

Frequência de HPV 16 e 18 em pacientes que realizaram exérese da zona de transformação (EZT) no colo do útero na FCecon.

Rebeca Amanda Rodrigues Costa; UniNorte; rebeca13.biomed@gmail.com;
Flávia Níniver de Oliveira Gomes; PPGIBA-UFAM;
Mikele Praia de Oliveira; PPGIBA-UFAM;
Valquíria do Carmo Alves Martins; FCecon;
Mônica Maria Bandeira de Melo; FCecon;
Kátia Luz Torres Silva; FCecon;
Heidy Halanna de Melo Farah Rondon; FCecon;

1. Introdução

A infecção persistente pelo Papillomavírus Humano (HPV) de alto risco, principalmente pelos genótipos 16 e 18, é o principal fator etiológico para o desenvolvimento das neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC), as quais podem progredir para o câncer do colo do útero (CCU)¹. O HPV infecta as camadas basais do epitélio cervical, localizada na junção JEC, promovendo a superexpressão das oncoproteínas, inativando genes supressores tumorais, comprometendo a capacidade celular de induzir apoptose e favorecendo a proliferação celular desordenada. Essa proliferação é categorizada conforme o grau de comprometimento epitelial: na NIC I, classificada como uma lesão de baixo grau, as células imaturas ocupam apenas o terço basal do epitélio e muitas vezes podem regredir espontaneamente. Já as lesões de alto grau (NIC II/III), há acúmulo de células imaturas que comprometem dois terços ou mais da espessura do epitélio, exigindo tratamento precoce para prevenir a evolução para CCU².

O tratamento para as lesões de alto grau consiste na exérese da zona de transformação (EZT), realizado de forma excisional e ambulatorial, sob visão colposcópica e anestesia local. O seguimento dessas mulheres deve ser realizado pelo exame citopatológico semestral, durante um período de 2 anos³. Apesar desse manejo, estudos indicam que pode haver recidiva, frequentemente associada à persistência da infecção pelo HPV, além de outros fatores, como idade avançada, multiparidade, início precoce da atividade sexual e ausência de vacinação contra o HPV⁴.

As novas diretrizes brasileiras para o rastreamento do CCU propõem substituir o modelo oportunístico baseado na citologia pelo teste molecular de DNA-HPV como método primário de triagem. Essa abordagem visa a detecção da infecção viral, a identificação dos genótipos e a detecção precoce das lesões precursoras. Embora essa estratégia tenha avançado significativamente na população alvo do rastreamento, sua aplicabilidade no seguimento de mulheres pós-EZT, permanece pouco explorada, apesar do seu potencial para a identificação precoce de recidivas das lesões⁵.

O Centro Avançado de Prevenção ao Combate do Câncer de Colo de Útero no Amazonas (CEPCOLU), integrado à Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas (FCecon), foi inaugurado em março de 2025 com o objetivo de ampliar e descentralizar os serviços voltados à prevenção do CCU, anteriormente realizados pela FCecon. No entanto, o protocolo de seguimento das pacientes ainda se baseia na citologia. A inclusão do teste molecular para detecção HPV no protocolo de pós-seguimento pode suscitar novas discussões e contribuir para um acompanhamento mais eficaz das pacientes. Dessa forma, o objetivo geral descrever a frequência de HPV 16 e 18 em pacientes que realizaram exérese da zona de transformação, comparando a frequência com o resultado do exame citopatológico.

2. Material e Métodos

Trata-se de um estudo descritivo observacional com aprovação prévia do Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da FCEcon, seguido do número de CAAE 59113422.4.0000.0004 e parecer 5.651272. A captação ocorreu no ambulatório de ginecologia da FCEcon, a população do estudo foram mulheres submetidas a EZT. Os critérios de inclusão foram: pacientes com idade acima de 18 anos, com laudo histopatológico positivo para margens comprometidas e realizando o primeiro exame citopatológico pós-EZT. Pacientes com histórico de quimioterapia ou radioterapia foram excluídas do estudo. As que atenderam aos critérios de inclusão foram convidadas a participar no ambulatório, antes da consulta médica. Após concordarem a participar do estudo, as participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e responderam a um questionário com dados sociodemográficos e comportamentais. As informações clínicas foram obtidas em prontuário eletrônicos (sistema Idoctor).

O médico(a) ginecologista conduziu a coleta do exame citopatológico, que inspecionou o interior da vagina e do colo uterino com uso do instrumento espéculo, coletando células da ectocérvice com a espátula de Ayre e da endocérvice com a escova endocervical. Após o preparo da lâmina, a escova utilizada durante a coleta foi armazenada em tubo falcon contendo 2ml de GITC (solução preservante de DNA/RNA). As amostras foram encaminhadas ao laboratório de biologia molecular da FCEcon, onde foram homogeneizadas no vórtex por 15 segundos, após isso foi realizada alíquota de 400 µL do material em 3 microtubos de 1,5ml e armazenadas a -20°C.

