



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE - UFCG
CENTRO DE FORMAÇÃO DE PROFESSORES - CFP
UNIDADE ACADÊMICA DE ENFERMAGEM – UAENF
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENFERMAGEM

ANA CAROLINA RODRIGUES CAVALCANTE ALMEIDA

HETEROGENEIDADE DO ONCOGENE E5 DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO 18

CAJAZEIRAS - PB

2018

ANA CAROLINA RODRIGUES CAVALCANTE ALMEIDA

HETEROGENEIDADE DO ONCOGENE E5 DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO 18

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Coordenação de Curso de Graduação em Enfermagem da Unidade Acadêmica de Enfermagem do Centro de Formação de Professores da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Enfermagem.

Orientador: Prof. Me. Antônio Humberto Pereira da Silva Júnior – UACV

Co-orientação: Dra. Brígida Thaís Luckwü de Lucena – UEPB

CAJAZEIRAS - PB

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação - (CIP)
Josivan Coêlho dos Santos Vasconcelos - Bibliotecário CRB/15-764
Cajazeiras - Paraíba

A447h Almeida, Ana Carolina Rodrigues Cavalcante.
Heterogeneidade do oncogene E5 do papiloma vírus humano 18 / Ana Carolina Rodrigues Cavalcante Almeida. - Cajazeiras, 2018.
50f.: il.
Bibliografia.

Orientador: Prof. Me. Antônio Humberto Pereira da Silva Júnior.
Co-orientadora: Profa. Dra. Brígida Thaís Luckwü de Lucena.
Monografia (Bacharelado em Enfermagem) UFCG/CFP, 2018.

1. HPV18. 2. Gene E5. 3. Alpha-papilomavírus. 4. Variantes do HPV.
5. Papiloma vírus humano. I. Silva Júnior, Antônio Humberto Pereira da.
II. Lucena, Brígida Thaís Luckwü de. III. Universidade Federal de
Campina Grande. IV. Centro de Formação de Professores. V. Título.

UFCG/CFP/BS

CDU - 616.97

ANA CAROLINA RODRIGUES CAVALCANTE ALMEIDA

HETEROGENEIDADE DO ONCOGENE E5 DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO 18

Trabalho de Conclusão de Curso a ser apresentado a Coordenação de Curso de Graduação em Enfermagem da Unidade Acadêmica de Enfermagem do Centro de Formação de Professores da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Enfermagem.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado e aprovado em 18 de março de 2018 pela seguinte banca examinadora.

BANCA EXAMINADORA

Antônio Humberto Pereira da Silva Jr.

Prof. Me. Antônio Humberto Pereira da Silva Júnior – UACV

Andreza Guedes B. Ramos.

Profª. Me. Andreza Guedes Barbosa Ramos - UACV

Dayze Djanira Furtado de Galiza

Profª. Me. Dayze Djanira Furtado de Galiza - UAENF

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por me proporcionar chegar até aqui mesmo diante de tantas dificuldades que surgiram no meio do caminho, tudo que sou hoje é mérito Dele que me capacita e está sempre presente em minha vida fazendo de mim um ser humano melhor, a Ele toda a minha gratidão.

A meu esposo Geovani Almeida que é meu companheiro de vida e esteve sempre presente me dando apoio em todos os momentos, me tranquilizando nos momentos difíceis e me fazendo acreditar na minha capacidade de vencer todos os obstáculos. Obrigada por tudo! Você é uma peça fundamental de tudo isso e tem sido minha fonte de força para prosseguir rumo ao sucesso.

A meus pais, Hélio Cavalcante Alves e Maria de Lourdes Rodrigues Alves, que sempre acreditaram no meu potencial, estiveram comigo em todos os momentos e me ensinaram valores que levarei para sempre comigo. Sou eternamente grata a vocês e a Deus por ter me dado os melhores pais que, acima de tudo, são meus melhores amigos.

A meu orientador Prof. Antônio Humberto que esteve comigo na construção desse trabalho fazendo com que essa caminhada fosse tão mais leve, me passando confiança, me fazendo acreditar que conseguiria mesmo nos momentos de medo e ansiedade. Eu não poderia ter escolhido orientador melhor e mais competente para me guiar nessa reta final. Obrigada por todo apoio e dedicação!

Agradeço a todos os professores que contribuíram de forma grandiosa na formação da profissional que me tornarei, me ensinando os conhecimentos necessários e também os valores que fizeram de mim um ser mais humano.

E por fim, agradeço as minhas amigas Geovannya Iran, Ronielle Duarte e Sandra Regina que estiveram comigo durante estes anos de graduação, compartilhando as vitórias, vencendo juntas comigo todas as dificuldades, tornando os dias mais leves e felizes. Amo vocês!

Muito obrigada!

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

(José de Alencar)

RESUMO

As infecções pelos HR HPVs constituem-se no principal fator de risco na etiopatogênese do câncer cervical, causando uma morbidade que afeta mais de 80% da população dos países em desenvolvimento. Os HPVs 16 e 18 são considerados de alto risco oncogênico e estão amplamente distribuídos no nordeste do Brasil. Sua biologia da infecção vem sendo amplamente estudada. No entanto, as análises moleculares sobre o gene E5 do HPV18 ainda são escassos, mas de extrema relevância, por desempenharem um importante papel no surgimento e na progressão das lesões, o que o torna um excelente alvo de estudos moleculares. Este trabalho teve como objetivo analisar a variabilidade genética das sequências do gene E5 do HPV18, depositadas no banco de dados do NCBI e do PaVE. Foram estudadas nove variantes do gene 18E5, designadas por AY262282, EF202146, EF202147, EF202151, GQ180787, EF202155, KC470225, EF202152, KC470229. As análises de variabilidade foram conduzidas com o auxílio do programa MEGA6 e a identificação dos epítomos imunogênicos e da estrutura secundária da proteína, foram realizados com o auxílio dos programas IEDB e PsiPred, respectivamente. Observamos 09 substituições de nucleotídeos, das quais 04 do tipo não-sinônimas e 05 sinônimas. A natureza hidrofóbica da proteína foi mantida bem como a conservação da estrutura da oncoproteína 18E5. Os principais epítomos imunogênicos elencados fazem parte da classe HLA-A (MHC-I), o que pode ser útil no desenvolvimento de estratégias imunoterapêuticas.

Palavras-Chave: Gene E5; HPV18; Alpha-papilomavírus; Variantes do HPV.

ABSTRACT

HR-HPV infections are the major risk factor in the etiopathogenesis of cervical cancer, causing morbidity that affects more than 80% of the population in developing countries. HPVs 16 and 18 are considered high oncogenic risk (HR HPV) and are widely distributed in northeastern of Brazil. Its biology of infection has been extensively studied. However, molecular analyzes of the HPV18 E5 gene are still scarce, but extremely relevant because they play an important role in the onset and progression of the lesions, making it an excellent target for molecular studies. The aim of this work was to analyze the genetic variability of HPV18 E5 gene sequences deposited in the NCBI and PaVE database. We studied nine variants of the 18E5 gene, designated AY262282, EF202146, EF202147, EF202151, GQ180787, EF202155, KC470225, EF202152, KC470229. The variability analyzes were conducted with the aid of the MEGA6 program and the identification of the immunogenic epitopes and the secondary structure of the protein were carried out with the help of the IEDB and PsiPred programs, respectively. We observed 09 nucleotide substitutions, of which 04 were non-synonymous and 05 synonymous. The hydrophobic nature of the protein was maintained as well as the preservation of the structure of the 18E5 oncoprotein. The major immunogenic epitopes listed are part of the HLA-A class (MHC-I), which may be useful in the development of immunotherapeutic strategies.

Keywords: E5 gene; HPV18; Alpha-papillomavirus; HPV variants.

LISTRA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Figura 1 - Representação esquemática do genoma viral do HPV16.	19
Figura 2 - Árvore filogenética mostrando as espécies dos Alpha-PVs.	21
Figura 3 - Esquema demonstrando o ciclo do HPV e local de ação de suas proteínas.	22
Figura 4 - Esquema da estrutura da oncoproteína E5 em HPV16.	24
Figura 5 - Estrutura secundária das variantes da oncoproteína E5 do HPV18.	35

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Papel geral das oncoproteínas virais no curso da carcinogênese cervical.	18
Tabela 2 - Variações nucleotídicas do oncogene E5 do HPV18.	34
Tabela 3 - Predição de potenciais epítomos MHC-I pela oncoproteína E5.	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Variante asiático-americano
Af-1	Variante africano 1
Af-2	Variante africano-2
AP-1	Proteína ativadora 1
APC	Células apresentadoras de antígeno
As	Variante asiático
ASCUS	Células escamosas atípicas de significado indeterminado
ASC-H	Células escamosas atípicas HSIL
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CAF	Cirurgia de alta frequência
C/EBP	Proteína de ligação à sequência CCAAT
COX	Ciclo-oxigenase
CTL	Linfócito T citotóxico
DC	Células Dendríticas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EGFR	Receptor para o fator de crescimento epitelial
ET-1	Ligante específico de endotelina
EV	Epidermiodisplasia verruciforme
FasL	Fator de necrose tumoral
Genes E	<i>Early</i> (precoce)
Genes L	<i>Late</i> (tardio)
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA	Antígeno leucocitário humano
HPV	Papilomavírus Humano
HR HPV	Papilomavírus de alto risco oncogênico
HSIL	<i>High squamous intraepithelial lesion</i>
HSPG	Receptores heparan sulfato
IC	Carcinoma invasivo
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IEDB	<i>Immune Epitope Database and Analysis Resource</i>

IFN	Interferon
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IRE	<i>Inositol-requiring enzyme</i>
kDa	Unidade quilodáton
LCR	Long control region
LR HPV	Papilomavírus de baixo risco oncogênico
LSIL	<i>Low squamous intraepithelial lesion</i>
MAPK	Proteína-quinase ativada por mitógeno
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MS	Ministério da Saúde
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCR	<i>Non-coding region</i>
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
NK	<i>Natural killer</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
ORI	Origem de replicação
pAE	Sítio de poliadenilação dos transcritos precoces
pAL	Sítio de poliadenilação dos transcritos tardios
PaVE	<i>Papillomavirus Genome Database</i>
Pb	Pares de bases
PSIPRED	<i>The Prtotein Sequence Analysis Workbench</i>
PV	Papilomavírus
RE	Retículo endoplasmático
SIL	<i>Squamous intraepithelial lesion</i>
TLRs	Receptores Toll-like
TNF	Fator de necrose tumoral
TRAIL	Fator indutor de apoptose
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
XBP	<i>X-box binding protein</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 GERAL.....	15
2.2 ESPECÍFICOS	15
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
3.1 O CÂNCER CERVICAL: EPIDEMIOLOGIA	16
3.2 NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL.....	17
3.3 PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV): ORGANIZAÇÃO GENÔMICA.....	18
3.4 DIVERSIDADE E CLASSIFICAÇÃO DOS HPVS	19
3.5 ENTRADA DO HPV NA CÉLULA.....	20
3.6 HPV18.....	22
3.7 ESTRUTURA E PAPEL BIOLÓGICO DA ONCOPROTEÍNA E5	23
3.7.1 Papel da oncoproteína E5 sobre o sistema imunológico	25
3.7.2 Importância de E5 no diagnóstico e tratamento	25
3.8 PROGRAMAS DE CONTROLE E RASTREAMENTO	26
3.9 TRATAMENTO.....	27
3.10 VACINAÇÃO: VACINA BIVALENTE E QUADRIVALENTE	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1 COLETA E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DO GENE E5 DO HPV18	31
4.2 BANCO DE DADOS DE ANÁLISE DE SEQUÊNCIA DE PROTEÍNAS– PSIPRED	31
4.3 BANCO DE DADOS DE EPÍTOPOS IMUNOGÊNICOS E RECURSO DE ANÁLISE (IEDB).....	31
5 RESULTADOS	33
5.1 VARIABILIDADE DO GENE E5 DO HPV18	33
5.2 ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA ONCOPROTEÍNA E5	34
5.3 MAPEAMENTO DE EPÍTOPOS IMUNOGÊNICOS	35

6 DISCUSSÃO	38
7. CONCLUSÕES.....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1 INTRODUÇÃO

O câncer cervical corresponde ao quarto tipo de neoplasia mais frequente em mulheres do mundo todo. As recentes estimativas para o Brasil, no ano de 2016, indicaram cerca de 16.340 novos casos diagnosticados por ano. A região nordeste, por sua vez, ocupa o terceiro lugar em incidência de casos e, para o Estado da Paraíba, são esperados cerca de 330 novos casos (INCA, 2015).

