos incluídos com teste HPV negativo apenas dois apresentaram marcação positiva para p16/Ki-67. A percentagem de positividade manteve-se relativamente constante em todas as faixas etárias, com uma ligeira descida no grupo 55-64 anos (18,7%), o que significa que independentemente da idade da mulher, aproximadamente um quarto das amostras testadas apresentaram um resultado positivo para CINtec® PLUS ($\chi^2 = 6,9$; $df = 8$; $p > 0,05$).

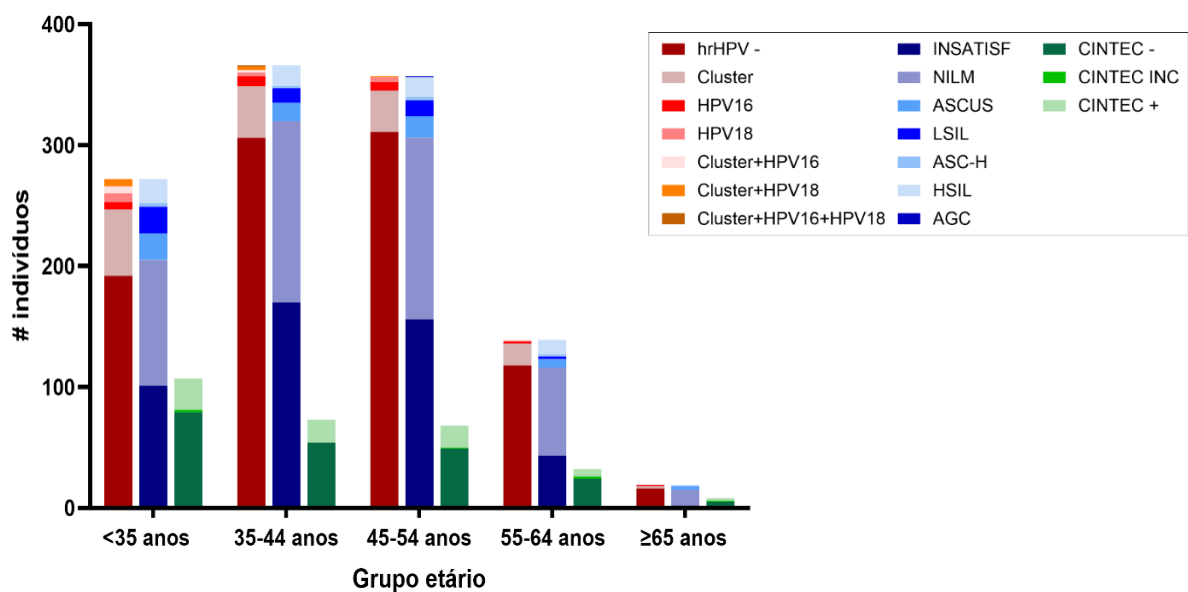


Figura 17: Distribuição do número de casos identificados para cada genótipo de hrHPV, classificação citológica e resultado de dupla marcação imunocitoquímica, de acordo com o grupo etário.

4.5. Correlação entre as diferentes metodologias

Analisando a globalidade dos resultados obtidos é possível verificar que das 1153 amostras analisadas neste estudo, 943 (81,8%) testaram negativo para qualquer um dos tipos de HPV analisados (Figura 18). Destas, apenas 8% tiveram um resultado citológico “positivo”, isto é, foram categorizadas como contendo alterações compatíveis com ASC-US ou superior. Por outro lado, das 210 amostras (18,2%) que testaram positivo para pelo menos um tipo de HPV de alto risco, mais de metade (116 amostras) tiveram um resultado citológico de ASC-US ou lesão de grau superior. Relativamente aos resultados obtidos pela técnica imunocitoquímica CINtec® PLUS esta apresentou uma positividade de apenas 4% nas amostras HPV negativas, sendo que ambas tiveram resultado citológico >ASC-US, i.e. trataram-se de dois casos identificados como HSIL no teste de Papanicolaou.

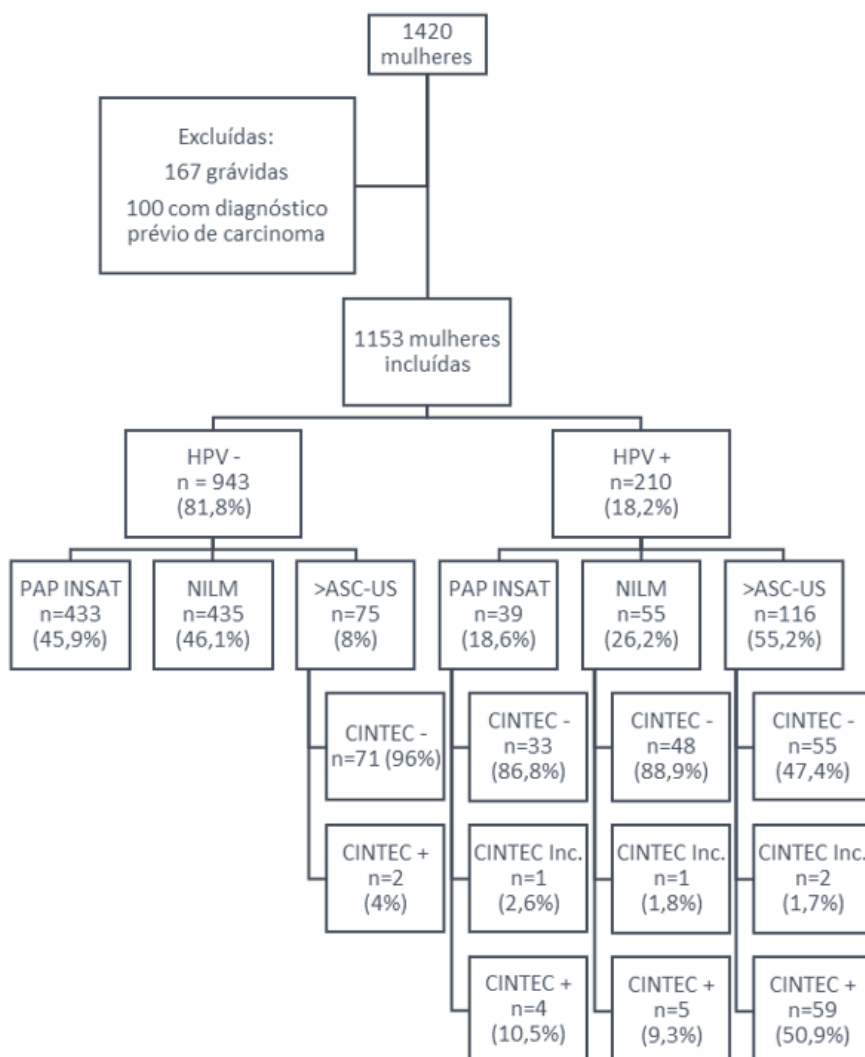


Figura 18: Fluxograma que ilustra a distribuição da população analisada. As mulheres são divididas com base no estado de HPV. Dentro de cada grupo, são apresentados os resultados da citologia (Insatisfatório, NILM e >ASC-US), e a coloração dual p16/Ki-67 (CINtec®). Os resultados do CINtec® incluem negativo (CINtec-), positivo (CINtec+) e inconclusivo (CINtec Inc.).

De entre as amostras positivas para hrHPV, o teste CINTec® PLUS foi positivo em cerca de 10% das amostras com resultado citológico negativo ou insatisfatório, e em 50,9% das amostras cujo resultado PAP foi ASC-US ou superior. Estes resultados demonstram a existência de uma associação estatisticamente significativa entre o resultado do teste HPV e o resultado da citologia e da dupla marcação imunocitoquímica ($\chi^2 = 279,3$ e $28,5$, respectivamente; $df = 2$; $p < 0,001$). Quando se analisam os resultados por categoria de Bethesda, verifica-se que o número de casos classificados como AGC e ASC-US, mas principalmente como LSIL e HSIL, foi superior ao esperado no grupo de amostras HPV positivas. Os resultados demonstram que a probabilidade de serem detetadas alterações citológicas (>ASC-US) é cerca de 12 vezes superior nas amostras com teste hrHPV positivo (O.R.=12,23, I.C. 95%: 8,17-18,32, $p < 0,001$). Em concordância, verifica-se que todas as amostras diagnosticadas com LSIL (n=49) e 78,8% das amostras classificadas como HSIL (n=52) eram positivas para pelo menos um dos genótipos de hrHPV testados.

Tabela 7 – Associação entre o resultado do teste hrHPV e o resultado da Citologia.

		Insatisfatório	NILM	ASC-US	LSIL	ASC-H	HSIL	AGC	Total
hrHPV Negativo	Contagem	433	435	52	0	9	14	0	943
	Contagem Esperada	386,0	400,8	53,2	40,1	8,2	54,0	0,8	943
	Resíduos padronizados	2,4	1,7	-0,2	-6,3	0,3	-5,4	-0,9	
	Resíduos ajustados	7,3	5,3	-0,4	-15,2	0,7	-13,1	-2,1	
hrHPV Positivo	Contagem	39	55	13	49	1	52	1	210
	Contagem Esperada	86,0	89,2	11,8	8,9	1,8	12,0	0,2	210
	Resíduos padronizados	-5,1	-3,6	0,3	13,4	-6	11,5	1,9	
	Resíduos ajustados	-7,3	-5,3	0,4	15,2	-0,7	13,1	2,1	
Total		472	490	65	49	10	66	1	1153

Quando se analisa os resultados da genotipagem do vírus HPV verifica-se que apesar de haver uma tendência para que todas as classes genotípicas testadas apresentem associação com um resultado citológico positivo (entre 51 e 75% de casos com citologia >ASC-US entre os casos hrHPV+, excluindo o triplo positivo), esta evidência é ainda mais significativa nos casos positivos

para HPV16, dos quais 14 (58,3%) foram classificados como HSIL no teste PAP, sendo que todos eles também demonstraram positividade para a dupla marcação p16/Ki-67.