O DNA foi extraído com o Kit *Promega Wizard Genomic DNA purification* seguindo as recomendações do fabricante e sendo quantificado no equipamento da *Thermo Scientific NanoDrop 2000c*, onde sua pureza foi medida pela relação 260/280nm. Apenas as amostras com grau de pureza dentro do parâmetro 1,8 – 2,1 foram encaminhadas para as demais análises.

Para a genotipagem do HPV de alto risco (16/18), as amostras foram submetidas a um ensaio de PCR em tempo real (qPCR), tendo como alvo a proteína E7 dos genótipos 16 e 18. Para os ensaios da qPCR do HPV 16 foram utilizados os primers de oligonucleotídeos: primer forward (5'GAT GAA ATA GAT GGT CCA GC3') e primer reverse (5'GCT TTG TAC GCA CAA CCG AAG C3'), e a sonda (5' FAM-CAA GCA GAA CCG GAC AG-MGB-NFQ). Para os ensaios da qPCR para o HPV 18 foram utilizados os primers de oligonucleotídeos: primer forward (5' AA GAA AAC GAT GAA ATA GAT GGA 3') e primer reverse (5' GGC TTC CAC CTT ACA ACA CA 3'), e a sonda (5' VIC-AAT CAT CAA CAT TTA CCA GCC-MGBNFQ 3') (10). Utilizou-se o DNA de células HeLa como controle positivo para a reação do HPV 18 (10-20 cópias HPV 18 integrados por célula) e a linhagem celular SiHa para a reação do HPV 16 (1 cópias de HPV 16 integrados por célula)⁶.

Para a análise da qualidade e viabilidade de amplificação do material extraído durante a qPCR, utilizou-se o gene da β-globina humana como controle interno da reação de detecção do DNA do HPV, a fim de evitar resultados falsos negativos⁷. As amostras negativas para HPV 16 e HPV 18 na qPCR foram encaminhadas para a reação em cadeia da polimerase convencional (PCR) para detecção de outros HPV's utilizando os iniciadores PGMY09/11 genéricos que amplificam um fragmento de 450 pb abrangendo a região L1 da maioria dos tipos de HPV de mucosa⁸.

3. Resultados e Discussão

Foram incluídas neste estudo 56 mulheres atendidas no setor de ginecologia da FCEcon. A média de idade das participantes foi de 41,5 ± 9,4 anos (variação de 26 a 67 anos). Dentre as características sociodemográficas, 91,1% (51) se autodeclararam parda e quanto ao nível de escolaridade, a maioria (44,6%) das participantes concluíram o ensino médio (Tabela 01).

Em relação aos dados comportamentais a maioria das participantes iniciou as atividades sexuais entre os 15 e 17 anos (55,4%), 58,9% relataram uso ocasional de preservativos e a paridade média das participantes foi $3,4 \pm 1,8$ filhos. Quanto a classificação histopatológica da EZT, 82,1% das pacientes tiveram diagnóstico de NIC de grau III. Seis meses após o procedimento, a colposcopia evidenciou lesão acetobranca apenas em 36% das participantes (Tabela 02).

Tabela 01: Características sociodemográfica das participantes.

Variáveis	N=56	FR
Idade Média	41,5± SD ± 9,4	
Raça		
Branca	4	7,1%
Parda	51	91,1%
Negra	1	1,8%
Escolaridade		
Fundamental incompleto	12	21,4%
Fundamental completo	3	5,4%
Médio incompleto	8	14,3%
Médio completo	25	44,6%
Superior incompleto	4	7,1%
Superior completo	1	1,8%
Analfabeta	3	5,4%
Estado civil		
Solteira	18	32,1%
Casada	36	64,3%
Viúva	2	3,6%

Tabela 02: Características clínicas das participantes.

Variáveis	N=56	FR
Paridade	3,4±SD± 1,8	
Início de atividade sexual		
≤14	16	28,6%
15-17	31	55,4%
≥18	8	14,3%
Não Lembra	1	1,8%
Uso de preservativos		
Nunca	12	21,4%
Às vezes	33	58,9%
Sempre	11	19,6%
Resultado Histopatológico		
NIC II	10	17,9%
NIC III	46	82,1%
Resultado da Colposcopia		
Presença de lesão acetobranca	20	36%
Ausente	28	50%
Não realizado	8	14%

N: Total de Amostras; FR: Frequência Relativa; NIC II: Neoplasia Intraepitelial de Segundo Grau; NIC III: Neoplasia Intraepitelial de Terceiro Grau.