Um dos pré-requisitos para o desenvolvimento do câncer cervical e de lesões pré-cancerosas é o Papilomavírus humano (HPV) (ZUR HAUSEN, 2002). O HPV é um vírus de DNA de fita dupla pertencente à família Papillomaviridae (DE VILLIERS et al., 2004) que possui afinidade por células mucoides ou cutâneas no tecido epitelial através de micro lesões. O contato sexual é a principal forma de transmissão deste vírus (SOUTO et al., 2005). Com um genoma de aproximadamente 8kb, o HPV é composto por três regiões: A região de expressão precoce (*Early*), representada pelos genes E1, E2, E5, E6 e E7; a região de expressão tardia (*Late*), representada pelos genes L1 e L2; e a região LCR (Região Longa de Controle), onde são encontradas sequências regulatórias da transcrição viral (FAVRE & ORTH, 1997).

O HPV possui mais de 200 genótipos caracterizados (BERNARD et al., 2010). Dentre os diferentes tipos de HPV, os genótipos considerados de alto risco oncogênico (HR-HPV, *High Risk HPV*), tais como o HPV 16 e o HPV18, são os maiores responsáveis pelos casos de câncer cervicais diagnosticados mundialmente (HANG et al., 2014).

Estudos genético-epidemiológicos têm sugerido que a etiologia do câncer cervical é complexa, envolvendo diversos fatores genéticos e ambientais na manifestação desse fenótipo (DE FREITAS et al., 2012). Evidências têm demonstrado que infecções persistentes com variantes de Papilomavírus humano (HPV) concomitantemente com o comprometimento do sistema imunológico do indivíduo atuam de forma preponderante no processo de transformação dos queratinócitos no colo do útero (DE FREITAS et al., 2012; TERMINI; VILLA, 2008).

Contudo, a infecção pelo HPV é uma condição necessária, porém não suficiente para o desenvolvimento do câncer cervical (ZUR HAUSEN, 1996, 2002), sendo outros fatores igualmente importantes no desenvolvimento da carcinogênese cervical, tais como estilo de

vida, co-infecções com outros agentes virais ou bacterianos, múltiplas infecções causadas por distintos HPVs e fatores genéticos do hospedeiro e do vírus (DE FREITAS et al., 2012).

Diversos estudos mostram uma associação entre variabilidade genética dos HR-HPVs de alto risco (*High Risk HPV*), na persistência e na progressão das lesões cervicais para o câncer cervical (CHANG et al., 2011; BURRONI et al., 2013; CORNET et al., 2013). Estas alterações nas sequências dos nucleotídeos no genoma viral podem alterar o potencial oncogênico dos HR-HPVs, levando algumas variantes a tornarem-se mais oncogênicas em relação às outras. Dessa maneira, o conhecimento da diversidade genética do genoma viral dos HPVs circulantes em uma dada região é importante, principalmente no que se refere à patogenicidade causada por algumas variantes de HPVs, ao desenvolvimento de métodos de diagnósticos bem como de construção de vacinas.

No Brasil, existem poucos estudos sobre a variabilidade genética dos oncogenes do HPV18, em especial no que tange ao oncogene E5. Por sua vez, o papel biológico do oncogene E5 tem sido descrito, em especial, em amostras clínicas genotipadas com HPV16, o que reflete a necessidade de maiores estudos sobre a biologia deste oncogene em infecções provocadas pelo HPV18.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

- ✓ Analisar a heterogeneidade genética das variantes do oncogene E5 do HPV18 depositadas no banco de dados genômicos do NCBI e do PaVE.

2.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Analisar a repercussão dos polimorfismos na sequência de aminoácidos das oncoproteínas virais;
- ✓ Mapear potentes epítomos imunogênicos com moléculas do MHC-I, gerados a partir da análise *in silico* das variantes;
- ✓ Analisar as variações na estrutura secundária da proteína;
- ✓ Compreender a relevância das ferramentas computacionais na análise de dados biológicos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O CÂNCER CERVICAL: EPIDEMIOLOGIA

O câncer cervical é o terceiro tipo de neoplasia mais prevalente no mundo, com 527.000 casos e mais de 265.000 mortes por ano, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o que faz com que ele se classifique como um grave problema de saúde pública em todo o mundo. O câncer cervical é, também, a quarta maior causa de mortes mundialmente, e o segundo tipo de câncer mais prevalente em mulheres entre 14 e 55 anos de idade (WHO, 2015).

A taxa de incidência de casos deste tipo de câncer é maior em países em desenvolvimento do que em países desenvolvidos. No Brasil, a incidência de novos casos de câncer cervical no ano de 2016 foi de 16.340 casos, com um risco considerado de 15,85 casos a cada 100 mil mulheres, tornando-o a quarta maior causa de mortes no Brasil, perdendo apenas para os cânceres de mama, pulmão e o câncer colo retal. A região do Nordeste ocupa a segunda posição no país com uma taxa de 19,49/100 mil, perdendo apenas para a região Centro-oeste. A taxa bruta da incidência de câncer cervical no Estado da Paraíba é de 16,21 e na sua Capital, João Pessoa, é de 19,39 (INCA, 2016).

Nas populações, de um modo geral, o câncer cervical está associado a um baixo nível socioeconômico, ou seja, com os grupos que tem maior vulnerabilidade social, pois estes encontram dificuldades no acesso à rede de serviços para detecção e tratamento precoce da doença e de suas lesões precursoras. As dificuldades econômicas e geográficas, insuficiência de serviços e questões culturais, como medo e preconceito dos companheiros, são as principais barreiras encontradas nesses grupos (SARZI *et al.*, 2017).

Apesar das mudanças nos padrões de mortalidade por câncer resultarem de variações na incidência da doença e de seus principais determinantes, a mortalidade é também influenciada pelos casos fatais, que são determinados, por sua vez, pelo diagnóstico no início e disponibilidade de melhores tratamentos e cuidados. Então, torna-se claro que a mortalidade por câncer de colo de útero é um complexo indicador resultante de variações internacionais e, principalmente, da organização interna dos sistemas de saúde dos países (BARBOSA *et al.*, 2016).

3.2 NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL

A infecção persistente por certos tipos de HPVs está associada à progressão das lesões cervicais e ao câncer cervical. A presença de lesões pré-malignas não invasivas, também denominadas de NIC - neoplasias intraepiteliais cervicais (*cervical intraepithelial neoplasia* – CIN) ou de lesões intraepiteliais escamosas (*squamous intraepithelial lesions* – SIL), pode vir a evoluir em câncer cervical. Tais lesões podem ser diagnosticadas por meio do exame citológico das células cervicais esfoliadas juntamente com o exame histológico, que vai confirmar o diagnóstico (SICHERO *et al* 2007; VILLA *et al* 2000; WOODMAN *et al*, 2007). Cerca de 99,7% dos tumores de colo de útero estão associados com o HPV (MUÑOZ *et al.*, 2006).

Com a infecção, é possível observar que as camadas organizadas e ordenadas de células epiteliais pavimentosas da região cervical tornam-se desorganizadas, o que é evidenciado pela apresentação de núcleos celulares mais corados, com divisões irregulares e o aparecimento destas atípias no tecido, chamadas de NICs (AIDÉ *et al.*, 2009).

As alterações histológicas são classificadas de acordo com a morfologia e o grau progressivo das células epiteliais em: NIC I – displasia leve (neoplasia intraepitelial cervical grau 1); NIC II – displasia moderada (neoplasia intraepitelial cervical grau 2) e NIC III – displasia severa (neoplasia intraepitelial cervical grau 3), a qual pode progredir para câncer invasivo (carcinoma *in situ*) (WOODMAN *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2011).

De acordo com a classificação citológica, a lesão epitelial escamosa de baixo grau (LSIL) seria correspondente ao NIC I e a lesão epitelial escamosa de alto grau (HSIL) corresponde aos NIC II e NIC III. Além desta classificação, temos que as células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US) e células escamosas atípicas HSIL (ASC-H), também podem ser encontradas, quando não é possível realizar o diagnóstico de NIC II e NIC III (STEENBERGEN *et al.*, 2005).

A infecção por HPV é transmitida sexualmente e apesar da frequência de infecções, muitas vezes o organismo consegue combatê-las espontaneamente, o que ocasiona alterações citológicas e histológicas menores e transitórias ou, até mesmo, subclínicas (BOSCH *et al.*, 2002). Em infecções de HPV de alto risco, entretanto, as lesões podem não regredir e persistir por longos períodos de tempo (SNIJDERS *et al.*, 2005).

A presença do HPV aliado às alterações genéticas e epigenéticas sofridas no genoma da célula hospedeira contribui para que haja o desenvolvimento do processo carcinogênico, devido a mudanças sofridas no ciclo celular, o que culmina com as características malignas e invasivas das células infectadas (SAAVEDRA *et al.*, 2012).

3.3 PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV): ORGANIZAÇÃO GENÔMICA

O HPV é um vírus de DNA dupla fita circular, contendo aproximadamente 8.000 pares de bases (pb) associados às histonas, com capsídeo não envelopados (ZUR HAUSEN, 1996). Apresenta oito quadros abertos de leitura (do Inglês, *Open Reading Frames* - ORFs) que se expressam na fase precoce (*Early*) ou na fase tardia (*Late*) do ciclo de infecção.

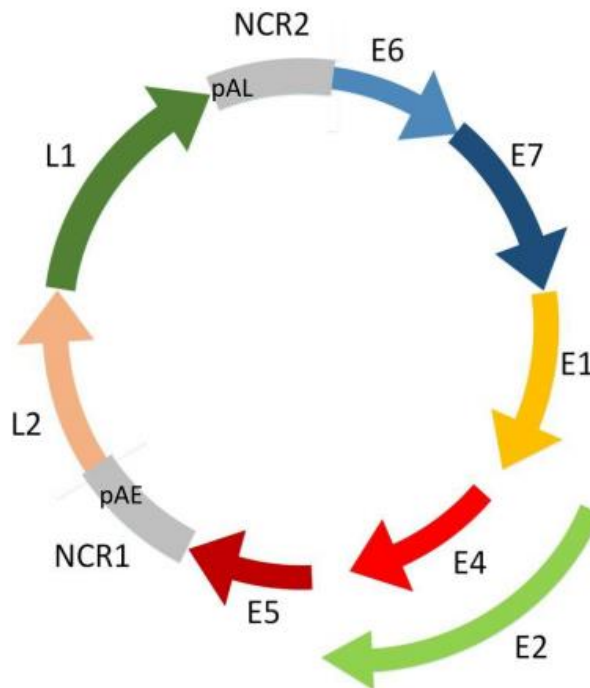
Os genes E (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) são responsáveis pela replicação viral, transformação celular e controle transcricional. Já os genes L (L1 e L2), codificam proteínas estruturais, que formam o capsídeo viral. O DNA do HPV também contém duas regiões não traduzidas, denominadas NCR (*Non Coding region*) e LCR (*Long Control Region*), que regulam a transcrição e replicação viral (BURK *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2011; SCHWARTZ, 2013) (Tabela 1; Figura 1).