É de realçar também que do total de amostras analisadas, cerca de 41% (n=472) foram classificadas como insatisfatórias para diagnóstico por citologia, perfazendo aproximadamente 46% das amostras que testaram negativo para hrHPV (n=433) e 18% das amostras positivas para HPV de alto risco (n=39). Destas, quatro amostras apresentaram resultado positivo para a DS imunocitoquímica e uma apresentou um resultado inconclusivo.

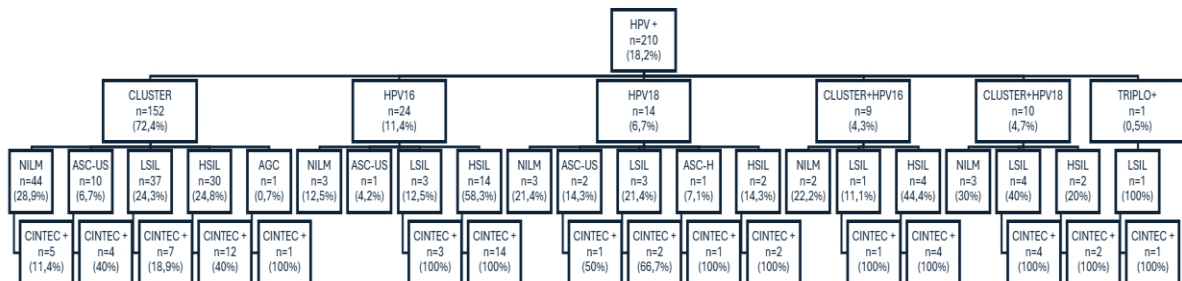


Figura 19: Fluxograma que ilustra a distribuição dos casos hrHPV+. Dentro de cada grupo, são apresentados os resultados da citologia (Insatisfatório, NILM e >ASC-US), e a coloração dual p16/Ki-67 (CINtec®). Os resultados do CINtec® incluem negativo (CINtec-), positivo (CINtec+) e inconclusivo (CINtec Inc.).

5. Discussão

O cancro do colo do útero é uma das principais causas de mortalidade por cancro em mulheres na África Subsaariana, são detetados anualmente 33,4 novos casos e 22,6 mortes por 100 000 mulheres.³ A falta de infraestrutura para o rastreio regular e vacinação contra o HPV contribui significativamente para este cenário. Em Angola, a inexistência de estudos de prevalência específicos sobre a doença na população angolana dificulta uma avaliação precisa da sua magnitude. Atualmente, apenas existem estimativas do IARC e registos de base hospitalar de taxas elevadas de cancro de colo uterino em estádios avançados o que representa um sério problema de saúde pública. Essa lacuna nas informações de saúde pública compromete a criação de estratégias eficazes de prevenção e controlo, limitando o alcance das intervenções necessárias para reduzir a mortalidade associada à doença.

Vários estudos têm sido realizados em todo o mundo para avaliar a mais-valia da citologia meio líquido perante a convencional e até mesmo da implementação de teste de HPV-DNA como teste primário de rastreio do cancro do colo do útero.^{59,65} Em África, existem alguns estudos de genotipagem de HPV com diferentes métodos, incluindo em países vizinhos com realidades semelhantes à angolana (Moçambique, Cabo Verde).⁷⁹⁻⁸⁴ Assim, perante a necessidade de conhecer a epidemiologia do vírus HPV presente na população angolana foi realizado este estudo, com o objetivo não só de perceber a prevalência do vírus na população angolana, mas também como estratégia de implementação do rastreio molecular como primeira linha de deteção dos subtipos de alto risco com perfil mais carcinogénico. Ao mesmo tempo, este representa o primeiro estudo alguma vez feito em África combinando os três métodos (PAP, deteção molecular de HPV e DS imunocitoquímica p16/Ki-67).

Em 2022, Angola tinha uma população estimada de 33 milhões de pessoas e uma taxa de crescimento populacional na ordem dos 3%. É composta por 51% de mulheres, das quais 36% têm mais de 25 anos. Neste estudo, foram incluídas 1153 mulheres, com idades compreendidas entre os 25 e os 79 anos, correspondendo a uma idade média de 42,9 anos. Foram apenas consideradas mulheres com mais de 25 anos, uma vez que o vírus tem uma progressão de aproximadamente 8-10 anos entre o momento da infeção e o surgimento de carcinoma e considerando que a população inicia a atividade sexual, em média, aos 15 anos.^{74,75} A caracterização demográfica da população estudada demonstra uma sobre representação da faixa etária dos 35 aos 55 anos (62.7%) comparativamente à distribuição demográfica da

população angolana, refletindo a dificuldade no recrutamento de mulheres em idades mais jovens ou mais avançadas para este tipo de programa.

Culturalmente, as mulheres só se dirigem às unidades públicas quando já existe doença ou sintomatologia, não havendo um espírito preventivo e/ou de diagnóstico precoce. A falta de conhecimento relativamente ao HPV, subestimando o risco de CCU e desvalorizando a importância da prevenção é também um motivo que leva muitas mulheres a não aderirem ao rastreio. Além disso, a dificuldade de se ausentarem do emprego, a proibição por parte do marido ou companheiro, a desvalorização da necessidade do exame bem como desconhecimento sobre o próprio teste, o preconceito e tabu associado à colheita, o receio do rastreio ser doloroso devido a más experiências anteriores, a falta de sintomatologia ou até mesmo o medo do resultado também contribuem significativamente para a falta de adesão. É necessário a aplicação de programas de educação para a saúde mais eficazes quer a nível mundial quer local de forma a incrementar a sensibilização e o conhecimento acerca deste problema de saúde.^{61,85,86}

Desta forma, foram realizadas no contexto deste trabalho diversas atividades comunitárias com o objetivo de aumentar a literacia em saúde e consequentemente a aumentar a adesão da população ao rastreio. Ainda assim, assistiu-se a uma dificuldade de obtenção de outros dados demográficos (escolaridade, estado civil, idade de primeira relação sexual, número de filhos) comprometendo uma melhor caracterização da população estudada.

Em todas as regiões do mundo, a prevalência do HPV é mais alta em mulheres com menos de 35 anos de idade, declinando para um platô na meia-idade e apresentando nova subida a partir dos 55 anos. Em África, esta subida a partir dos 45 anos é particularmente evidente. A prevalência mundial de infeção pelo HPV em mulheres sem anormalidades cervicais é de 11-12%, com taxas mais altas na África Subsaariana (24%), Europa Oriental (21%) e América Latina (16%).⁸⁷ Os cinco tipos de HPV mais comuns em mulheres HPV-positivas em todo o mundo são HPV16, HPV18, HPV31, HPV58 e HPV52, representando 50% de todas as infeções por HPV, com as infeções por HPV16 e HPV18 a corresponderem a cerca de 70% dos casos de CCU.⁸⁸

De acordo com os resultados da tipificação do HPV realizada neste estudo, obteve-se 943 (81,8%) amostras negativas para hrHPV e 210 (18,2%) amostras positivas para hrHPV, das quais 58 (5,0%) eram positivas para HPV16/18 e 172 (14,9%) positivas para o *cluster* (outros 12 hrHPV). A distribuição etária dos casos HPV positivos seguiu a distribuição etária esperada, sendo a positividade mais elevada nas mulheres com menos de 35 anos (24,6%), apresentando depois

uma descida na faixa etária seguinte (12,6%) e voltando a subir gradualmente até atingir os 21% em mulheres com mais de 65 anos.

Os estudos realizados em África apresentam uma grande heterogeneidade de resultados, seja devido à utilização de diferentes métodos de diagnóstico ou devido à condição de saúde das mulheres envolvidas nos diferentes estudos. No entanto, os dados parecem apontar para que a África Subsaariana seja a região do globo com uma maior prevalência de infecções por HPV. Na África Central, região na qual se enquadra Angola, vários esforços têm sido feitos recentemente para caracterizar a prevalência do vírus HPV nas respetivas populações com as taxas de infeção por hrHPV a variarem entre os 15,4% observados numa amostra analisada no Chade e os 47% observados num estudo realizado no Gabão.⁸⁹⁻⁹⁵ Tal como referido, neste trabalho observou-se uma prevalência de hrHPV de 18,2% na população angolana analisada, valor que se encontra abaixo da média observada para a generalidade dos países africanos e também na parte inferior da distribuição de prevalências nos países centro-africanos.