Estudos indicam que o início precoce de relações sexuais tem maior susceptibilidade a infecções por HPV, bem como a outras infecções sexualmente transmissíveis, devido à imaturidade do epitélio cervical e à maior vulnerabilidade da mucosa nessa fase da vida. Ademais, há uma forte correlação entre paridade e risco de CCU, com mulheres multíparas apresentando duas vezes mais chance de desenvolver a condição em comparação às nulíparas, esse risco pode estar relacionado tanto às alterações hormonais e anatômicas decorrentes da gestação quanto a possíveis traumas cervicais durante o parto, que favorecem a persistência da infecção viral e a progressão das lesões¹⁰⁻¹¹.

Quanto à vacina contra HPV, apenas 25% das participantes entrevistadas afirmaram ter tomado ao menos uma dose. No entanto, entre as vacinadas, observou-se a presença da infecção por pelo menos um dos genótipos do HPV. Estudos como o de Kechagias e colaboradores demonstram que a vacinação adjuvante pode reduzir a recorrência de NIC, principalmente associadas ao HPV 16 e 18. Diferença entre os achados pode estar relacionado a baixa cobertura vacinal, ao esquema incompleto ou ao momento de vacinação¹¹.

A genotipagem para a detecção do HPV por qPCR foi realizada em todas as amostras. Observou-se uma alta prevalência do HPV 16 detectado em 39 casos, obtendo uma frequência de 69,6%, destas 46,4% (26) tiveram laudo negativo para malignidade na citologia, entretanto nas alterações citológicas foram constatadas em menores proporções, a prevalência desde genótipo. Houve uma baixa prevalência do HPV 18 com uma frequência de 3,6% (3) em pacientes com laudo negativo para malignidade. Em contrapartida, 21,4% (12) das pacientes não foi detectado o HPV dos genótipos investigados. Ademais, observou coinfeções de ambos os genótipos obtendo uma frequência total de 5,4% (3). (Tabela 03)

Tabela 03: Distribuição de HPV 16 e 18 por Resultado Citopatológico em Pacientes em Seguimento pós- EZT.

DNA-HPV	CITOLOGIA (N=56)						TOTAL
	HSIL	LSIL	ASC-H	ASC-US	NM	INSAT	
Somente HPV 16 +	2 3,6%	1 1,8%	5 8,9%	5 8,9%	26 46,4%	0 0,0%	39 69,6%
Somente HPV 18 +	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	2 3,6%	0 0,0%	2 3,6%
HPV 16 e 18+	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	1 1,8%	2 3,6%	0 0,0%	3 5,4%
Não detectado HPV	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	1 1,8%	10 17,9%	1 1,8%	12 21,4%

HSIL: Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau; LSIL: Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau; ASC-H: Células Escamosas Atípicas – Não Pode Excluir Lesão de Alto Grau; ASC-US: Células Escamosas Atípicas de Significado Indeterminado; INSAT: Amostra Insatisfatória; NM: Negativo para Malignidade.

Em um estudo de meta análise incluiu mais de cem mulheres para avaliar a progressão das NIC com HPV positivo e citologia negativa, indicando risco elevado no desenvolvimento das lesões cervicais ao do tempo, com uma taxa de progressão de 2,1% em um ano, principalmente em mulheres infectadas pelo genótipo¹². A alta frequência do HPV 16, também relatada por Silva et al. em mulheres atendidas em unidades de referência em Manaus, reforça que essa realidade não está restrita a regiões remotas, sendo um desafio presente mesmo em áreas com maior acesso a serviços de saúde. Dessa forma, evidencia-se a necessidade de implementar métodos diagnósticos mais robusto, capazes de fornecer uma estimativa precisa de risco associado as NIC¹³.

A detecção do HPV é uma ferramenta útil no acompanhamento das pacientes pós-EZT, um estudo retrospectivo realizado em duas décadas monitorou o acompanhamento de pacientes com diagnóstico histológico de NIC II+ submetidas a exérese da zona de transformação, segundo o estudo a persistência da infecção do HPV de alto risco após o tratamento e a idade avançada são fatores que estão associados a um risco elevado da recidiva de lesões precursoras do câncer de colo de útero¹⁴.