Tabela 1 - Papel geral das oncoproteínas virais no curso da carcinogênese cervical.

Expressão	Genes	Função
Gênica		
Precoce	E1	Replicação do DNA viral
	E2	Controle da transcrição e replicação
	E4	Maturação dos vírus e alteração da matriz intracelular
	E5, E6, E7	Estímulo da proliferação e transformação celular
Tardia	L1	Codifica proteína principal do capsídeo
	L2	Codifica proteína secundária do capsídeo

Fonte: Autoria Própria (2017).

Figura 1: Representação esquemática do genoma viral do HPV16. A figura mostra os genes designados E, os genes L, e as regiões não codificantes NCR e LCR. pAE: Sítio de poliadenilação dos transcritos precoces do ciclo de infecção. pAL: Sítio de poliadenilação dos transcritos tardios do ciclo de infecção.



Fonte: Schwartz, 2013.

3.4 DIVERSIDADE E CLASSIFICAÇÃO DOS HPVS

Na literatura atual são conhecidos mais de 200 tipos de HPVs, onde cerca de 40 destes infectam o trato genital feminino e 15 são potencialmente oncogênicos, sendo os tipos 16 e 18 os de maior prevalência e oncogenicidade (BERNARD *et al.*, 2010; CLIFFORD *et al.*, 2003).

Destacam-se como sendo de alto risco (HR-HPV) os tipos de HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 58, 59, 68, 73 e 82, e os de baixo risco (LR-HPV), o tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 e 81 (FRAGA *et al.*, 2010).

A infecção pelo HPV pode se dar por atividade sexual, contato com tecido infectado e transmissão vertical. Sendo a atividade sexual o principal fator, as mulheres sexualmente ativas, principalmente entre 20 e 40 anos, fazem parte do grupo de risco de infecção pelo HPV, em especial, mulheres que apresentam um maior número de parceiros. O tabagismo e a imunossupressão ajudam o vírus a persistir no hospedeiro (QUEIROZ; CANO; ZAIA, 2007).

Em relação à classificação dos HPVs, o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), estabeleceu sua classificação de acordo com a sequência nucleotídica do gene L1, o que tornou possível o agrupamento dos PVs em gênero e espécie (DE VILLIERS *et al.*, 2005; KALANTARI *et al.*, 2010). Porém, a análise de um único gene não é suficiente para classificar as variantes. Por isso, para nomear uma variante é necessário que seja realizado o estudo do genoma completo. Uma sequência vai ser agrupada em variante quando difere de 1 a 10% em relação à sequência de referência, e em sublinhagem quando varia entre 0,5 a 1% (BURK *et al.*, 2013; ZIGUI *et al.*, 2015).

Os HPVs podem ser divididos em cinco gêneros: Alphapapilomavírus, Betapapilomavírus, Gammapapilomavirus, Mupapilomavírus e Nupapilomavírus (BERNARD *et al.*, 2010; de Villiers *et al.*, 2004). Dentre esses 5 gêneros, os dois gêneros principais são o Alfa e o Beta que, quando somados, possuem aproximadamente 90% dos tipos virais (MUÑOZ *et al.*, 2006).

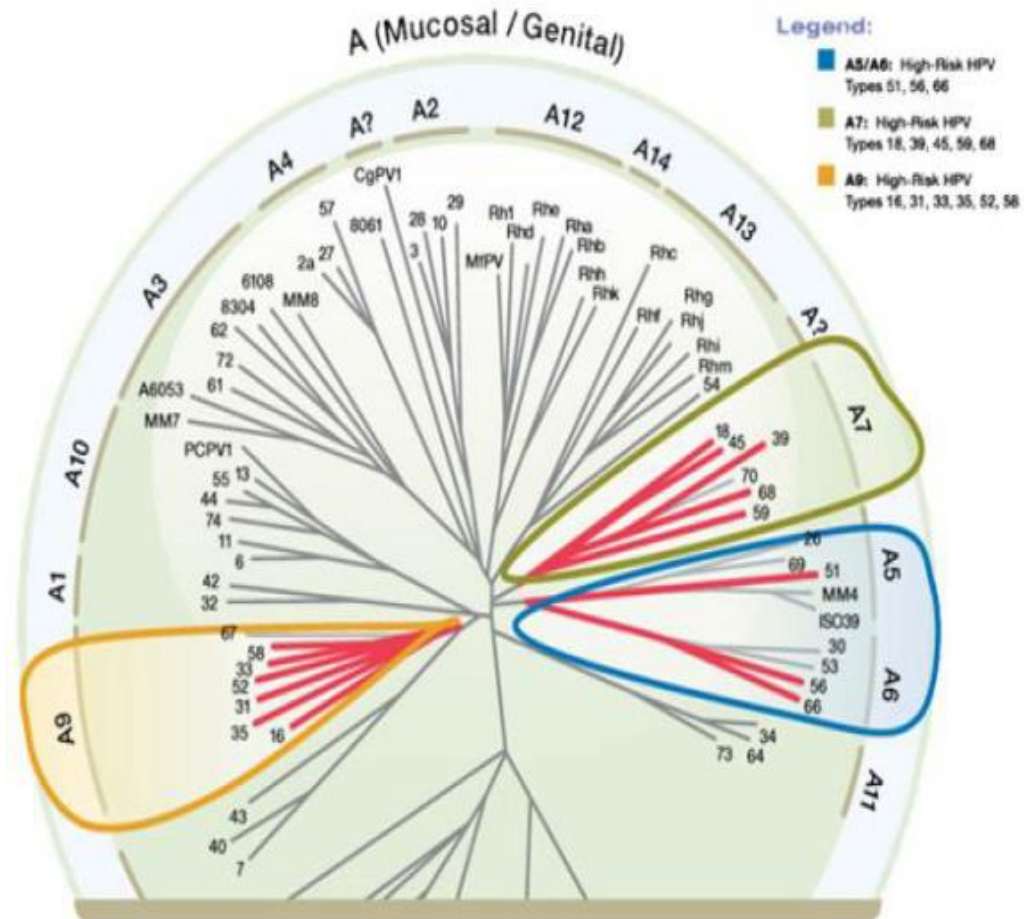
Os tipos mais associados com lesões ao câncer cervical e outros cânceres relacionados com o HPV são os advindos dos gêneros Alpha-9 e Alpha-7, estando o HPV18 classificado neste último (DE SANJOSE *et al.*, 2010) (Figura 2).

3.5 ENTRADA DO HPV NA CÉLULA

O mecanismo pelo qual o HPV entra na célula e os receptores envolvidos neste processo ainda não estão completamente elucidados. A hipótese sugerida atualmente é que, a proteína L1 do HPV interage com os receptores heparan sulfato (HSPGs) e outros componentes de membrana das células basais das mucosas anogenitais, tais como a laminina (DOORBAR *et al.*, 2012; JOHNSON *et al.*, 2009; SAPP e DAY, 2009).

Estas moléculas são amplamente encontradas na superfície celular dos queratinócitos, atuando como receptores primários destes vírus. Após a ligação do vírus à estas moléculas da superfície dos queratinócitos, ocorrem alterações conformacionais que resultam na exposição da região amino terminal da proteína L2. A exposição dessa região permite a ação da furina convertase, uma enzima que cliva uma região de L2, resultando em uma segunda alteração conformacional, que expõe o sítio de ligação para um segundo co-receptor. Acredita-se que este segundo co-receptor seja a $\alpha 6$ integrina (DOORBAR *et al.*, 2012).

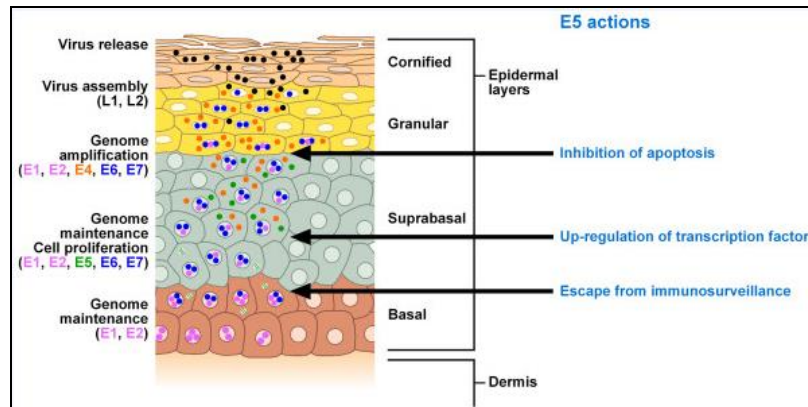
Figura 2 - Árvore filogenética mostrando as espécies dos Alpha-PVs. Em destaque os membros do Alpha-5, Alpha-6, Alpha-7 e Alpha-9, mais comumente detectado em lesões cervicais.



Fonte: Molecular Stuff, 2014.

Com isso, a entrada do genoma viral nos queratinócitos ocorre por endocitose e após esse processo, teremos uma acidificação das vesículas de endocitose, levando a desencapsidação do genoma viral e migração para o núcleo da célula, assumindo a forma episomal. Posteriormente, inicia-se o ciclo de replicação viral, com a expressão dos genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7 (COMBITA *et al.*, 2001; DOORBAR *et al.*, 2012; GIROGLOU *et al.*, 2001; JOHNSON *et al.*, 2009; SAPP e DAY, 2009; WOODMAN *et al.*, 2007) (Figura 3).

Figura 3 - Esquema demonstrando o ciclo do HPV e local de ação de suas proteínas. Cada proteína viral possui seu ciclo em determinadas camadas do epitélio, onde a oncoproteína E5 age na camada suprabasal, estando envolvida principalmente no aumento da atividade de fatores de transcrição, e conseqüentemente na amplificação dessas células.



Fonte: VENUTI *et al.*, 2011.

3.6 HPV18

Diversos estudos sugerem que determinadas linhagens do HPV18 também estão associadas com potencial oncogênico e persistência da infecção (ALTEKRUSE *et al.*, 2003; Vários dados coletados ao redor do mundo revelam que o HPV18 é o segundo genótipo mais comumente encontrado nos casos de câncer cervical, sendo mais relacionado com o adenocarcinoma do colo do útero (BESKOW *et al.*, 2005; MUÑOZ *et al.*, 2003; TESHIMA *et al.*, 1997).

Em um estudo realizado no Brasil, Villa *et al.* (2000) observaram que as linhagens B e C do HPV18 estão associados com lesões HSIL. Além disso, foi observado que a presença do polimorfismo viral N129K do oncogene E6 do HPV18 é bastante conservada dentro de variantes oncogênicas B e C. Contudo, estudos funcionais demonstraram que N129K do gene E6 do HPV18 não aumenta a capacidade de degradação da p53, uma oncoproteína capaz de regular o ciclo celular (CERQUEIRA *et al.*, 2008; DE LA CRUZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2005). No que diz respeito ao gene de L1, as alterações nucleotídicas A5503G, C5701G, C6470G, C6625G, C6842G foram observadas em dois estudos (ARIAS-PULIDO *et al.*, 2005; SHEN *et al.*, 2013). Estas variações estão perto do domínio C terminal da proteína L1, podendo afetar a resposta imunológica contra a proteína do capsídeo viral do HPV18

(ARIAS-PULIDO *et al.*, 2005; FRATI *et al.*, 2011). As alterações nucleotídicas A41G e T104C, na LCR do HPV18, aumentam a atividade do promotor p105, culminando no aumento da expressão de E6/E7 através da modulação de algumas proteínas celulares (CERQUEIRA *et al.*, 2008). Além disso, a variabilidade genética na LCR aumenta de 2,64 a 8,18 vezes a expressão dos oncogenes E6/E7 quando comparados com a sequência protótipo (SICHERO; FRANCO; VILLA, 2005).