Comparando com os países de língua oficial portuguesa (PALOP), que partilham uma ligação histórica e cultural com Angola, num estudo realizado em Cabo Verde a infeção por HPV de alto risco foi encontrada em 505 mulheres (25,1% das amostras analisadas), tendo sido ainda detetada apenas infeção por HPV de baixo risco em cinco casos.⁷⁹ Neste estudo, a genotipagem de HPV apenas foi realizada numa pequena porção das amostras (92, 4,6%). Destas, 33 eram positivas para hrHPV (11 positivos para HPV16 ou 18 e 22 positivos para outros subtipos). A maioria das amostras (1912) foi analisada com o teste Aptima®, que apenas deteta HPV16 e HPV18/45. Destas, 117 (24,8 %) pacientes tinham infeção por HPV16, HPV18 ou HPV45, e em 355 (75,2%) pacientes foram detetados outros subtipos de alto risco. Em Moçambique, dois estudos diferentes avaliaram a prevalência de HPV em populações jovens. Omar e colaboradores⁸⁰ analisaram uma população (feminina e masculina) de Maputo com idades compreendidas entre 18 e 24 anos. Neste estudo, DNA viral foi detetado em 168 de 412 pacientes (40,8%; IC 95% 36,0 a 45,5), sendo esta prevalência significativamente maior em mulheres do que em homens (63,6% vs 10,2%). O HPV52 foi o tipo mais frequente encontrado em mulheres, seguido pelo HPV35, 16, 53, 58, 6 e 51. Nos homens, o HPV51 foi o mais bem classificado, seguido pelo HPV6, 11, 52, 59 e 70.⁸⁰ Um outro estudo analisou amostras de auto-colheita de 504 mulheres entre os 18 e 30 anos de cinco instituições do ensino superior em Maputo. A prevalência de qualquer genótipo de HPV detetada neste estudo foi de 28,6% (144/504). Infeções únicas e múltiplas por HPV foram detetadas em 76 (15,1%) e 68 (13,5%) participantes, respetivamente. O

HPV16 foi o genótipo mais frequente, seguido pelo HPV58, HPV66, HPV52, HPV18, HPV56, HPV61 e HPV70. Um dado relevante foi que a prevalência dos genótipos cobertos pela vacina bivalente, quadrivalente e nonavalente foi de 14,3%, 15,9% e 23,4%, respetivamente.⁹⁶

Estudos no Sul de África mostraram que os genótipos hrHPV que causam principalmente cancro do colo do útero variam de país para país. Por exemplo, na África do Sul HPV16 e 52, na Tanzânia e no Zimbábue⁹⁷ HPV16 e 35, e HPV53 e 68 em Madagáscar⁹⁸ foram os genótipos mais comuns entre mulheres. Da mesma forma, estudos em países do leste de África mostraram que não há distribuição uniforme de genótipos hrHPV. No Uganda, HPV52 e 58;⁹⁹ na Tanzânia, HPV52 e 16;¹⁰⁰ no Quênia, HPV58 e 16;¹⁰¹ e na Etiópia, os genótipos HPV16 e 52¹⁰² foram identificados como as principais causas da infeção por hrHPV. A distribuição dos genótipos hrHPV nos países da África Ocidental tem um padrão diferente dos países da África Austral e Oriental. No Senegal, os genótipos HPV52 e 31¹⁰³, no Burkina Faso os genótipos HPV52 e 59¹⁰⁴ e na Nigéria os genótipos HPV35 e 16 foram identificados como as principais causas da doença.¹⁰⁵ Em países geograficamente próximos de Angola, verificou-se uma maior prevalência de HPV68, 58 e 52 na República Democrática do Congo,⁹¹ enquanto no Gabão os genótipos mais detetados foram o HPV16 e 33.⁸⁹ Num estudo realizado na Zâmbia, os genótipos HPV16 e 18 foram os mais prevalentes, correspondendo a mais de 40% das amostras analisadas.⁸³

Numa recente meta-análise que compilou os dados obtidos em 28 estudos realizados em países da África Subsaariana classificou por ordem de prevalência os genótipos observados da seguinte forma: HPV16 (18%), HPV35 (10,12%), HPV52 (9,98%), HPV18 (9,7%), HPV45 (6,82%), HPV51 (6,60%), HPV58 (6,40%), HPV56 (6,20%), HPV33 (6,10%), HPV31 (5,90%), HPV39 (4,20%), HPV68 (3,96%), HPV59 (3,41%), HPV66 (2,20%), HPV62 (0,30%) e HPV61 (0,10%). É de realçar que muitos destes genótipos com elevada prevalência em África não estão incluídos nas vacinas atualmente disponíveis. Esta situação é particularmente relevante nos países da África Subsaariana, onde o acesso às vacinas bivalentes e quadrivalentes é relativamente fácil, mas devido aos recursos limitados ou falta de estudos sobre o uso das vacinas nonavalentes nos países menos desenvolvidos, a aplicação destas tem sido escassa.¹⁰⁶

Em Portugal, país que apesar de geograficamente e culturalmente distante, compartilha um vínculo histórico e uma relação de proximidade com Angola, foi reportada uma prevalência de 12,5% de hrHPV. Segundo os resultados do programa regional de rastreio cervical do Norte, envolvendo 462 401 mulheres, os cinco genótipos de HPV de alto risco mais comuns foram HPV68 (16,09%), HPV31 (15,30%), HPV51 (12,96%), HPV16 (11,06%) e HPV39 (11,01%).¹¹²

De forma semelhante, neste trabalho verificou-se uma elevada positividade para os genótipos incluídos no *cluster* (aproximadamente 80% das amostras positivas para HPV, correspondendo a uma prevalência global de 14%), com apenas 3% de prevalência do genótipo HPV16 (16% de todos os testes HPV positivos) e cerca de 2% de HPV18 (11,9% das amostras HPV+). Estes resultados parecem indicar que os genótipos mais prevalentes na população angolana não serão o HPV16 e 18 o que poderá ter implicações na escolha das vacinas para a implementação de um programa de vacinação adequado em Angola. Seria importante no futuro haver uma melhor caracterização da distribuição genotípica do vírus HPV em Angola, de forma a ter um conhecimento mais completo sobre os tipos em circulação e ajudar na tomada de decisão por parte das autoridades de saúde angolanas.

A introdução da citologia cervicovaginal para deteção de cancro ou lesões pré-cancerosas em amostras recolhidas de células do colo do útero contribuiu decisivamente para a redução do número de casos e mortes por cancro cervical, sobretudo nos países desenvolvidos. Só nos Estados Unidos da América, o número de mortes reduziu cerca de 75% desde a sua introdução.¹⁰⁷ Além disso, mais de 50% dos cancros do colo do útero são observados em mulheres sem exames de Papanicolau nos cinco anos anteriores ou mesmo sem qualquer teste feito.¹⁰⁸ Sendo este um teste relativamente económico, de fácil aplicação, e com uma boa aceitação por parte das pacientes, o seu uso generalizou-se como estratégia primária de prevenção do cancro do colo do útero. No entanto, na maioria das populações da África Subsaariana a sua implementação é limitada e os exames de citologia acabam muitas vezes por ser utilizados para diagnóstico em vez de rastreio.⁸¹

Um dos motivos de preocupação na análise de amostras de citologia cervical são os casos classificados como “Insatisfatórios para avaliação”. Aqui incluem-se, por exemplo, amostras com baixa celularidade, preparação inadequada ou obscurecidas por elementos inflamatórios ou sangue.⁷⁷ Os resultados insatisfatórios são responsáveis por uma série de falhas no rastreio e são uma fonte de angústia para as mulheres e um desperdício de recursos.¹⁰⁹ Embora as taxas de insatisfatórios sejam geralmente baixas (0,2%-10%), estes casos encontram-se associados a um risco aumentado de lesões epiteliais no seguimento subsequente.¹¹⁰⁻¹¹²

As principais causas de diagnósticos insatisfatórios são a escassez de elementos epiteliais, seguida do obscurecimento de detalhes do esfregaço por sangue/células inflamatórias/muco e artefactos de secagem ao ar. Com a introdução da citologia de base líquida no final da década de 1990, a preponderância deste tipo de situações reduziu consideravelmente.¹¹²⁻¹¹⁵ Faixas etárias

mais velhas e erosão cervical são também preditores de Papanicolaous insatisfatórios, pelo que nestes casos os critérios de adequação devem ser ajustados.⁷⁷

Como foi realçado nos resultados, cerca de 41% (n=472) das amostras analisadas foram classificadas como insatisfatórias para diagnóstico por PAP, perfazendo aproximadamente 46% das amostras que testaram negativo para hrHPV (n=433) e 18% das amostras positivas para HPV de alto risco (n=39). Destas, quatro amostras apresentaram resultado positivo para a dupla marcação imunocitoquímica e uma apresentou um resultado inconclusivo. Aqui foram incluídas todas as amostras classificadas como “insatisfatórias” devido à ausência de células representativas da zona de transformação (metaplásicas e/ou endocervicais). Num grande estudo realizado nos Países Baixos, que comparou os resultados de mais de 85 mil mulheres, verificou uma taxa de ausência de células endocervicais na ordem dos 15% em citologia de meio líquido e ligeiramente inferior (12%) em citologia convencional.¹¹³ No entanto, apesar da importância de uma boa representatividade da amostra recolhida, os dados compilados ao longo de décadas, apesar de contraditórios, parecem indicar que as mulheres cujo teste não apresentava células da zona de transformação não apresentam um maior risco de desenvolver alterações malignas nos anos seguintes.¹¹⁶ A maior positividade muitas vezes associada à presença de células endocervicais pode ser explicada por uma maior acessibilidade e/ou descamação destas células em colos do útero com alterações.¹¹⁷

A elevada taxa de insatisfatórios por falta de representação das células endocervicais da zona de transformação aqui obtida sugere a existência de uma má prática de colheita, o que resulta em colheitas pouco esfoliativas. Esta incidência poderia ser reduzida por meio da educação e retreinamento de profissionais de saúde e médicos.¹¹⁸

De acordo com o *The Bethesda system for reporting cervical cytology*, dados de referência obtidos pelo *College of American Pathologists (CAP)* mostra que a taxa mediana de LSIL varia entre 2,5 e 2,9% e de HSIL era de 0,5%.⁷⁷ Além disso, as Estimativas de Risco que apoiam as diretrizes de consenso da Sociedade Americana de Colposcopia e Patologia Cervical (ASCCP) de 2019 relatam que 1,7% dos exames de citologia era LSIL e 0,3% HSIL.^{119,120}

Os dados obtidos neste trabalho apontam para uma taxa de lesões precursoras de carcinoma cervical ligeiramente superiores: 4,2% de LSIL e 5,7% de HSIL. No total, a percentagem de citologias com alterações (>ASC-US) foi de 16,6%. Este valor é semelhante ao obtido num estudo realizado na população de Cabo Verde (16,9%), embora em Cabo Verde as taxas encontradas de LSIL e HSIL tenham sido consideravelmente inferiores (2,7% e 0,5%, respetivamente). Num

grande estudo, conduzido na província de Limpopo, África do Sul, foi reportado que, em 84.466 mulheres rastreadas, 19,6% tiveram um resultado de citologia cervical anormal.¹²¹ Outro estudo recente, numa coorte menor de 480 mulheres do Quênia, encontrou uma prevalência de 37% de lesões cervicais na citologia,¹⁰⁵ percentagens superiores aquela aqui reportada. Como tal, embora existam limitações que impedem uma comparação direta, uma vez que os nossos dados não foram colhidos no âmbito de uma iniciativa de triagem nacional, mas sim de consultas ginecológicas ocasionais apenas numa unidade de saúde (Maternidade Lucrecia Paim), as percentagens que encontramos em Angola estão de acordo com esses relatórios.