4. Conclusões

O estudo revelou alta prevalência de HPV 16. Ao comparar os resultados do exame citopatológico com a presença e ausência do HPV, observou-se que 46,4% das amostras negativas no exame citopatológico foram positivas para o HPV 16. O teste de DNA-HPV possibilitou identificar os genótipos de alto risco em pacientes submetidas à EZT, mostrando potencial relevância no acompanhamento clínico. Sua inclusão no seguimento pós-EZT pode fomentar novas discussões para ajustes no protocolo atualmente adotado pelo CEPOLU, visando aprimorar o monitoramento e a prevenção do câncer de colo de útero no Amazonas.

Palavras-chave: Teste de DNA para Papillomavírus Humano (HPV), Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR), Lesões Intraepiteliais Escamosas Cervicais.

Divulgação

O (s) autor (es) e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, o Congresso Pan-Amazônico de Oncologia detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação deste resumo, por meio eletrônico.

5. Referências

1. Zampramonha RAC, Junior FA, Murta EFC, Michelin MA, Barbaresco AA, Adad SJ, et al. Human papillomavirus types 16 and 18 and the prognosis of patients with stage I cervical cancer. *Clinics*. 2013;68:809-14. doi:[https://doi.org/10.6061/clinics/2013\(06\)14](https://doi.org/10.6061/clinics/2013(06)14)
2. Balasubramaniam SD, Balakrishnan V, Oon CE, Kaur G. Key Molecular Events in Cervical Cancer Development. *Medicina*. 2019;55:384. doi: 10.3390/medicina55070384
3. Diretrizes brasileiras para o rastreamento do CCU | INCA - Instituto Nacional de Câncer [Internet]. [citado 11 de fevereiro de 2025]. Disponível em: <https://surl.li/lsekmb>
4. Sanjosé S, Brotons M, Pavón MA. The natural history of human papillomavirus infection. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2018;47:2–13. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2017.08.015
5. Relatório preliminar - Diretrizes Brasileiras para o Rastreamento do CCU: Parte I - Rastreamento organizado utilizando testes moleculares para detecção de DNA-HPV oncogênico [Internet]. [citado 22 de julho de 2025]. Disponível em: <https://surl.li/whfkvtv>
6. Clinical characteristics of women diagnosed with carcinoma who tested positive for cervical and anal high-risk human papillomavirus DNA and E6 RNA | *Tumor Biology* [Internet]. [citado 17 de julho de 2025]. doi: <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3205-9>
7. Enzymatic Amplification of β -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia | *Science* [Internet]. [citado 11 de fevereiro de 2025]. doi: 10.1126/science.2999980
8. Improved Amplification of Genital Human Papillomaviruses | *Journal of Clinical Microbiology* [Internet]. [citado 11 de fevereiro de 2025].doi:10.1128/JCM.38.1.357-361.2000
9. Umakanthan S, Bukelo MM, Ghany S, Gay LD, Gilkes T, Freeman J, et al. The Correlation of Papanicolaou Smears and Clinical Features to Identify the Common Risk Factors for Cervical Cancer: A Retrospective and Descriptive Study from a Tertiary Care Hospital in Trinidad. *Vaccines (Basel)*. 2023;11:697. doi: 10.3390/vaccines11030697
10. Tekalegn Y, Sahiledengle B, Woldeyohannes D, Atlaw D, Degno S, Desta F, et al. High parity is associated with increased risk of cervical cancer: Systematic review and meta-analysis of case–control studies. *Womens Health*. 2022;18:17455065221075904.
11. Pérez CA, Mena RM, Pacheco PE, Prados GI, Santos GJ, Amo BM, et al. Effectiveness of Prophylactic Human Papillomavirus Vaccine in the Prevention of Recurrence in Women Conized for HSIL/CIN 2-3: The VENUS Study. *Vaccines (Basel)*. 2022;10:288.
12. Malagón T, Volesky KD, Bouten S. Cumulative risk of cervical intraepithelial neoplasia for women with normal cytology but positive for human papillomavirus: Systematic review and meta-analysis - Malagón - 2020 - *International Journal of Cancer* - Wiley Online Library [Internet]. [citado 17 de julho 2025]. doi: <https://doi.org/10.1002/ijc.33035>
13. Silva AS, Bica CG, Vieira A, Fantin C. Molecular detection of oncogenic subtypes of human papillomavirus (HPV) in a group of women in the Amazon region of Brazil. *Acta Scientiarum Health Sciences*. doi:<https://doi.org/10.4025/actascihealthsci.v42i1.50005>
14. Montolí F, Tous S, Medina G, et al. Long-term predictors of residual or recurrent cervical intraepithelial neoplasia 2–3 after treatment with a large loop excision of the transformation zone: a retrospective study. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 2020;127:377–87. doi:10.1111/1471-0528.15996

Financiamento: FAPEAM – Programa PAIC.