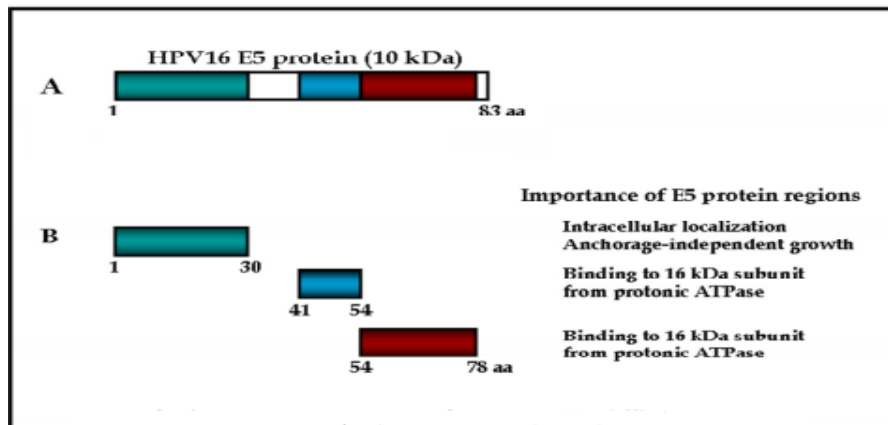
Através destas observações dos dados coletados em estudos anteriores, é possível notar que os estudos envolvendo o oncogene E5 em HPV18, ainda são escassos. Por isso, as análises da heterogeneidade deste oncogene, poderão contribuir para melhorar a compreensão dos aspectos moleculares envolvidos na carcinogênese cervical, mediado por este genótipo viral e suas variantes.

3.7 ESTRUTURA E PAPEL BIOLÓGICO DA ONCOPROTEÍNA E5

A oncoproteína E5 é uma das menores proteínas codificadas pelo genoma do HPV, cujo tamanho varia de 40 a 83 aminoácidos. É uma proteína de caráter hidrofóbico e com a capacidade de se ligar às membranas celulares, tais como o retículo endoplasmático, aparato de Golgi e membrana plasmática. Apesar de sua função na carcinogênese ainda não estar bem definida, sabe-se que está fundamentalmente envolvida neste processo (SAAVEDRA *et al.*, 2012; VENUTI *et al.*, 2011; KAVATI *et al.*, 2012).

A oncoproteína E5 do HPV16 é constituída por 3 hélices transmembranares e pequenas regiões hidrofílicas nas regiões c- terminal e n- terminal (Figura 4). A primeira região hidrofóbica de E5 é responsável pelo crescimento independente de ancoragem, e está associada à capacidade dessas células invadirem queratinócitos e a matriz extra-celular (SAAVEDRA *et al.*, 2012).

Figura 4 - Esquema da estrutura da oncoproteína E5 em HPV16. (A) Esquema da proteína E5, com 83 aminoácidos, dividida em 3 regiões hidrofóbicas; (B) A primeira região está envolvida na localização de membrana e crescimento independente de ancoragem, ao passo que a segunda e terceira regiões estão envolvidas no estímulo do crescimento celular.



Fonte: Saavedra *et al.*, 2012.

Uma particularidade desta oncoproteína E5 é de ter os seus níveis de expressão aumentados nas fases iniciais do ciclo de infecção. Ao longo do curso da carcinogênese, este gene é deletado, e os seus níveis de expressão decrescem. Assim, o seu mRNA e sua oncoproteína são encontrados em lesões cervicais de baixo grau (LSIL), pré-cancerosas e malignas causadas por infecções de HPV de alto risco, tais como o HPV 16 e 18 (VENUTI *et al.*, 2011).

Isoladamente, E5 possui baixa ação transformante, porém quando em cooperação com outras oncoproteínas virais (E6 e E7), aumenta o risco de desencadear o processo carcinogênico. Dessa forma, os vírus que contêm este gene em seu genoma, possuem um maior potencial carcinogênico e uma maior vantagem na infecção e probabilidade aumentada para a ocorrência de uma transformação oncogênica (VENUTI *et al.*, 2011; DIMAIO; PETTI, 2013).

Dentre as diversas funções da oncoproteína E5, temos a sua participação no (1) estímulo à proliferação celular e expansão dos queratinócitos infectados, (2) redução da ação dos mecanismos apoptóticos, (3) regulação e degradação de receptores celulares, (4) inibição de proteínas que regulam o ciclo celular, (5) aumento do tamanho nuclear e do conteúdo de DNA, (6) poliploidia, (7) binucleação e instabilidade cromossômica, (8) escape imunológico, (9) redução da expressão de moléculas HLA acessíveis para epítomos de HPV, (10) supressão da proteína da via de estresse do Retículo Endoplasmático (RE), a ciclo-oxigenase-2 (COX-

2), X-box binding protein (XBP-1) e a inositol-requiring enzyme-1a (IRE1 α), dentre outras importantes funções biológicas (MAUFORT *et al.*, 2010; CAMPO *et al.*, 2010; MONFRÉ, 2011; VENUTI *et al.*, 2011; DIMAIO E PETTI, 2013; SUDARSHAN *et al.*, 2010; CONDJELLA *et al.*, 2009).

3.7.1 Papel da oncoproteína E5 sobre o sistema imunológico

No sistema imunológico, a proteína E5 auxilia na evasão imune promovendo a diminuição da sinalização intracelular, através de interação com a cadeia pesada da molécula de MHC classe I, internalizando seu antígeno HLA-I no aparelho de Golgi. Outra forma importante de reter o MHC de classe I com seu respectivo HLA no aparelho de Golgi é através da alcalinização dos compartimentos endomembrana. Uma vez acumulado no complexo de Golgi, o MHC classe I não é expresso na superfície celular e, portanto, as células infectadas acabam por não ser apresentadas aos linfócitos T CD8+, e não ocorre a resposta adaptativa. (DIMAIO; PETTI, 2013; VENUTI *et al.*, 2011).

E5 não inativa todos os tipos de HLA-I: apenas inativa HLA-A e HLA-B, permitindo a expressão normal de HLA-C e HLA-E (HLA-E não desempenha função contra a infecção por HPV), a fim de evitar a ação das células NK, que costumam atacar células que não expressam MHC e HLA (VENUTI *et al.*, 2011; MONFRÉ, 2011). A inibição do HLA de classe I pode ser reversível através da administração de Interferon. Dessa forma, a fim de evitar a reativação do HLA I, as proteínas E6 e E7 são capazes de inibir o Interferon. Enquanto isso, 16E5 interfere na maturação de MHC classe II, também impedindo sua expressão na superfície celular. Porém, diferentemente do HLA I, a internalização do HLA II é irreversível (DIMAIO; PETTI, 2013; VENUTI *et al.*, 2011). E5 inibe ainda citocinas dependentes de CD1d, através do tráfico de CD1d e posterior degradação por vias proteolíticas, afetando negativamente a imunidade inata e adaptativa (VENUTI *et al.*, 2011).

3.7.2 Importância de E5 no diagnóstico e tratamento

Como visto, E5 atua em diversas etapas do processo carcinogênico, afetando e desregulando diversas moléculas, e atuando em conjunto com outras proteínas, como E6 e E7.

Além disso, E5 também se associa a proteína E6, aumentando a fragilidade dessas células e podendo formar vacúolos coilócíticos (coilócitos). Tanto os vacúolos perinucleares quanto os coilócitos são importantes características de infecção por HPV, levando ao diagnóstico da infecção (DIMAIO; PETTI, 2013).

De acordo com diversos estudos, há a possibilidade de se utilizar a E5 como alvo na terapia de câncer cervical, assim como as vias alteradas por essa proteína (VENUTI *et al.*, 2011). Em modelos animais que receberam vacinas constituídas por epítomos de E5, houve um aumento de células T CD8+, conferindo proteção contra tumores e redução do crescimento tumoral. Por se tratar de uma proteína expressa em estágios iniciais da infecção e das lesões, possui potencial terapia contra a infecção pelo HPV e lesões pré-cancerosas, prevenindo contra a progressão para o câncer invasivo (VENUTI *et al.*, 2011).

3.8 PROGRAMAS DE CONTROLE E RASTREAMENTO

Existem no Brasil diversos programas de prevenção, controle e rastreamento do câncer cervical, o que permite a conscientização e a detecção precoce de anormalidades (OLIVEIRA; MERLIN, 2010).

Atualmente, o diagnóstico convencional é o exame citopatológico, através do teste Papanicolau, recomendado pelo Ministério da Saúde e adotado em mulheres sexualmente ativas, prioritariamente entre 25 a 64 anos, sendo esta a principal estratégia dos programas de rastreamento da doença (AMARAL *et al.*, 2008).

O exame permite encontrar as lesões pré-invasivas que antecedem o câncer cervical, denominadas NICs, o que demonstra a necessidade e a importância da precocidade e exatidão do diagnóstico (STEENBERGEN *et al.*, 2005).

Apesar de estes programas auxiliarem na diminuição da incidência do câncer cervical e no diagnóstico morfocitológico, falham em relação a inconsistência na interpretação das atipias celulares correlacionadas a cada tipo de lesão, assim como, no que diz respeito a progressão das lesões. Diante destas limitações, se faz necessário o estudo de marcadores, com sensibilidade e especificidade suficientes para permitir o acompanhamento da evolução da doença (OLIVEIRA; MERLIN, 2010; AMARAL *et al.*, 2008).

3.9 TRATAMENTO

O tratamento do câncer cervical é definido de acordo com o estadiamento no qual se encontra a lesão e os aspectos físicos desta. O objetivo geral do tratamento é remover a lesão favorecendo a melhora clínica e prevenindo a transmissão do vírus. Dependendo do resultado do exame citopatológico, diversas condutas são possíveis, desde a simples repetição citopatológica em 6 meses (as lesões de baixo grau - HPV e NIC I - regredem espontaneamente em cerca de 80% das vezes) até um tratamento cirúrgico, passando pela possibilidade de resolução por meio de um tratamento clínico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

Almeida *et al.* (2006) sugerem que lesões cervicais HPV induzidas de baixo grau (HPV/NIC 1) não necessitam de propeidética e tratamentos agressivos, e orienta repetir a coleta em 6 meses. Já as mulheres com NIC 2 e 3 deveriam ser adequadamente tratadas pelo alto risco de transformação para lesão cancerosa invasiva.

Nos casos avançados, em que o tumor já atingiu estruturas adjacentes ao útero, o tratamento de eleição é a radioterapia associada à braquiterapia; a quimioterapia no câncer do colo do útero é indicada concomitante à radioterapia, como radiosensibilizante, o que permite aumentar o controle local e a sobrevida livre de doença, é realizada, também, na ocorrência de recidiva, quando não há a possibilidade da cirurgia e/ ou da radioterapia (ROCHA *et al.*, 2014).

Um dos tipos de tratamentos existentes é o tratamento clínico, onde a lesão é eliminada tanto por meios físicos como por meios químicos. O tratamento físico consiste da crioterapia e a utilização do laser de dióxido de carbono. Em relação ao tratamento químico, temo o uso da podofilina a 25% em solução alcoólica, fluoro-uracil na forma de creme a 5% e o ácido tricloroacético a 70% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

Para as mulheres que necessitam de um tratamento cirúrgico, a cirurgia de alta frequência (CAF), traz a vantagem de favorecer conservação da fertilidade, de não ser mutilante e de permitir a utilização do método Ver e Tratar, pois diagnostica e trata a lesão na mesma consulta. Outro método utilizado para o tratamento cirúrgico é o Cone a Frio que trata as lesões de alto grau (NIC II e III) e também serve como meio diagnóstico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

Por outro lado, a Histerectomia abdominal ou vaginal, torna-se um tratamento de escolha quando a mulher é diagnosticada com Microinvasão (estádio IA1) através da utilização do Cone a frio ou por alça e quando ela já têm a prole definida. Segundo o Ministério da saúde (2002), apesar da histerectomia ser o tratamento de NIC com a menor taxa de recidiva, deve-se ter em mente que existem, hoje em dia, intervenções menos mórbidas (tais como a CAF), menos custosas e que não levam a mutilações nas mulheres, tendo taxas de cura bastante aceitáveis, sendo recomendadas pela experiência internacional, e que devemos ter sempre como a primeira opção.