Uma revisão sistemática e meta-análise, determinou as taxas gerais de prevalência de HPV em mulheres africanas com citologia cervical normal (29,3%), ASC-US (46,5%), LSIL (74,2%) e HSIL (84,8%).¹²² Os resultados do estudo recentemente publicado de Cabo Verde seguem a mesma tendência (ASC-US – 40,4% de prevalência de HPV; LSIL – 78,1% de carga de HPV; e HSIL – 100%, embora com uma percentagem de casos positivos ligeiramente menor em mulheres com citologia normal – 10,3%). Neste estudo, a correlação entre o exame molecular (HPV) positivo e a PAP em Angola foi de: 55 (11,2%) casos classificados como NILM, 13 (20%) ASC-US, 49 (100%) LSIL, 9 (10%) dos casos ASC-H, 14 (78,8%) das mulheres com HSIL e 39 (8,3%) dos resultados considerados insatisfatórios. O único caso aqui reportado de atipia glandular, também apresentou teste de HPV positivo. Estes valores são de uma maneira geral inferiores aos observados noutros estudos realizados em países africanos, à exceção dos casos de LSIL, todos eles positivos para hrHPV. A prevalência de HPV em mulheres com citologia normal é relativamente baixa comparando com a média dos valores observados em África,¹²² mas semelhante àquela observada em Cabo Verde.⁷⁹

Numa meta-análise de 423 estudos baseados em PCR de todo o mundo, que incluiu 14256 casos de todo o espectro de lesões cervicais em África, em que 37,8% eram HPV positivos, foi detetada uma prevalência de 22% em amostras normais, 35% em ASC-US, 61% em amostras LSIL e 76% nos casos de HSIL. O mesmo estudo calculou o potencial oncogénico de diferentes tipos e comparou a prevalência dos diferentes tipos de HPV em todo o espectro da doença. Verificou-se que, o HPV 35 foi bem representado em mulheres HPV-positivas com citologia normal (6,6%) e com lesões precursoras de cancro cervical de baixo grau (7,9%) ou alto grau (11,8%). No entanto, encontrava-se mal representado nas amostras provenientes de carcinomas invasivos (4,9%), sugerindo que seu potencial oncogénico é menor do que o do HPV16 ou 18, sendo este mais bem representado em casos de cancro invasivo (53,1% e 19,8%, respetivamente), comparativamente

com citologias normais ou com lesões precursoras (entre 13,1% e 30% para HPV16 e à volta de 8–9% para HPV18). Da mesma forma, os tipos 31, 33, 52 e 58, revelaram-se muito frequentes em mulheres com citologia normal, mas menos frequentes em carcinoma invasivo.¹²³ Neste trabalho, em linha com os dados publicados verificou-se um aumento da prevalência de HPV16 com o aumento da severidade da lesão (1% NILM, 10,2% LSIL; 27,3% HSIL). Já para HPV18 a prevalência foi superior em lesões de baixo grau (16,3%) do que nas lesões de alto grau (6%) e citologia normal (1,2%). No caso dos genótipos testados em *cluster*, estes foram os que apresentaram uma prevalência mais elevada quer nas citologias negativas (10%), quer naquelas em que foram detetadas lesões precursoras de cancro cervical (87,7% dos casos de LSIL e 54,5% dos casos de HSIL). Estas evidências reforçam uma vez mais a relevância que as infeções por subtipos de HPV não incluídos nas vacinas bivalentes parecem apresentar em Angola. Apesar da literatura apontar para um menor potencial oncogénico destes genótipos, a sua elevada prevalência representa uma contribuição significativa para o número de lesões precursoras detetadas e, eventualmente, para as elevadas taxas de cancro cervical observadas no país.

Um estudo realizado no contexto português mostra que o *CINtec® PLUS Cytology Kit* é um teste válido para o diagnóstico de lesões persistentes de HPV, com excelente sensibilidade e valores confiáveis de especificidade. Os grupos de pacientes relevantes para aplicação do kit estão de acordo com as recomendações do fabricante: mulheres com resultado ASC-US/LSIL e citologia NILM com teste HPV positivo, essencialmente com mais de 30 anos.¹²⁴

Neste estudo a correlação entre PAP e CINtec® PLUS (DS) para mulheres HPV positivas foi: NILM (n=55) – 5 (9,1%) DS positivas; ≥ASC-US (n=189) – numa primeira fase obtiveram-se 36 casos (19,0%) DS-positivos, número que após repetição de alguns casos de HSIL subiu para 61 (32,2%) DS-positivos.

Existem alguns aspetos que podem ajudar a explicar a percentagem de CINtec® PLUS negativas numa primeira fase. Um deles é o facto das lâminas utilizadas para a técnica CINtec® PLUS não terem sido as lâminas originais de interpretação de >ASC-US, pelo que aquando da realização de uma segunda preparação o conteúdo celular da amostra poderia ser inferior e não terem sido detetadas células positivas no ensaio imunocitoquímico. Numa segunda fase, e para casos discordantes (≥ASC-US e DS negativo), removeu-se a lamela das lâminas primordiais e realizou-se a coloração imunocitoquímica nessas mesmas lâminas. Assim obteve-se uma percentagem superior de DS+, apesar de ainda haver cerca de 60% de casos >ASC-US/DS negativos. Se focarmos apenas nos casos HPV+/>ASC-US, observa-se que essa percentagem baixa para

cerca de metade. Alguns destes casos poderão ser explicados pela perda de alguns grupos celulares, no procedimento de desmontagem da lamela e descoloração da lâmina o que pode ter afetado o resultado esperado.

Num estudo realizado na Turquia em mulheres de faixa etária entre 34 a 74 anos, revela que 34/52 (65,4%) casos foram positivos para HPV-DNA (5/18-ASC-US; 6/9-LSIL; 10/11-HSIL; 13/14-SCC). O teste CINTec® PLUS foi positivo em 41/52 (78,8%) casos (11/18-ASC-US; 6/9-LSIL; 11/11-HSIL; 13/14-SCC). Ao comparar a positividade do CINTec® PLUS (78,8%) com a positividade do HPV (65,4%), a positividade dupla foi vista em 3/18 casos de ASC-US, 6/9 casos de LSIL, 10/11 casos de HSIL e 12/14 casos de carcinoma pavimentoso. Um caso de HSIL e SCC foi negativo no teste de HPV e foi positivo no CINTec® PLUS.¹²⁵ Noutro estudo, no Canadá, em todas as idades (19-76 anos, $n= 598$), 44,3% testaram CINTec PLUS positivo vs. 55,4% HPV positivo ($p< 0,001$). Para detetar CIN2+ ($n= 99$), CINTec PLUS foi 81,8% sensível vs. 93,9% para teste de HPV ($p= 0,009$); a sensibilidade específica do genótipo 16/18 foi de 46,5%. A especificidade foi de 52,9% vs. 36,6%, respetivamente ($p< 0,001$). Em todas as idades, para detetar CIN3+ ($n= 44$), a sensibilidade foi de 93,2% para ambos os testes; a sensibilidade específica do genótipo 16/18 foi de 52,3%. A especificidade foi de 48,4% para CINTec PLUS vs. 31,1% para teste de HPV ($p< 0,001$). Em pacientes < 30 anos, o CINTec foi 91,7% sensível vs 95,8% para teste de HPV ($p = 0,549$).¹²⁶

Neste trabalho, verificou-se ainda que todos os casos $>LSIL$ e positivos para os genótipos de HPV16 e 18 foram também positivos para CINTec PLUS e apenas um caso de LSIL/HPV18+ se revelou negativo para DS. Reforçando o potencial oncogénico destes genótipos e a capacidade do teste CINTec® PLUS em detetar lesões com maior potencial de progressão. Em contraste verificou-se uma taxa menor de positividade para CINTec® PLUS naqueles casos identificados como positivos unicamente para o *cluster*. Apenas um estudo mais aprofundado, poderia ajudar a compreender quais dos genótipos incluídos neste grupo estariam associados a uma maior positividade para estes biomarcadores.

Há ainda a destacar dois casos de HSIL/DS+, que testaram negativo para HPV, podendo estar aqui perante uma falha no teste molecular. Adicionalmente, quatro exames classificados como insatisfatórios na citologia, revelaram-se positivos para CINTec® PLUS e *cluster* HPV demonstrando a complementaridade entre técnicas de forma a dar o melhor diagnóstico e encaminhamento às pacientes.

Assim, com base na citologia PAP \geq ASC-US e HPV +, seriam encaminhadas 136 pacientes para colposcopia, enquanto por DS+ teria implicado apenas 68 colposcopias, ou seja, uma redução de 50%. Esta redução teria um impacto significativo na procura por colposcopias, uma clara mais-valia no contexto angolano, onde existem poucos locais habilitados para realizar este tipo de procedimento.