De acordo com Diz *et al.* (2009), as mulheres que foram submetidas a histerectomia e cujo exame anatomopatológico da peça cirúrgica demonstra presença de margens comprometidas ou exíguas, a presença de comprometimento dos linfonodos ou invasão microscópica do paramétrio são fatores de maior risco de recidiva e estas pacientes são candidatas a tratamento adjuvante com quimioterapia e radioterapia concomitantes.

Segundo o Ministério da Saúde (2002), a radioterapia é um recurso terapêutico largamente utilizado no câncer do colo do útero e que se beneficia da capacidade de penetração da radiação criada pelo bombardeamento de elétrons acelerados, ou raios gama, emitidos pelo radium ou outro material radioativo, em um alvo, reduzindo e, por vezes, eliminando o tumor. A sobrevida no estágio inicial (I e IIA) é igual entre a radioterapia ou a cirurgia, já a partir do estágio IIB, a sobrevida com a radioterapia é bem maior quando comparado aos procedimentos cirúrgicos. A vantagem da utilização da cirurgia em relação a radioterapia é que ela preserva a função dos ovários e também a elasticidade da vagina favorecendo a prática sexual.

A respeito da quimioterapia, é indicado seu uso em conjunto com a radioterapia, pois beneficia a resposta terapêutica, é um método excluído quando o carcinoma é escamoso, pode piorar o prognóstico se usada antes da radioterapia porque influencia na seleção das células com resistência a esta, mas esse procedimento for realizado anteriormente a cirurgia reduz o volume de massa cancerosa trazendo um bom resultado para a paciente.

Sobre a atividade sexual, o casal deve ser incentivado e orientado a ter uma vida sexual normal, sabendo que ainda existe preconceito sobre essa prática depois do tratamento, principalmente por parte dos esposos por medo da mulher transmitir sexualmente o câncer do colo uterino, pois não sabem que essa patologia não é transmissível. Já com relação à gestação, muitas mulheres temem que não possam engravidar após o tratamento, mas se o

câncer foi de estágio inicial, o útero foi mantido através da conização e a paciente está totalmente curada após dois anos de acompanhamento, não há nenhum problema em ter filhos.

O tratamento da mulher com câncer do colo do útero deve ser global e visar a recuperação do seu bem-estar psicossocial e de sua qualidade de vida. Como uma grande parte das mulheres atingidas por esta doença está na sua plenitude do desempenho das atividades profissionais, ela deve voltar às suas atividades profissionais, domésticas e afetivas a partir do estímulo à sua reabilitação total. Todas as mulheres com esta doença necessitam, em maior ou menor grau, de uma ajuda especializada do ponto de vista emocional, e as equipes multidisciplinares formadas por médicos, enfermeiras, psicólogos, nutricionistas e fisioterapeutas, quando trabalham de forma integrada, induzem excelentes resultados para a qualidade de vida da mulher. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

3.10 VACINAÇÃO: VACINA BIVALENTE E QUADRIVALENTE

A relação entre o HPV e o câncer do colo do útero impulsionou o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular, culminando em estratégias inovadoras na prevenção primária e secundária do câncer do colo do útero, baseada na introdução das primeiras vacinas profiláticas contra o vírus e nos testes de detecção do HPV, respectivamente (GUEDES *et al.*, 2017).

Segundo Limberger *et al.* (2012), as vacinas profiláticas evitam a infecção pelo HPV e suas doenças associadas e as terapêuticas induzem a regressão das lesões pré-cancerosas e a remissão do câncer invasivo. A vacinação é uma medida eficaz para a prevenção quando é realizada antes do início de atividade sexual devido ao fato de não ter havido exposição às cepas virais, por esse motivo a faixa etária definida alcança meninas e meninos que estão ainda passando pela puberdade.

No Brasil, foram aprovadas duas vacinas profiláticas contra o HPV, a bivalente GlaxoSmithKline® (2009) e a quadrivalente da Merck Sharp® e Dohme® (2006), esta última que protege contra os HPVs dos tipos 6, 11, 16 e 18 (LIMBERGER *et al.*, 2012).

Segundo Coelho *et al.* (2015), ambas as vacinas disponíveis para uso, bivalente e quadrivalente, são altamente imunogênicas e previnem a infecção primária contra os genótipos de HPV e o adenocarcinoma NIC 2/3. Esta última vem sendo disponibilizada pelo

MS nos postos de vacinação desde 2014, inicialmente, para as meninas de 11 a 13 anos (GUEDES *et al.*, 2017). Porém desta data até os dias de hoje várias mudanças ocorreram, não só as meninas estão sendo imunizadas, mas também os meninos na faixa etária de 12 a 13 anos. No novo esquema vacinal de 2017, as meninas de 9 a 14 anos de idade devem receber a vacina contra esse vírus e devem ser feitas apenas duas doses com intervalo de 06 meses entre elas. E se o indivíduo for portador do vírus da imunodeficiência humana (HIV) é necessário a imunização na faixa etária de 14 a 26 anos.

Nesse contexto, a se considerar a prevalência da infecção pelo HPV na adolescência, a incidência e a morbimortalidade do câncer de colo de útero, a relação risco/benefício da vacina revela-se completamente aceitável e corrobora a sua boa tolerabilidade e segurança proposta por outros autores, o que contribui para a eficácia das políticas públicas de saúde (COELHO *et al.*, 2015).

Porém percebe-se que grande parte da população, principalmente os pais ou responsáveis pelos adolescentes, não sentem total confiança e não aderem a vacinação contra o HPV já que não a consideram como uma vacina de rotina e outra situação que dificulta a imunização efetiva contra essas patologias é o fato de os adolescentes frequentarem poucas vezes as Unidades Básicas de Saúde (UBS).

A alta imunogenicidade e o perfil de segurança da vacina quadrivalente, determinam que seu uso apresente relação risco/benefício vantajosa e favorável como estratégia de prevenção dessa infecção viral e do câncer de colo uterino, o que suscita o persistente encorajamento, por parte dos profissionais de saúde, da prática da vacinação contra o HPV na população de risco (COELHO *et al.*, 2015).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COLETA E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DO GENE E5 DO HPV18

Para a coleta das sequências gênicas, foi utilizado o banco de dados genômicos do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e do *Papillomavirus Genome Database* (PaVE), ambos de domínio público.

As sequências coletadas foram: AY262282 (sequência de referência, A1), EF202146 (A2), EF202147 (A3), EF202151 (A4), GQ180787 (A5), EF202155 (B1), KC470225 (B2), EF202152 (B3), KC470229 (C). As sequências de referências citadas, bem como a sua padronização filogenética, estão disponíveis em Burk *et al.*, 2013.

Posteriormente, a comparação das sequências foi realizada usando o programa MEGA6 e os alinhamentos de várias sequências do DNA do gene E5 do HPV18 foi realizada utilizando o programa CLUSTALW (TAMURA *et al.*, 2011). Esta análise permite a identificação da variabilidade genética do gene. Em seguida, com o uso do pacote do MEGA6, foi analisado a sequência de aminoácidos da proteína E5.

4.2 BANCO DE DADOS DE ANÁLISE DE SEQUÊNCIA DE PROTEÍNAS– PSIPRED

Após a detecção das regiões polimórficas do gene E5 e a identificação da sequência aminoácidos da proteína E5, das amostras variantes do HPV 18, foi utilizado o servidor Psipred, para a predição da sua estrutura secundária. O servidor Psipred incorpora diferentes métodos de análise (PSIPRED, GenTHREADER e MEMSAT 2), e de predição estrutural da sequência de aminoácidos de uma proteína (MCGUFFIN *et al.*, 2000).

4.3 BANCO DE DADOS DE EPÍTOPOS IMUNOGÊNICOS E RECURSO DE ANÁLISE (IEDB)

Para a identificação de possíveis epítomos imunogênicos, foi utilizado o servidor online *Immune Epitope Database and Analysis Resource* (IEDB) (<http://www.iedb.org/>), o qual representa uma plataforma *on line* que reúne diferentes métodos de análise e identificação de epítomos imunogênicos.

Foi utilizado a sequência de referência AY262282 para o mapeamento dos potenciais epítomos imunogênicos com moléculas pertencentes aos alelos de MHC-I. Para isso, foi adotado os parâmetros padrões estabelecidos pelo próprio servidor.

Para o MHC-I, a análise dos epítomos seguiu os padrões sugeridos pelo servidor, a exemplo da escolha do set de alelos mais frequentes na população mundial, comprimento da sequência do epítomo (que variou entre 9-10mer), classificação dos epítomos de acordo com o percentile rank < 0.5 e immunogenicity score > 0.5 .

5 RESULTADOS

5.1 VARIABILIDADE DO GENE E5 DO HPV18

O oncogene E5 do HPV18 é composto por um total de 221 nucleotídeos, tendo o seu início na posição 3936 até a posição 4157 no genoma do HPV18. Sua proteína é de natureza hidrofóbica e constituída por um total de 73 aminoácidos.

O emprego do programa CLUSTALW, ferramenta presente no pacote MEGA6, permitiu elencar um total de nove substituições de nucleotídeos no gene E5 das amostras variantes depositadas nos bancos de dados do NCBI e do PaVE. Dentre as substituições de nucleotídeos identificadas, temos 04 não sinônimas e 05 sinônimas, e as variantes EF202152, EF202155 e KC470225 foram as mais polimórficas. No entanto, as variantes KC470225, EF202155 e EF202152 foram as que apresentaram uma maior quantidade de aminoácidos alterados nas suas composições estruturais (Tabela 2).

Tabela 2 - Variações nucleotídicas do oncogene E5 do HPV18. Nucleotídeos conservados em relação a sequência de referência AY262282 estão marcados com asterisco (*). L: Leu (Leucina); V: Val (Valina); S: Ser (Serina) I: Ile (Isoleucina); P: Pro (Prolina); F: Fen (Fenilalanina); M: Met (Metionina); T: Thr (Treonina). (**) Sequência de referência do oncogene E5 do HPV18.

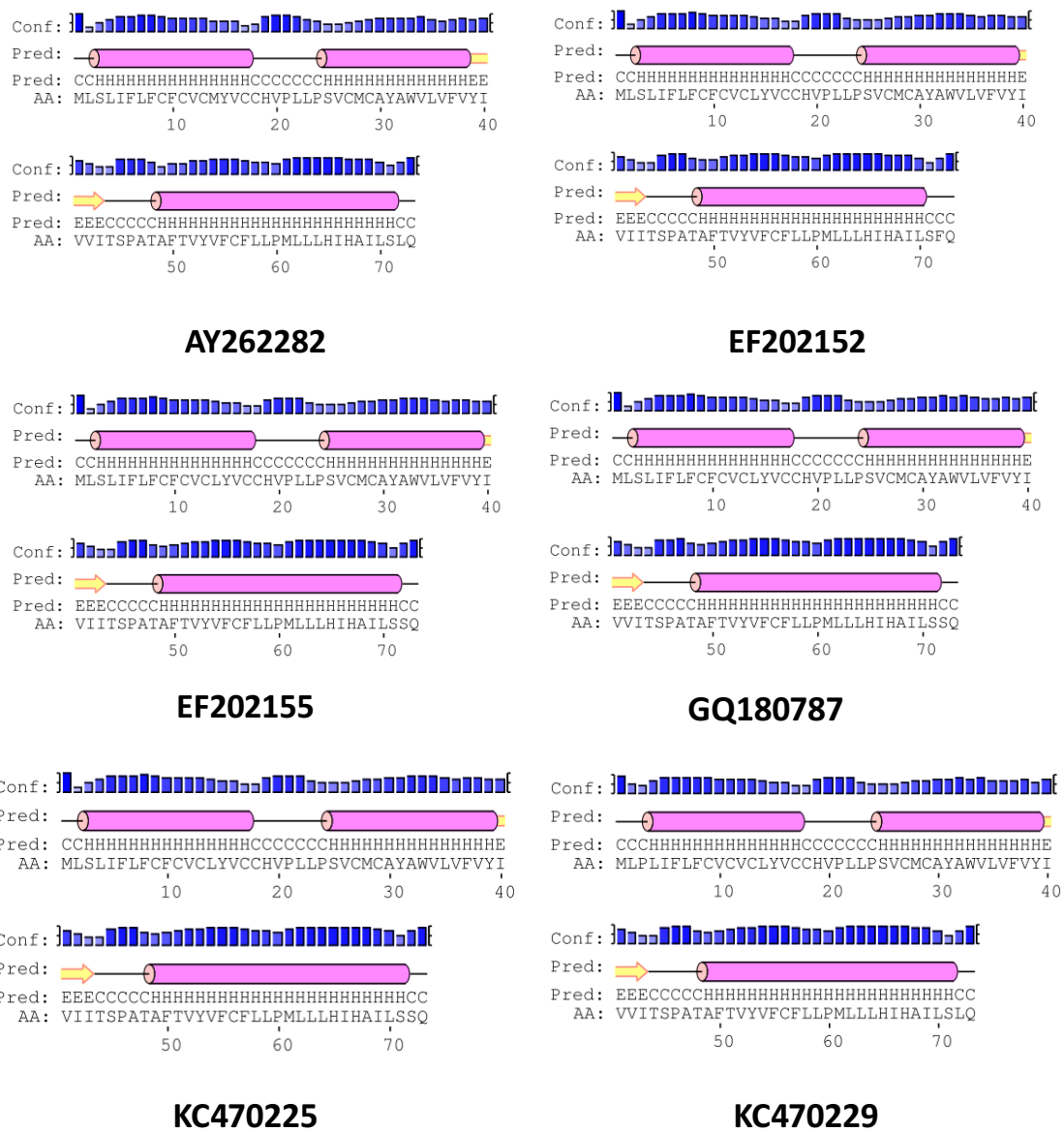
Isolados	Posição das substituições dos nucleotídeos de 18E5								
	3942	3963	3975	4059	4085	4119	4150	4151	4154
**AY262282	T	T	A	G	C	T	T	A	G
EF202146	*	*	*	*	*	*	*	*	*
EF202147	*	*	*	*	*	*	*	*	*
EF202151	*	*	*	*	*	*	*	*	*
GQ180787	*	*	T	*	T	*	C	*	*
EF202155	*	*	T	A	*	C	C	*	A
KC470225	*	*	T	A	*	C	C	*	A
EF202152	*	*	T	A	*	C	*	C	A
KC470229	C	G	T	*	*	*	*	*	*
Posição de alteração	03	10	14	42	51	61	71	71	72
Referencia	S	F	M	V	T	M	S	S	L
Aminoácidos alterados	P	V	L	I	T	M	S	S	S

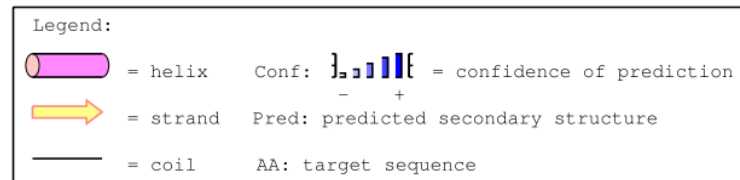
Fonte: dados da pesquisa, 2018.

5.2 ESTRUTURA SECUNDÁRIA DA ONCOPROTEÍNA E5

Os resultados demonstram que, estruturalmente, a oncoproteína E5 das variantes do HPV18 estudadas, apresentavam mudanças na sua estrutura proteica, quando comparadas à sequência de referência AY262282 (Figura 5).

Figura 5 - Estrutura secundária das variantes da oncoproteína E5 do HPV18. Predição da estrutura secundária pelo software *on line* PSIPRED.





Fonte: dados da pesquisa, 2018.

Nas amostras contendo as substituições não sinônimas, apenas a sequência de KC470229 apresentou uma discreta modificação na posição 03, porção N-termina da proteína. As demais substituições não sinônimas mantiveram os aminoácidos com as mesmas características esteroquímicas, o que permitiu proporcionar uma maior conservação do arcabouço da proteína.

Em relação às substituições sinônimas, também observamos a manutenção da hidrofobicidade da proteína e na sua estrutura, visto a manutenção dos mesmos aminoácidos nos sítios de mutação dos códons.

5.3 MAPEAMENTO DE EPÍTOPOS IMUNOGÊNICOS

No presente estudo, realizamos uma análise global dos principais epítomos formados pelas variantes do oncogene E5 do HPV18. De acordo com o set de alelos padrão, que corresponde aos principais alelos distribuídos mundialmente, pudemos verificar o mapeamento de vários epítomos pertencentes às diversas moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC-I).

Observamos os principais alelos, preferencialmente utilizados pela oncoproteína 18E5, foram os da classe HLA-A*02:06 e HLA-A*26:01. Este resultado foi corroborado entre a amostra de referência AY262282 e as amostras variantes EF202146, EF202147, EF202151, GQ180787, EF202155, KC470225, EF202152, KC470229 (Tabela 3). Os demais alelos pertencentes às HLA-B e HLA-C também formaram epítomos imunogênicos, embora alguns dos valores de percentil rak e o immunogenicity score observados, estivessem fora dos padrões estabelecidos pelo IEDB para considerarmos um bom epítomo imunogênico.

Outro aspecto relevante observado neste trabalho foi que alguns epítomos foram formado em regiões que apresentavam as substituições nucleotídicas, o que sugere que mesmo não havendo uma mudança estrutural da proteína, a substituição de nucleotídeos e, por

consequente modificação do códon, podem atuar como um mecanismo de seleção preferencial de códons para otimizar a síntese proteica.

Tabela 3 - Predição de potenciais epítomos MHC-I pela oncoproteína E5. Os melhores epítomos estão seleccionados na tabela. A análise dos epítomos gerados pelas variantes foi realizada utilizando-se como referência a amostra. O critério para elencar os melhores epítomos foi: percentil rank < 0.5 e o valor de imunogenicidade > 0.5.

Isolado	Alelo	Início	Fim	Tamanh o	Peptídeo	Método adotado	Percentil rank	Valor de Imunogenicidade
AY262282	HLA-A*02:06	57	66	10	FLLPMLLLHI	Consensus (ann/smm)	0.15	0.8709
GQ180787	HLA-A*02:06	57	66	10	FLLPMLLLHI	Consensus (ann/smm)	0.15	0.94092
GQ180787	HLA-A*26:01	53	61	09	YVFCFLLPM	Consensus (ann/smm)	0.2	0.94092
EF202155	HLA-A*02:06	57	66	10	FLLPMLLLHI	Consensus (ann/smm)	0.15	1.03032
EF202155	HLA-A*26:01	53	61	09	YVFCFLLPM	Consensus (ann/smm)	0.2	1.03032
EF202155	HLA-A*02:01	06	14	09	FLFCFCVCL	Consensus (ann/comblib_sidney2008/ smm)	0.2	1.03032
KC470225	HLA-A*02:06	57	66	10	FLLPMLLLHI	Consensus (ann/smm)	0.15	1.03032
KC470225	HLA-A*26:01	53	61	09	YVFCFLLPM	Consensus (ann/smm)	0.2	1.03032
KC470225	HLA-A*02:01	06	14	09	FLFCFCVCL	Consensus (ann/comblib_sidney2008/ smm)	0.2	1.03032
EF202152	HLA-A*02:06	57	66	10	FLLPMLLLHI	Consensus (ann/smm)	0.15	1.19538
EF202152	HLA-A*26:01	53	61	09	YVFCFLLPM	Consensus (ann/smm)	0.2	1.19538
EF202152	HLA-A*02:01	06	14	09	FLFCFCVCL	Consensus (ann/comblib_sidney2008/ smm)	0.2	1.19538
KC470229	HLA-A*02:06	57	66	10	FLLPMLLLHI	Consensus (ann/smm)	0.15	1.0074
KC470229	HLA-A*26:01	53	61	09	YVFCFLLPM	Consensus (ann/smm)	0.2	1.0074
KC470229	HLA-A*02:01	06	14	09	FLFCFCVCL	Consensus (ann/comblib_sidney2008/ smm)	0.2	1.0074

Fonte: dados da pesquisa, 2018.

6 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, a disponibilidade de sequências do genoma completo de vários organismos aumentou grandiosamente, devido ao surgimento dos métodos de sequenciamento. Por exemplo, houve um aumento de aproximadamente 21% no número de nucleotídeos virais sequenciados e depositados no GenBank, e um aumento anual global de 43,6%, de depósitos de sequência de nucleotídeos de vírus, em todo o mundo, no ano de 2014 (BENSON et al., 2015).

Muitas das proteínas, geradas a partir dos genomas sequenciados, são anotadas como proteínas hipotéticas e que não tem uma função bem caracterizada. Então, uma melhor compreensão do genoma e das proteínas por ele sintetizadas, torna-se extremamente útil para o entendimento do possível papel biológico exercido por essas proteínas (IJAQ et al., 2015).

Neste estudo, as sequências que foram analisadas da proteína 18E5, foram derivadas sequencias genômicas depositadas no banco de dados do NCBI e do PaVE. Estas sequências foram analisadas com o uso dos softwares MEGA6, PsiPred e o IEDB, com o objetivo de investigar a variabilidade do gene 18E5, sua estrutura secundária e mapear os possíveis epítomos imunogênicos.

No que concerne ao estudo da variabilidade genética do oncogene E5 nos diversos tipos de HPVs, muitos estudos têm se concentrado na análise genética da região L1, LCR e na ORF dos genes E6 e E7 e na variação da sequência entre os tipos de HPV, como regiões que apresentam uma enorme variabilidade (BERNARD et al., 2006; SICHERO e VILLA, 2006; SICHERO et al., 2007).

As variantes dos genes E6 e E7 em HPV16, por sua vez, podem potencializar o efeito da infecção, culminando, por exemplo, com a inativação de importantes proteínas celulares, a exemplo de p53 e pRb, o que aumenta os riscos de desenvolvimento de uma neoplasia cervical (KAST et al., 1994). Com isso, alguns estudos epidemiológicos têm mostrado uma associação entre a progressão das lesões de alto grau que são precursoras dos tumores invasivos, com o acúmulo de variantes de HPV16 (LONDESBOROUGH et al., 1996; ZEHBE et al., 2001).

Em HPV18, é possível que estas variações na sequência da proteína possam afetar o potencial carcinogênico deste vírus, modificando a atividade transformante das células

infectadas. Embora os estudos sobre os oncogenes E6 e E7 sejam abundantes e, em especial, sobre o HPV16, é essencial ampliar o conhecimento sobre a biologia do oncogene E5 do HPV18, pelo fato de ser um dos primeiros genes que atuam nas fases iniciais da carcinogênese, além da sua capacidade de potencializar o papel exercido pelos oncogenes E6 e E7 nas etapas de malignização.

Em relação aos estudos sobre a estrutura secundária da proteína, a utilização do *software* PsiPred, que incorpora, numa única ferramenta, três diferentes métodos para análise e predição da estrutura secundária das proteínas (GenTHREADER, MEMSAT 2 e versões anteriores do PSIPRED) (JONES, 1999a; JONES, 1999b), tem sido mais conveniente, por apresentar uma maior acurácia dos resultados obtidos com a análise das sequências das variantes estudadas, o que permitiu gerar dados mais robustos sobre a estrutura e a topologia destas proteínas transmembranares.