Inicialmente CINtec® PLUS recebeu aprovação como teste para ajudar a identificar pacientes positivos para HPV que correm maior risco de desenvolver lesões pré-malignas e malignas. Recentemente a OMS e a ASCCP atualizaram as recomendações da prevenção do cancro cervical para incluir o CINtec® PLUS para triagem de indivíduos HPV-positivos. Pacientes com DS+ são encaminhados para colposcopia, enquanto aqueles com um teste negativo podem ser submetidos a um novo teste posteriormente para determinar se a infeção e o risco de lesões pré-malignas ou malignas persiste, reduzindo o número de colposcopias desnecessárias.^{127,128}

Este estudo teria ganho maior robustez e abrangência caso tivesse sido possível integrar os resultados das pacientes encaminhadas para colposcopia, complementando os achados com a avaliação histológica e a marcação de p16 nos casos diagnosticados com lesões intraepiteliais escamosas de alto grau (HSIL) ao exame histológico. A inclusão desses dados permitiria uma correlação mais direta entre os achados citológicos, moleculares e histopatológicos, fortalecendo as conclusões sobre a eficácia do rastreio molecular e o seu impacto na deteção precoce e seguimento de lesões pré-cancerígenas.

Por fim apresenta-se uma possível estratégia de rastreio com o teste de HPV, na qual se introduzem os testes com marcadores moleculares de forma a minimizar o número de colposcopias efetuadas em mulheres HPV positivas com citologia reflexa anormal. A inclusão dos biomarcadores neste ponto da triagem justifica-se se estes testes forem economicamente acessíveis e a sua taxa de resultados negativos em mulheres com lesões ASC-US e LSIL for significativa, a ponto de reduzir o custo global no acompanhamento das doentes, comparativamente a realizar colposcopia em todos os resultados alterados na citologia reflexa.⁶¹

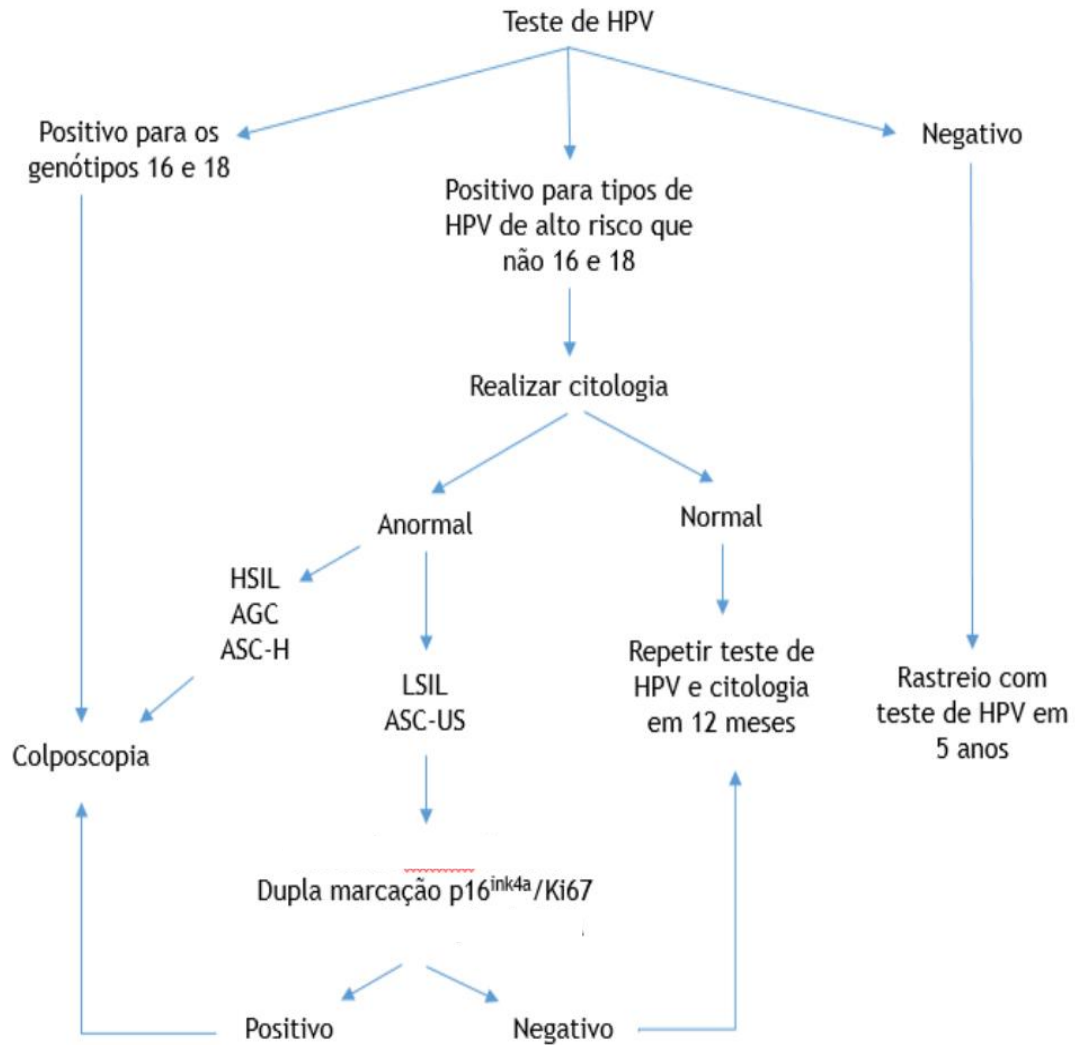


Figura 20: Exemplo de possível algoritmo futuro, adaptado do algoritmo atualmente implementado, com inclusão dos testes com marcadores moleculares.

6. Conclusão

O cancro do colo do útero tornou-se rapidamente um dos principais problemas de saúde pública em África, exigindo intervenções urgentes para a sua prevenção e controlo. Neste sentido, este estudo teve como grande objetivo gerar um conjunto de evidências sobre a prevalência da infeção por HPV de alto risco (hrHPV) em Angola e avaliar o impacto da implementação de métodos moleculares no rastreio primário do cancro cervical. Ao realizar a triagem dos casos hrHPV+ com a dupla marcação imunocitoquímica p16/Ki-67, em vez da citologia de Papanicolaou, pretende-se reduzir o número de referências desnecessárias para colposcopia. Este é o primeiro estudo a caracterizar a prevalência do HPV e das lesões cervicais em Angola e, até onde sabemos, o primeiro em África a usar três metodologias distintas com resultados significativos. Os dados confirmam a importância de implementar programas de rastreio eficientes e baseados em tecnologias moleculares em países de baixo rendimento como Angola. A elevada prevalência de HPV de alto risco (18,2%) e a proporção significativa de lesões de alto grau (55%) entre as mulheres HPV-positivas sublinham a necessidade urgente de estratégias de rastreio mais eficazes que a citologia convencional. A introdução do teste de HPV como método primário, complementado pela dupla marcação citológica p16/Ki-67, demonstrou ser uma ferramenta eficaz para identificar mulheres com maior risco de desenvolver lesões pré-cancerígenas, melhorando a precisão na referência para colposcopia.

Além disso, a elevada taxa de resultados citológicos insatisfatórios (40,7%) reflete as limitações da citologia convencional, reforçando a necessidade de métodos complementares como o CINtec® Plus. Esta estratégia reduziria as referências desnecessárias para colposcopia e permitiria otimizar o seguimento de pacientes com lesões de alto risco, particularmente em cenários de recursos limitados como Angola.

Nos últimos anos, a luta contra o cancro beneficiou da introdução de novas tecnologias, permitindo a prevenção de muitos casos por meio de rastreio. A OMS já estabeleceu uma estratégia regional para o controlo do cancro em África, mas a viabilidade económica dessas intervenções nos sistemas de saúde de Angola deve ser avaliada. Este estudo procura acelerar ações de saúde pública e apoiar a implementação de programas de rastreio nacionais, com enfoque em decisores políticos, profissionais de saúde e organizações internacionais como a ONU, PEPFAR, o Fundo Global e a Unitaid.

7. Bibliografía

1. Arbyn M, Weiderpass E, Bruni L, de Sanjosé S, Saraiya M, Ferlay J, *et al.* Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis. *Lancet Glob Health.* 2020 Feb 1;8(2):e191–203.
2. Sauvageau C, Duval B, Gilca V, Lavoie F, Ouakki M. Human Papilloma Virus vaccine and cervical cancer screening acceptability among adults in Quebec, Canada. *BMC Public Health.* 2007 Dec 25;7(1):304.
3. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2024 May 4;74(3):229–63.
4. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021 May 4;71(3):209–49.
5. Stelzle D, Tanaka LF, Lee KK, Ibrahim Khalil A, Baussano I, Shah AS V, *et al.* Estimates of the global burden of cervical cancer associated with HIV. *Lancet Glob Health.* 2021 Feb;9(2):e161–9.
6. Allemani C, Matsuda T, Di Carlo V, Harewood R, Matz M, Nikšić M, *et al.* Global surveillance of trends in cancer survival 2000–14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. *The Lancet.* 2018 Mar;391(10125):1023–75.
7. Bravo IG, Félez-Sánchez M. Papillomaviruses. *Evol Med Public Health.* 2015;2015(1):32–51.
8. Kusakabe M, Taguchi A, Sone K, Mori M, Osuga Y. Carcinogenesis and management of human papillomavirus-associated cervical cancer. *Int J Clin Oncol.* 2023 Aug 9;28(8):965–74.
9. Bhatla N, Aoki D, Sharma DN, Sankaranarayanan R. Cancer of the cervix uteri: 2021 update. *International Journal of Gynecology & Obstetrics.* 2021 Oct 20;155(S1):28–44.
10. Oyervides-Muñoz MA, Pérez-Maya AA, Rodríguez-Gutiérrez HF, Gómez-Macias GS, Fajardo-Ramírez OR, Treviño V, *et al.* Understanding the HPV integration and its progression to cervical cancer. *Infection, Genetics and Evolution.* 2018 Jul;61:134–44.