O uso desta ferramenta, como um importante veículo de análise da estrutura proteica, pode ser observado, na análise da estrutura secundária das isoformas das oncoproteínas b2a2 e b3a2, duas p210 BCR-ABL, relacionadas à translocação entre os cromossomos 9 e 22, que gera um isocromossomo, manifestando o quadro de Leucemia Mielóide Crônica (HAI et al., 2014). Os resultados obtidos mostraram uma estrutura secundária com variações nos resíduos de aminoácidos entre as duas isoformas estudadas, e que estas isoformas podem interferir nos mecanismos de regulação da atividade tirosina quinase da proteína ABL. Dessa forma, ambas as proteínas p210 BCR-ABL podem causar um efeito pleiotrópico em várias vias de transdução de sinais que afetam a sobrevivência celular, a progressão da doença e a estabilidade do genoma (HAI et al., 2014).

Estes resultados observados por Hai et al., (2014), reforçam a importância na análise *in silico* e a necessidade de mais estudos sobre o papel biológico da oncoproteína 18E5, correlacionando-o com possíveis efeitos biológicos exercidos no tecido-alvo infectado, visto que mudanças conformacionais em sua estrutura, poderão sinalizar para o surgimento de múltiplos epítomos imunogênicos, como anteriormente discutido.

Sobre o papel destas oncoproteínas sobre o sistema imune, as estruturas moleculares reconhecidas pelos receptores do sistema imune são denominadas de epítomos. Assim, os epítomos que se ligam às moléculas da classe I e da classe II do MHC, são tipicamente, reconhecidos por células T CD8⁺ e CD4⁺, respectivamente. A afinidade com a qual um epítomo se liga a uma molécula do MHC, simboliza uma importante via na determinação da

imunogenicidade, e as interações de alta afinidade entre o MHC/epítipo tendem a estar associada a uma maior resposta imunitária (YEWDELL e BENNINK, 1999; YEWDELL, 2006; ASSARSSON et al., 2007).

Para a predição dos epítipos, o programa IEDB realizou uma análise *in silico* da estrutura da proteína E5 do HPV18. Foram observadas várias regiões da proteína que apresentam interações com essas moléculas, o que pode simbolizar uma forma de atuação do sistema imunológico a fim de evitar uma evasão do vírus. Essa predição computacional tem sido amplamente utilizada na identificação de epítipos imunogênicos, por exemplo, no estudo do desenvolvimento de estratégias vacinais, durante muitos anos (DE GROOT et al., 2001; MOISE et al., 2009; NIELSEN et al., 2010; LARSEN et al., 2010).

A relevância destes achados, que envolve um estudo *in silico* da oncoproteína 18E5, está no aumento das informações acerca do comportamento do sistema imunológico dos seres humanos em relação à biologia da infecção viral, nos estágios iniciais ou mais avançados das lesões, que podem culminar com o desenvolvimento do câncer cervical, através da evasão viral do sistema imunológico.

A complexidade associada aos diversos modos de ação da oncoproteína E5 das variantes de HPV18 são tão diversas, que estas análises podem contribuir, por exemplo, para o desenvolvimento de estratégias vacinais, no combate à progressão e ao desenvolvimento do câncer cervical, uma vez que, na literatura, dados *in silico* sobre o gene E5 e sua estrutura proteica, ainda são escassos.

7. CONCLUSÕES

- Foram identificadas 09 substituições de nucleotídeos, que podem estar relacionadas a um aumento na persistência da infecção;
- Estas alterações na sequência dos nucleotídeos refletem na mudança de códons na sequência do mRNA. Assim, as variantes do gene E5 podem utilizar mecanismos distintos de otimização da tradução (síntese protéica), diferindo o potencial de infectividade entre as variantes do HPV18;
- O levantamento bibliográfico mostrou a relevância do estudo deste oncogene do HPV18, visto que a maioria do referencial teórico atual aborda os oncogenes E6 e E7, em especial sobre o HPV16;
- O HPV18 é o segundo genótipo mais amplamente distribuído no Brasil e em diversos países do mundo, ressaltando a importância de sua investigação;
- A oncoproteína E5 apresentou discretas mudanças estruturais, o que parece se tratar de um mecanismo evolutivo de conservação de sua estrutura secundária, o que pode estar relacionado à sua participação nas fases iniciais do ciclo carcinogênico;
- Foi possível mapear epítomos imunogênicos com as moléculas da classe HLA-A, que corresponde ao MHC-I;
- A utilização das ferramentas computacionais para a geração de dados *in silico*, ajudam, por exemplo, na predição de epítomos imunogênicos, o que é de grande importância na otimização de técnicas moleculares, normalmente de alto custo e com uma grande demanda de tempo. Com isso, estas ferramentas auxiliaram na geração de dados para ampliar a compreensão da biologia da infecção pelo HPV18.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIDÉ, S. et al. Neoplasia Intraepitelial Cervical. **DST - J bras Doenças Sex Transm.** Niterói, v. 21, n.4, p. 166-170, Setembro, 2009. Disponível em: <<http://www.dst.uff.br/revista21-4-2009/3-Neoplasia%20Intraepitelial.pdf>>. Acesso em: 06 de Agosto de 2017.
- ALMEIDA, A. C. G. et al. A correlação do câncer do colo uterino com o papilomavirus humano. **Revista APS**, Londrina, v. 9, n. 2, p. 128-135, jul./dez. 2006. Disponível em: <<http://www.ufjf.br/nates/files/2009/12/correlacao.pdf>> Acesso em: 03 de Agosto de 2017.
- ALTEKRUSE, S. F. et al. Comparison of human papillomavirus genotypes, sexual, and reproductive risk factors of cervical adenocarcinoma and squamous cell carcinoma: Northeastern United States. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 188, n. 3, p. 657–663, mar. 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12634637>> Acesso em: 12 de Dezembro de 2017.
- ARIAS-PULIDO, H. et al. Human papillomavirus type 18 variant lineages in United States populations characterized by sequence analysis of LCR-E6, E2, and L1 regions. **Virology**, v. 338, n. 1, p. 22–34, 20 jul. 2005. Disponível em: <<http://jvi.asm.org/content/early/2015/08/07/JVI.01747-15.full.pdf>> Acesso em: 12 de Dezembro de 2017.
- ASSARSSON, E. et al. A quantitative analysis of the variables affecting the repertoire of T cell specificities recognized after vaccinia virus infection. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 12, p. 7890-7901, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17548627>> Acesso em: 09 de Novembro de 2017.
- BARBOSA, I. R. et al. Desigualdades regionais na mortalidade por câncer de colo de útero no Brasil: tendências e projeções até o ano 2030. **Ciênc. Saúde coletiva**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 1, p. 253-262, Jan. 2016. Disponível em: <http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232016000100253&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 31 de Julho 2017.
- BENSON, D. A. et al. GenBank. **Nucleic acids research**, v. 43, n. Database issue, p. D30, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3245039/>> Acesso em: 09 de Novembro de 2017.
- BERNARD, H. U. et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**, v. 401, n. 1, p. 70–79, 25 maio 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3400342/>> Acesso em: 09 de Novembro de 2017.
- BERNARD, H. U. et al. Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. **International journal of cancer**, v. 118, n. 5, p. 1071-1076, 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16331617>> Acesso em: 12 de Dezembro de 2017.

BESKOW, A. H. et al. Interaction of host and viral risk factors for development of cervical carcinoma in situ. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, v. 117, n. 4, p. 690–692, 20 nov. 2005. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15929080>> Acesso em: 21 de Novembro de 2017.

BOSCH FX, M. N. The viral etiology of cervical cancer. *Virus Res.* V. 89, n. 2, p. 183-90, 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12445658>> Acesso em 21 de Novembro de 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Controle dos cânceres do colo do útero e da mama.** 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2013. Disponível em: <

http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/control_canceres_colo_uter_2013.pdf> Acesso em: 06 de Setembro de 2017.

BRASIL, Ministério da Saúde. Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Divisão de Detecção Precoce e Apoio à Organização de Rede. – 2. ed. **rev. atual.** – Rio de Janeiro: INCA, 2016. Disponível em: <

<http://colposcopia.org.br/files/consensos/diretrizesparaorastreamentodocancerdocolodoutero2016corrigido-1448538996.pdf>> Acesso em: 06 de Setembro de 2017.

BURK, R. D. et al. Human papillomavirus genome variants. *Virology*, v. 445, n. 1-2, p. 232–243, out. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23998342>> Acesso em: 06 de Setembro de 2017.

BURRONI, E. et al. Codon 72 polymorphism of p53 and HPV type 16 E6 variants as risk factors for patients with squamous epithelial lesion of the uterine cervix. *Journal of medical virology*, v. 85, n. 1, p. 83–90, jan. 2013. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23124863>> Acesso em: 12 de Dezembro de 2017.

CAMPO, M. et al. HPV-16 E5 down-regulates expression of surface HLA class I and reduces recognition by CD8 T cells. *Virology*, v. 407, n. 1, p. 137-142, 2010. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20813390>> Acesso em: 12 de Dezembro de 2017.

CERQUEIRA, D. M. et al. New variants of human papillomavirus type 18 identified in central Brazil. *Virus Genes*, v. 37, n. 2, p. 282–287, 2008. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18663566>> Acesso em: 09 de Novembro de 2017.

CHANG, Y. J. et al. Unique variants of human papillomavirus genotypes 52 and 58 and risk of cervical neoplasia. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, v. 129, n. 4, p. 965–973, 2011. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20949622>> Acesso em: 05 de Outubro de 2017.

CHEN, Z. et al. Evolution and taxonomic classification of human papillomavirus 16 (HPV16)-related variant genomes: HPV31, HPV33, HPV35, HPV52, HPV58 and HPV67. *PloS One*, v. 6, n. 5, p. e20183, 2011. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21673791>> Acesso em: 05 de Outubro de 2017.

CLIFFORD, G. M. et al. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. **Br J Cancer**. v. 89, n. 1, p. 101-5, 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12838308>> Acesso em: 02 de Agosto de 2017.

COELHO, P. L. S et al. Segurança da vacina papillomavirus humano 6, 11, 16 e 18 (recombinante): revisão sistemática e metanálise. **Rev. paul. pediatr.**, São Paulo , v. 33, n. 4, p. 474-482, Dec. 2015 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-05822015000400017&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 02 de Agosto de 2017.

COMBITA, A. L. et al. Gene transfer using human papillomavirus pseudovirions varies according to virus genotype and requires cell surface heparan sulfate. **FEMS microbiology letters**, v. 204, n. 1, p. 183–188, 16 out. 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11682199>> Acesso em: 12 de Dezembro de 2017.

CORNET, I. et al. Human papillomavirus type 16 E6 variants in France and risk of viral persistence. **Infectious Agents and Cancer**, v. 8, n. 1, p. 4, 23 jan. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3562255/>> Acesso em: 15 de Janeiro de 2018.

DE FREITAS, A. C. et al. Susceptibility to cervical cancer: An overview. **Gynecologic Oncology**, 4 abr. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22484226>> Acesso em: 15 de Janeiro de 2018.

DE GROOT, A. S. et al. From genome to vaccine: in silico predictions, ex vivo verification. **Vaccine**, v. 19, n. 31, p. 4385-4395, 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11483263>> Acesso em: 02 de Fevereiro de 2018.

DE LA CRUZ-HERNÁNDEZ, E. et al. Differential splicing of E6 within human papillomavirus type 18 variants and functional consequences. **Journal of General Virology**, v. 86, n. 9, p. 2459 –2468, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16099904>> Acesso em: 02 de Fevereiro de 2018.

DE SANJOSE, S. et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. **The Lancet Oncology**, v. 11, n. 11, p. 1048–1056, nov. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20952254>> Acesso em: 15 de Dezembro de 2017.