11. Saeed-Vafa D, Huang Y, Manucha V. Should cervical cancer screening begin at age 21 for everyone? A quantitative analysis in a high-risk, low-income, African +American/Hispanic young-adult population. *Diagn Cytopathol*. 2014 Mar 30;42(3):205–12.
12. Willemsen A, Bravo IG. Origin and evolution of papillomavirus (onco)genes and genomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2019 May 27;374(1773):20180303.
13. de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, *et al*. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2007 Jul;7(7):453–9.
14. Frias-De-Diego A, Jara M, Escobar LE. Papillomavirus in Wildlife. *Front Ecol Evol*. 2019 Oct 25;7.
15. Wong LP, Sam IC. Ethnically diverse female university students' knowledge and attitudes toward human papillomavirus (HPV), HPV vaccination and cervical cancer. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2010 Jan;148(1):90–5.
16. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev Med Virol*. 2015 Mar 6;25(S1):2–23.
17. Giuliano AR, Lee JH, Fulp W, Villa LL, Lazcano E, Papenfuss MR, *et al*. Incidence and clearance of genital human papillomavirus infection in men (HIM): a cohort study. *The Lancet*. 2011 Mar;377(9769):932–40.
18. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004 Jun;324(1):17–27.
19. Tommasino M. The biology of beta human papillomaviruses. *Virus Res*. 2017 Mar;231:128–38.
20. Hammer A, Rositch A, Qeadan F, Gravitt PE, Blaakaer J. Age-specific prevalence of HPV16/18 genotypes in cervical cancer: A systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer*. 2016 Jun 15;138(12):2795–803.
21. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, Hausen H zur, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*. 2010 May;401(1):70–9.
22. Harden ME, Munger K. Human papillomavirus molecular biology. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2017 Apr;772:3–12.

23. Doorbar J, Jenkins D, Stoler MH, Bergeron C. Biology of the Human Papillomavirus Life Cycle: The Basis for Understanding the Pathology of PreCancer and Cancer. In: Human Papillomavirus. Elsevier; 2020. p. 67–83.
24. Chesson HW, Dunne EF, Hariri S, Markowitz LE. The Estimated Lifetime Probability of Acquiring Human Papillomavirus in the United States. *Sex Transm Dis.* 2014 Nov;41(11):660–4.
25. Bruni L, Diaz M, Castellsagué X, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjosé S. Cervical Human Papillomavirus Prevalence in 5 Continents: Meta-Analysis of 1 Million Women with Normal Cytological Findings. *J Infect Dis.* 2010 Dec 15;202(12):1789–99.
26. Bruni L AGSBMMCJGDMJBF. ICO/IARC Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre). Human Papillomavirus and Related Diseases in the World. 2023 Mar.
27. Bruni L, Albero G, Rowley J, Alemany L, Arbyn M, Giuliano AR, *et al.* Global and regional estimates of genital human papillomavirus prevalence among men: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health.* 2023 Sep;11(9):e1345–62.
28. Wang X, Huang X, Zhang Y. Involvement of Human Papillomaviruses in Cervical Cancer. *Front Microbiol.* 2018 Nov 28;9.
29. Bottley G, Watherston OG, Hiew YL, Norrild B, Cook GP, Blair GE. High-risk human papillomavirus E7 expression reduces cell-surface MHC class I molecules and increases susceptibility to natural killer cells. *Oncogene.* 2008 Mar 13;27(12):1794–9.
30. Walboomers JMM, Jacobs M V., Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah K V., *et al.* Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999 Sep;189(1):12–9.
31. Martinez-Zapian D, Ruiz FX, Poirson J, Mitschler A, Ramirez J, Forster A, *et al.* Structure of the E6/E6AP/p53 complex required for HPV-mediated degradation of p53. *Nature.* 2016 Jan 28;529(7587):541–5.
32. Howley Boston PM. WARTS, CANCER AND UBIQUITYLATION: LESSONS FROM THE PAPILOMAVIRUSES. Vol. 117, TRANSACTIONS OF THE AMERICAN CLINICAL AND CLIMATOLOGICAL ASSOCIATION. 2006.
33. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, *et al.* The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine.* 2012 Nov;30:F55–70.

34. Hoppe–Seyler K, Bossler F, Braun JA, Herrmann AL, Hoppe–Seyler F. The HPV E6/E7 Oncogenes: Key Factors for Viral Carcinogenesis and Therapeutic Targets. *Trends Microbiol.* 2018 Feb;26(2):158–68.
35. Loopik DL, Bentley HA, Eijgenraam MN, IntHout J, Bekkers RLM, Bentley JR. The Natural History of Cervical Intraepithelial Neoplasia Grades 1, 2, and 3: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Low Genit Tract Dis.* 2021 Jul;25(3):221–31.
36. MELNIKOW J. Natural history of cervical squamous intraepithelial lesions: a meta-analysis*1. *Obstetrics & Gynecology.* 1998 Oct;92(4):727–35.
37. Holowaty P, Miller AB, Rohan T, To T. Natural History of Dysplasia of the Uterine Cervix. *JNCI Journal of the National Cancer Institute.* 1999 Feb 3;91(3):252–8.
38. Castle PE, Schiffman M, Wheeler CM, Solomon D. Evidence for Frequent Regression of Cervical Intraepithelial Neoplasia–Grade 2. *Obstetrics & Gynecology.* 2009 Jan;113(1):18–25.
39. Matsumoto K, Oki A, Furuta R, Maeda H, Yasugi T, Takatsuka N, *et al.* Predicting the progression of cervical precursor lesions by human papillomavirus genotyping: A prospective cohort study. *Int J Cancer.* 2011 Jun 15;128(12):2898–910.
40. Roden R, Wu TC. How will HPV vaccines affect cervical cancer? *Nat Rev Cancer.* 2006 Oct;6(10):753–63.
41. WHO. Comprehensive Cervical Cancer Control A guide to essential practice Second edition [Internet]. geneva; [cited 2024 Aug 9]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK269619/>
42. Basu P, Ponti A, Anttila A, Ronco G, Senore C, Vale DB, *et al.* Status of implementation and organization of cancer screening in The European Union Member States—Summary results from the second European screening report. *Int J Cancer.* 2018 Jan 10;142(1):44–56.
43. Siddiqui MAA, Perry CM. Human Papillomavirus Quadrivalent (types 6, 11, 16, 18) Recombinant Vaccine (Gardasil??). *Drugs.* 2006;66(9):1263–71.
44. Monie A, Hung CF, Roden R, Wu TC. Cervarix™ : a vaccine for the prevention of HPV 16, 18-associated cervical cancer. Vol. 2, *Biologics: Targets & Therapy.* 2008.
45. Yao Y li, Tian Q fang, Cheng B, Cheng Y fan, Ye J, Lu W guo. Human papillomavirus (HPV) E6/E7 mRNA detection in cervical exfoliated cells: a potential triage for HPV-positive women. *Journal of Zhejiang University–SCIENCE B.* 2017 Mar 20;18(3):256–62.

46. Drolet M, Laprise JF, Martin D, Jit M, Bénard É, Gingras G, *et al.* Optimal human papillomavirus vaccination strategies to prevent cervical cancer in low-income and middle-income countries in the context of limited resources: a mathematical modelling analysis. *Lancet Infect Dis.* 2021 Nov;21(11):1598–610.
47. Man I, Georges D, Sankaranarayanan R, Basu P, Baussano I. Building resilient cervical cancer prevention through gender-neutral HPV vaccination. *Elife.* 2023 Jul 24;12.
48. Lewis RM, Markowitz LE, Gargano JW, Steinau M, Unger ER. Prevalence of Genital Human Papillomavirus Among Sexually Experienced Males and Females Aged 14–59 Years, United States, 2013–2014. *J Infect Dis.* 2018 Mar 5;217(6):869–77.
49. Harder T, Wichmann O, Klug SJ, van der Sande MAB, Wiese-Posselt M. Efficacy, effectiveness and safety of vaccination against human papillomavirus in males: a systematic review. *BMC Med.* 2018 Dec 18;16(1):110.
50. Bruni L, Saura-Lázaro A, Montoliu A, Brotons M, Alemany L, Diallo MS, *et al.* HPV vaccination introduction worldwide and WHO and UNICEF estimates of national HPV immunization coverage 2010–2019. *Prev Med (Baltim).* 2021 Mar;144:106399.
51. António Lacerda Sales. Diário da República. Gabinete do Secretário de Estado da Saúde [Internet]. 2019 Dec 30 [cited 2024 Aug 9];30–1. Available from: <https://files.diariodarepublica.pt/2s/2019/12/250000000/0003000031.pdf>
52. Kim JW. Book Review: IARC handbooks of cancer prevention, volume 18: Cervical cancer screening. *J Gynecol Oncol.* 2022;33(4).
53. Joaquim Neves. Ginecologia fundamental. 2020th ed. Iidel, editor. 2020.
54. Silva Pereira J, Pedro A. Colposcopia – da Prática à Teoria. 2014.
55. Tota JE, Bentley J, Blake J, Coutlée F, Duggan MA, Ferenczy A, *et al.* Introduction of molecular HPV testing as the primary technology in cervical cancer screening: Acting on evidence to change the current paradigm. *Prev Med (Baltim).* 2017 May;98:5–14.
56. Moutinho JFA, Vitorino A, Pacheco A, Pedro A, Matos A, Moniz AP, Quintas A, *et al.* Consenso sobre infecção por HPV e neoplasia intraepitelial do colo vulva e vagina. 2014 Feb 22;13–25.
57. Stoler MH. Interobserver Reproducibility of Cervical Cytologic and Histologic Interpretations<SUBTITLE>Realistic Estimates From the ASCUS-LSIL Triage Study</SUBTITLE> JAMA. 2001 Mar 21;285(11):1500.
58. Sociedade Portuguesa de Ginecologia. Consenso Nacional Vacinas contra HPV. 2017.

59. Wentzensen N, Arbyn M. HPV-based cervical cancer screening- facts, fiction, and misperceptions. *Prev Med (Baltim)*. 2017 May;98:33–5.
60. Gage JC, Schiffman M, Katki HA, Castle PE, Fetterman B, Wentzensen N, *et al*. Reassurance Against Future Risk of Precancer and Cancer Conferred by a Negative Human Papillomavirus Test. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 2014 Jul 18;106(8):dju153–dju153.
61. von Karsa L, Arbyn M, De Vuyst H, Dillner J, Dillner L, Franceschi S, *et al*. European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening. Summary of the supplements on HPV screening and vaccination. *Papillomavirus Research*. 2015 Dec;1:22–31.
62. Rodrigues LG, Santos KBM, Martins AC da SS, Fagundes BLS, Oliveira VC, Gomes MCA, *et al*. Câncer de colo uterino e a infecção pelo HPV: consequências da não adesão aos métodos de prevenção. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*. 2021 Apr 24;13(4):e7211.
63. Zhang S, Batur P. Human papillomavirus in 2019: An update on cervical cancer prevention and screening guidelines. *Cleve Clin J Med*. 2019 Mar;86(3):173–8.
64. Saslow D, Solomon D, Lawson HW, Killackey M, Kulasingam SL, Cain J, *et al*. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. *CA Cancer J Clin*. 2012 May 14;62(3):147–72.
65. Benski AC, Viviano M, Jinoro J, Alec M, Catarino R, Herniainasolo J, *et al*. HPV self-testing for primary cervical cancer screening in Madagascar: VIA/VILI triage compliance in HPV-positive women. *PLoS One*. 2019 Aug 13;14(8):e0220632.
66. Szarewski A, Ambroisine L, Cadman L, Austin J, Ho L, Terry G, *et al*. Comparison of Predictors for High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia in Women with Abnormal Smears. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2008 Nov 1;17(11):3033–42.
67. Sarma U, Biswas I, Das A, Das GC, Saikia C, Sarma B. p16INK4a expression in cervical lesions correlates with histologic grading – A tertiary level medical facility based retrospective study. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2017 Oct 1;18(10):2643–7.
68. Vinodhini K, Shanmughapriya S, Das BC, Natarajaseenivasan K. Prevalence and risk factors of HPV infection among women from various provinces of the world. *Arch Gynecol Obstet*. 2012 Mar 13;285(3):771–7.

69. Keita N, Clifford GM, Koulibaly M, Douno K, Kabba I, Haba M, *et al.* HPV infection in women with and without cervical cancer in Conakry, Guinea. *Br J Cancer*. 2009 Jul 16;101(1):202–8.
70. Ghosh A, Nirupama M, Padmanabha N, Kini H. Assessment of p16 and Ki67 Immunohistochemistry Expression in Squamous Intraepithelial Lesion with Cytomorphological Correlation. *Iran J Pathol*. 2020 Oct 1;15(4):268–73.
71. Clarke MA, Wentzensen N, Perkins RB, Garcia F, Arrindell D, Chelmow D, *et al.* Recommendations for Use of p16/Ki67 Dual Stain for Management of Individuals Testing Positive for Human Papillomavirus. *J Low Genit Tract Dis*. 2024 Apr;28(2):124–30.
72. Roche [Internet]. Indianapolis: Roche. 2024 [citado em 20 Novembro 2024]. Disponível em: <https://diagnostics.roche.com/us/en/products/tests/cintec-plus.html>.
73. Wright TC, Behrens CM, Ranger-Moore J, Rehm S, Sharma A, Stoler MH, *et al.* Triaging HPV-positive women with p16/Ki-67 dual-stained cytology: Results from a sub-study nested into the ATHENA trial. *Gynecol Oncol*. 2017 Jan;144(1):51–6.
74. Wentzensen N, Schwartz L, Zuna RE, Smith K, Mathews C, Gold MA, *et al.* Performance of p16/Ki-67 Immunostaining to Detect Cervical Cancer Precursors in a Colposcopy Referral Population. *Clinical Cancer Research*. 2012 Aug 1;18(15):4154–62.
75. Arbyn M, Anttila A, Jordan J, Ronco G, Schenck U, Segnan N, *et al.* European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening. Second Edition—Summary Document. *Annals of Oncology*. 2010 Mar;21(3):448–58.
76. Li J, Shi LW, Li K, Huang LR, Li JB, Dong YL, *et al.* Comparison of the safety and persistence of immunogenicity of bivalent HPV16/18 vaccine in healthy 9–14-year-old and 18–26-year-old Chinese females: A randomized, double-blind, non-inferiority clinical trial. *Vaccine*. 2023 Nov;41(48):7212–9.
77. Pangarkar MA. The Bethesda System for reporting cervical cytology. *Cytojournal*. 2022 Apr 30;19:28.
78. Ceita C. *Projeção da População 2014–2050*. Luanda: Instituto Nacional de Estatística; 2016.
79. Vieira R, Montezuma D, Barbosa C, Macedo Pinto I. Cervical cytology and HPV distribution in Cape Verde: A snapshot of a country taken during its first HPV nation-wide vaccination campaign. *Tumour Virus Res*. 2024 Jun;17:200280.

80. Edna Omar V, Orvalho A, Nália I, Kaliff M, Lillsunde-Larsson G, Ramqvist T, *et al.* Human papillomavirus prevalence and genotype distribution among young women and men in Maputo city, Mozambique. *BMJ Open.* 2017 Nov;7(7):e015653.
81. Handlogten KS, Molitor RJ, Roeker LE, Narla NP, Bachman MJ, Quayson S, *et al.* Cervical Cancer Screening in Ghana, West Africa. *International Journal of Gynecological Pathology.* 2014 Mar;33(2):197–202.
82. Dols JAM, Reid G, Brown JM, Tempelman H, Bontekoe TjR, Quint WG V., *et al.* HPV Type Distribution and Cervical Cytology among HIV-Positive Tanzanian and South African Women. *ISRN Obstet Gynecol.* 2012 Jun 28;2012:1–5.
83. Ng'andwe C, Lowe JJ, Richards PJ, Hause L, Wood C, Angeletti PC. The distribution of sexually-transmitted Human Papillomaviruses in HIV positive and negative patients in Zambia, Africa. *BMC Infect Dis.* 2007 Dec 16;7(1):77.
84. Seyoum A, Assefa N, Gure T, Seyoum B, Mulu A, Mihret A. Prevalence and Genotype Distribution of High-Risk Human Papillomavirus Infection Among Sub-Saharan African Women: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Public Health.* 2022 Jul 8;10.
85. Chrysostomou AC, Stylianou DC, Constantinidou A, Kostrikis LG. Cervical Cancer Screening Programs in Europe: The Transition Towards HPV Vaccination and Population-Based HPV Testing. *Viruses.* 2018 Dec 19;10(12):729.
86. Pitts M, Smith A, Croy S, Lyons A, Ryall R, Garland S, *et al.* Singaporean men's knowledge of cervical cancer and human papillomavirus (HPV) and their attitudes towards HPV vaccination. *Vaccine.* 2009 May;27(22):2989–93.
87. Forman D, de Martel C, Lacey CJ, Soerjomataram I, Lortet-Tieulent J, Bruni L, *et al.* Global Burden of Human Papillomavirus and Related Diseases. *Vaccine.* 2012 Nov;30:F12–23.
88. Pimple S, Mishra G. Cancer cervix: Epidemiology and disease burden. *Cytojournal.* 2022;19:21.
89. Zoa Assoumou S, Ndjoyi Mbiguino A, Mabika Mabika B, Nguizi Ogoula S, El Mzibri M, Khattabi A, *et al.* Human papillomavirus genotypes distribution among Gabonese women with normal cytology and cervical abnormalities. *Infect Agent Cancer.* 2016 Dec 15;11(1):2.
90. Moussavou-Boundzanga P, Koumakpayi IH, Engohan Aloghe C, Chansi JK, Revignet R, Leroy EM, *et al.* HPV genotypes in high-grade cervical lesions and invasive cervical carcinoma detected in Gabonese women. *Infect Agent Cancer.* 2023 Mar 8;18(1):16.

91. Mutombo AB, Benoy I, Tozin R, Bogers J, Van geertruyden JP, Jacquemyn Y. Prevalence and Distribution of Human Papillomavirus Genotypes Among Women in Kinshasa, The Democratic Republic of the Congo. *J Glob Oncol*. 2019 Dec;(5):1–9.
92. Nganga PC, Boumba LMA, Tsimba CPL, Tchibinda FGL, Nkounkou RBB, Ataboho EE, *et al*. Prevalence and Genotyping of Human Papillomavirus among Women in the Departments of Niari and Bouenza, Republic of the Congo. *J Biosci Med (Irvine)*. 2022;10(01):64–77.
93. Mboumba Bouassa RS, Nodjikouambaye ZA, Sadjoli D, Adawaye C, Péré H, Veyer D, *et al*. High prevalence of cervical high-risk human papillomavirus infection mostly covered by Gardasil-9 prophylactic vaccine in adult women living in N'Djamena, Chad. *PLoS One*. 2019 Jun 3;14(6):e0217486.
94. Tchouaket MCT, Fokam J, Sosso SM, Semengue ENJ, Yagai B, Simo RK, *et al*. High genotypic diversity of human papillomavirus among women in Cameroon: implications for vaccine effectiveness. *IJID Regions*. 2022 Dec;5:130–6.
95. Ndizeye Z, Vanden Broeck D, Lebelo RL, Bogers J, Benoy I, Van Geertruyden JP. Prevalence and genotype-specific distribution of human papillomavirus in Burundi according to HIV status and urban or rural residence and its implications for control. *PLoS One*. 2019 Jun 25;14(6):e0209303.
96. Bule YP, Silva J, Carrilho C, Campos C, Sousa H, Tavares A, *et al*. Human papillomavirus prevalence and distribution in self-collected samples from female university students in Maputo. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*. 2020 May 25;149(2):237–46.
97. Kuguyo O, Dube Mandishora RS, Thomford NE, Makunike-Mutasa R, Nhachi CFB, Matimba A, *et al*. High-risk HPV genotypes in Zimbabwean women with cervical cancer: Comparative analyses between HIV-negative and HIV-positive women. *PLoS One*. 2021 Sep 28;16(9):e0257324.
98. Catarino R, Vassilakos P, Jinoro J, Broquet C, Benski AC, Meyer-Hamme U, *et al*. Human papillomavirus prevalence and type-specific distribution of high- and low-risk genotypes among Malagasy women living in urban and rural areas. *Cancer Epidemiol*. 2016 Jun;42:159–66.
99. Blossom DB, Beigi RH, Farrell JJ, Mackay W, Qadadri B, Brown DR, *et al*. Human papillomavirus genotypes associated with cervical cytologic abnormalities and HIV infection in Ugandan women. *J Med Virol*. 2007 Jun 24;79(6):758–65.

100. Dartell M, Rasch V, Kahesa C, Mwaiselage J, Ngoma T, Junge J, *et al.* Human Papillomavirus Prevalence and Type Distribution in 3603 HIV-Positive and HIV-Negative Women in the General Population of Tanzania. *Sex Transm Dis.* 2012 Mar;39(3):201–8.
101. De Vuyst H, Parisi MR, Karani A, Mandaliya K, Muchiri L, Vaccarella S, *et al.* The prevalence of human papillomavirus infection in Mombasa, Kenya. *Cancer Causes & Control.* 2010 Dec 12;21(12):2309–13.
102. Leyh-Bannurah SR, Prugger C, de Koning MN, Goette H, Lellé RJ. Cervical human papillomavirus prevalence and genotype distribution among hybrid capture 2 positive women 15 to 64 years of age in the Gurage zone, rural Ethiopia. *Infect Agent Cancer.* 2014 Dec 8;9(1):33.
103. Mbaye EHS, Gheit T, Dem A, McKay-Chopin S, Toure-Kane NC, Mboup S, *et al.* Human papillomavirus infection in women in four regions of Senegal. *J Med Virol.* 2014 Feb 11;86(2):248–56.
104. Ouédraogo CMR, Rahimy RML, Zohoncon TM, Djigma FW, Yonli AT, Ouermi D, *et al.* Épidémiologie et caractérisation des génotypes à haut risque de Papillomavirus humain dans une population d'adolescentes sexuellement actives à Ouagadougou. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris).* 2015 Oct;44(8):715–22.
105. Okolo C, Franceschi S, Adewole I, Thomas JO, Follen M, Snijders PJ, *et al.* Human papillomavirus infection in women with and without cervical cancer in Ibadan, Nigeria. *Infect Agent Cancer.* 2010 Dec 3;5(1):24.
106. Tchouaket MCT, Ka'e AC, Semengue ENJ, Sosso SM, Simo RK, Yagai B, *et al.* Variability of High-Risk Human Papillomavirus and Associated Factors among Women in Sub-Saharan Africa: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Pathogens.* 2023 Aug 11;12(8):1032.
107. Ball C, Madden JE. Update on cervical cancer screening. *Postgrad Med.* 2003 Feb 30;113(2):59–70.
108. Benard VB, Jackson JE, Greek A, Senkomago V, Huh WK, Thomas CC, *et al.* A population study of screening history and diagnostic outcomes of women with invasive cervical cancer. *Cancer Med.* 2021 Jun 21;10(12):4127–37.
109. Harrison WN, Teale AM, Jones SP, Mohammed MA. The impact of the introduction of liquid based cytology on the variation in the proportion of inadequate samples between GP practices. *BMC Public Health.* 2007 Dec 1;7(1):191.

110. Alsharif M, McKeon DM, Gulbahce HE, Savik K, Pambuccian SE. Unsatisfactory SurePath liquid-based Papanicolaou tests. *Cancer Cytopathol.* 2009 Feb 25;117(1):15–26.
111. Bentz JS, Rowe LR, Gopez E V., Marshall CJ. The Unsatisfactory ThinPrep Pap Test. *Am J Clin Pathol.* 2002 Mar 1;117(3):457–63.
112. Quiroga-Garza G, Satrum LS, Trujillo CJ, Mody DR, Ge Y. Common causes for unsatisfactory Pap tests in a high-risk population: insights into a yet unresolved problem in gynecologic cytology. *J Am Soc Cytopathol.* 2014 Sep;3(5):256–60.
113. Siebers AG, Klinkhamer PJ, Vedder JE, Arbyn M, Bulten J. Causes and Relevance of Unsatisfactory and Satisfactory but Limited Smears of Liquid-Based Compared With Conventional Cervical Cytology. *Arch Pathol Lab Med.* 2012 Jan 1;136(1):76–83.
114. Moore DR, Robinson MJ, Fry JL, Tang JE, Glover EI, Wilkinson SB, *et al.* Ingested protein dose response of muscle and albumin protein synthesis after resistance exercise in young men. *American Journal of Clinical Nutrition.* 2009 Jan 1;89(1):161–8.
115. Bernstein SJ, Sanchez-Ramos L, Ndubisi B. Liquid-based cervical cytologic smear study and conventional Papanicolaou smears: A metaanalysis of prospective studies comparing cytologic diagnosis and sample adequacy. *Am J Obstet Gynecol.* 2001 Aug;185(2):308–17.
116. Elumir-Tanner L, Doraty M. Management of Papanicolaou test results that lack endocervical cells. *Can Med Assoc J.* 2011 Mar 22;183(5):563–8.
117. Ribeiro AA, Santos S do CD dos, de Souza e Silva SRR, Nascimento MA do, Fonsechi-Carvasan GA, Carneiro MAS, *et al.* Endocervical component in conventional cervical smears: Influence on detection of squamous cytologic abnormalities. *Diagn Cytopathol.* 2007 Apr 9;35(4):209–12.
118. Sharma R, Ambroise M, Ramdas A, Ravichandran K. Predictors of unsatisfactory conventional pap smears. *J Midlife Health.* 2020;11(4):231.
119. Alrajjal A, Pansare V, Choudhury MSR, Khan MYA, Shidham VB. Squamous intraepithelial lesions (SIL: LSIL, HSIL, ASCUS, ASC-H, LSIL-H) of Uterine Cervix and Bethesda System. *Cytojournal.* 2021;18:16.
120. Egemen D, Cheung LC, Chen X, Demarco M, Perkins RB, Kinney W, *et al.* Risk Estimates Supporting the 2019 ASCCP Risk-Based Management Consensus Guidelines. *J Low Genit Tract Dis.* 2020 Apr;24(2):132–43.

121. Ntuli ST, Maimela E, Skaal L, Mogale M, Lekota P. Abnormal cervical cytology amongst women infected with human immunodeficiency virus in Limpopo province, South Africa. *Afr J Prim Health Care Fam Med.* 2020 Oct 6;12(1).
122. Ogembo RK, Gona PN, Seymour AJ, Park HSM, Bain PA, Maranda L, *et al.* Prevalence of Human Papillomavirus Genotypes among African Women with Normal Cervical Cytology and Neoplasia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One.* 2015 Apr 14;10(4):e0122488.
123. Guan P, Howell-Jones R, Li N, Bruni L, de Sanjosé S, Franceschi S, *et al.* Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: A meta-analysis from cervical infection to cancer. *Int J Cancer.* 2012 Nov 15;131(10):2349–59.
124. Abreu Â, Silva R, Fernandes S. Validation of CINtec® PLUS cytology kit in the diagnosis of persistent HPV infections – Cohort study in the Portuguese population. *J Cytol.* 2021;38(2):94.
125. Sharma P, Gupta P, Gupta N, Suri V, Rajwanshi A. Evaluation of the performance of cintec® plus in surepath™ liquid-based cervico-vaginal samples. *Turkish Journal of Pathology.* 2020;
126. Gilbert L, Ratnam S, Jang D, Alaghebandan R, Schell M, Needle R, *et al.* Comparison of CINtec PLUS cytology and cobas HPV test for triaging Canadian patients with LSIL cytology referred to colposcopy: A two-year prospective study. *Cancer Biomarkers.* 2022 May 13;34(3):347–58.
127. Safaeian M, Wright TC, Stoler MH, Ranger-Moore J, Rehm S, Aslam S, *et al.* The IMproving Primary Screening And Colposcopy Triage trial: human papillomavirus, cervical cytology, and histopathologic results from the baseline and 1-year follow-up phase. *Am J Obstet Gynecol.* 2021 Sep;225(3):278.e1–278.e16.
128. Global strategy to accelerate the elimination of cervi. Global strategy to accelerate the elimination of cervical cancer as a public health problem. World Health Organization; 2020. 52 p.