DE VILLIERS, E. M. et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17–27, 20 jun. 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15183049>> Acesso em: 09 de Novembro de 2017.

DIMAIO, D. et al. The E5 proteins. **Virology**, v. 445, p. 99 – 114, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3772959/>> Acesso em: 09 de Novembro de 2017.

DIZ, M. D. P. E. et al. Câncer de colo uterino – fatores de risco, prevenção, diagnóstico e tratamento. **Rev Med**, São Paulo, v. 88, n. 1, p. 7-15, Jan./Mar. 2009. Disponível em: <

<http://www.revistas.usp.br/revistadc/article/viewFile/42183/45856>> Acesso em: 03 de Agosto de 2017.

DOORBAR, J. et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. **Vaccine**, v. 30, n. 5, p. F55–70, 20 nov. 2012. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23199966>> Acesso em: 02 de Fevereiro de 2018.

FAVRE M. et al. Human papillomaviruses: general features. **Clin Dermatol**, v. 15, n. 2, p. 181-98, 1997. Disponível em: <[http://www.cidjournal.com/article/S0738-081X\(97\)00008-4/pdf](http://www.cidjournal.com/article/S0738-081X(97)00008-4/pdf)> Acesso em: 02 de Fevereiro de 2018

FRAGA, A. A. C. et al. Papilomavírus humano e carcinogênese: uma abordagem molecular da oncogênese viral. **Unimontes Científica**, v.12, p. 69-76, 2010. Disponível em: <<http://ruc.unimontes.br/index.php/unicientifica/article/download/245/237>> Acesso em: 02 de Fevereiro de 2018

FRATI, E. et al. Genetic variability in the major capsid L1 protein of human papillomavirus type 16 (HPV-16) and 18 (HPV-18). **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 11, n. 8, p. 2119–2124, dez. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27070907>> Acesso em: 20 de Fevereiro de 2018,

GIROGLOU, T. et al. Human Papillomavirus Infection Requires Cell Surface Heparan Sulfate. **Journal of Virology**, v. 75, n. 3, p. 1565–1570, 1 fev. 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11152531>> Acesso em: 20 de Fevereiro de 2018

GUEDES, M. C. R. et al. A vacina do papilomavírus humano e o câncer do colo do útero: uma reflexão. **Rev enferm UFPE on line**, Recife, v. 11, n. 1, p. 224-231, Janeiro. 2017.

Disponível em: <

http://www.revista.ufpe.br/revistaenfermagem/index.php/revista/article/view/10450/pdf_2182> Acesso em: 02 de Agosto de 2017.

HAI, A. et al. Differences in structural elements of Bcr-Abl oncoprotein isoforms in Chronic Myelogenous Leukemia. **Bioinformatics**, v. 10, n. 3, p. 108, 2014. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24748748>> Acesso em: 02 de Fevereiro de 2018.

HANG et al. Functional effects of sequence variations in the E6 and E2 genes of Human Papillomavirus 16 European and Asian Variants. **Journal of Medical virology**, p. 618 – 626, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24150786>> Acesso em: 20 de Fevereiro de 2018.

HINO, P. et al. Conhecimento de graduandos em enfermagem sobre a vacina contra o papilomavírus humano*. **Rev. Rene**, São Paulo, v. 17, n. 5, p. 586-592, Set./Out. 2016.

Disponível em: < [http://pesquisa.bvsalud.org/brasil/resource/pt/biblio-](http://pesquisa.bvsalud.org/brasil/resource/pt/biblio-835669#fulltext_urls_biblio-835669)

[835669#fulltext_urls_biblio-835669](http://pesquisa.bvsalud.org/brasil/resource/pt/biblio-835669#fulltext_urls_biblio-835669)> Acesso em 02 de Agosto de 2017.

IJAQ, J. et al. Annotation and curation of uncharacterized proteins-challenges. **Frontiers in genetics**, v. 6, p. 119, 2015. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24150786>> Acesso em: 09 de Novembro de 2017.

JOHNSON, K. M. et al. Role of heparan sulfate in attachment to and infection of the murine female genital tract by human papillomavirus. **Journal of virology**, v. 83, n. 5, p. 2067–2074, mar. 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19073722>> Acesso em: 02 de Fevereiro de 2018.

JONES, D. T. GenTHREADER: an efficient and reliable protein fold recognition method for genomic sequences. **Journal of molecular biology**, v. 287, n. 4, p. 797-815, 1999a.

Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10191147>> Acesso em: 02 de Fevereiro de 2018.

JONES, D. T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. **Journal of molecular biology**, v. 292, n. 2, p. 195-202, 1999b. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10493868>> Acesso em: 09 de Novembro de 2017.

KALANTARI, M. et al. Recombination of human papillomavirus-16 and host DNA in exfoliated cervical cells: a pilot study of L1 gene 50 methylation and chromosomal integration as biomarkers of carcinogenic progression. **J Med Virol**, v. 82, n. 2, p. 311-20, 2010.

Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20029805>> Acesso em: 20 de Fevereiro de 2018.

KAST, W. M. et al. Role of HLA-A motifs in identification of potential CTL epitopes in human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins. **The Journal of Immunology**, v. 152, n. 8, p. 3904-3912, 1994. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7511661>>

Acesso em: 09 de Novembro de 2017.

KAVATI, E. A. Interação de oncoproteínas virais E6 e E7 de HPV 16/18 com alvos celulares potenciais para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas. **Dissertação de mestrado**,

Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/87/87131/tde-26112012-103224/en.php>>

Acesso em: 09 de Novembro de 2017.

LARSEN, M. V. et al. Identification of CD8+ T cell epitopes in the West Nile virus

polyprotein by reverse-immunology using NetCTL. **PLoS One**, v. 5, n. 9, p. e12697, 2010.

Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0012697>>

Acesso em: 20 de Fevereiro de 2018.

LIMBERGER, A. et al. Aspectos imunológicos da infecção pelo vírus do papiloma humano (HPV). **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 11-122, Jan./Jun. 2012. Disponível em:

<<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/seminabio/article/download/9917/11075>> Acesso em: 02 de Agosto de 2017.

LI, N. et al. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication.

International Journal of Cancer, v. 128, n. 4, p. 927–935, 15 fev. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20473886>> Acesso em: 20 de Fevereiro de 2018.

LONDESBOROUGH, P. et al. Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities. **International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer**, v. 69, n. 5, p. 364–368, 21 out. 1996. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8900368>> Acesso em: 02 de Agosto de 2017.

MAUFORT, J. P. et al. A Role for HPV 16 E5 in Cervical Carcinogenesis. **Cancer Research**, v. 70, n. 7, p. 2924–2931, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2848882/>> Acesso em: 02 de Agosto de 2017.

MCGUFFIN, L. J. et al. The PSIPRED protein structure prediction server. **Bioinformatics**, v. 16, n. 4, p. 404–405, 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10869041>> Acesso em 03 de Setembro de 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa 2016**: incidência de câncer no Brasil. INCA, Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/bvscontrolecancer/publicacoes/edicao/Estimativa_2016.pdf> Acesso em 03 de Setembro de 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer (Brasil). **Falando sobre câncer do colo do útero**. Rio de Janeiro: INCA; 2002. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/falando_cancer_colo_uterio.pdf> Acesso em 03 de Setembro de 2017.

MOISE, L. et al. In silico-accelerated identification of conserved and immunogenic variola/vaccinia T-cell epitopes. **Vaccine**, v. 27, n. 46, p. 6471–6479, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19559119>> Acesso em 29 de Outubro de 2017.

MONFRÉ, E. R. M. Avaliação dos Níveis de Citocinas e HLA-G Solúvel em linhagens Celulares Tumoriais de Colo Uterino tratadas com Alcalóides de *Pterogyne nitens*. **Dissertação de mestrado**, Faculdade de Ciências farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/89136>> Acesso em 29 de Outubro de 2017.

MUÑOZ, N. et al. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**, v.24, n. 3 (Suppl), p.s1-10, ago. 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16949995>> Acesso em: 31 de Julho de 2017.

MUÑOZ, N. et al. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 6, p. 518–527, 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12571259>> Acesso em 29 de Outubro de 2017.

NIELSEN, M. et al. MHC class II epitope predictive algorithms. **Immunology**, v. 130, n. 3, p. 319-328, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2913211/>> Acesso em: 31 de Julho de 2017.

OLIVEIRA, M. I. A. et al. A proteína p16 é um novo marcador para progressão neoplásica no colo uterino? **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 42, n. 3, p. 181-185, 2010. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Mauren_Anghebem-Oliveira/publication/260833892_A_PROTEINA_P16_E_UM_NOVO_MARCADOR_PARA_PROGRESSAO_NEOPLASICA_NO_COLO_UTERINO/links/55c4c6d608aebc967df37f08/A-PROTEINA-P16-E-UM-NOVO-MARCADOR-PARA-PROGRESSAO-NEOPLASICA-NO-COLO-UTERINO.pdf> Acesso em 03 de Setembro de 2017.

QUEIROZ, A. M. A. et al. O papiloma vírus humano (HPV) em mulheres atendidas pelo SUS, na cidade de Patos de Minas – MG. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 39, n. 2, p. 151- 157, 2007. Disponível em: <<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=476997&indexSearch=ID>> Acesso em 03 de Setembro de 2017.

RIVOIRE, W. A. et al . Biologia molecular do câncer cervical. **Rev. Bras. Saude Mater. Infant.**, Recife , v. 6, n. 4, p. 447-451, 2006 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-38292006000400012&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 03 de Setembro de 2017.

ROCHA, P. B. et al. Câncer do colo uterino: fatores de risco, enfrentamento e o papel do enfermeiro na prevenção: uma revisão bibliográfica. **Cadernos de Graduação: Ciências Biológicas e da Saúde**, Aracaju, v. 2, n.2, p. 93-101, out. 2014. Disponível em: <www.revistas.usp.br/revistadc/article/viewFile/42183/45856> Acesso em: 03 de Agosto de 2017.

SAAVEDRA, A. P. et al. Molecular Bases of Human Papillomavirus Pathogenesis in the Development of Cervical Cancer. **Human Papillomavirus and Related Diseases - From Bench to Bedside - Research aspects**, p. 249-290, 2012. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/human-papillomavirus-and-related-diseases-from-bench-to-bedside-research-aspects/molecular-bases-of-human-papillomavirus-pathogenesis-in-the-development-of-cervical-cancer>> Acesso em: 31 de Julho de 2017.

SAPP, M. et al. Structure, attachment and entry of polyoma- and papillomaviruses. **Virology**, v. 384, n. 2, p. 400–409, 20 fev. 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19157477>> Acesso em: 31 de Julho de 2017.

SARZI, D. M. et al. Cenário de morbimortalidade por câncer de colo uterino. **Rev enferm UFPE on line**, Recife, v. 11, n. 2, p. 898-905, Fevereiro. 2017. Disponível em: <http://www.revista.ufpe.br/revistaenfermagem/index.php/revista/article/view/8034/pdf_2231> Acesso em: 31 de Julho de 2017.

SCHWARTZ, S. Papillomavirus transcripts and posttranscriptional regulation. **Virology**, Special Issue: The Papillomavirus Episteme. v. 445, n. 1–2, p. 187–196, out. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23706315>> Acesso em: 31 de Julho de 2017.

SHEN, M. et al. Sequence variation analysis of HPV-18 isolates in southwest China. **PLoS one**, v. 8, n. 2, p. e56614, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23451059>> Acesso em: 31 de Julho de 2017.

SICHERO, L. et al. Different P105 Promoter Activities among Natural Variants of Human Papillomavirus Type 18. **Journal of Infectious Diseases**, v. 191, n. 5, p. 739–742, 1 mar. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15688288>> Acesso em: 31 de Julho de 2017.

SICHERO, L. et al. Epidemiological and functional implications of molecular variants of human papillomavirus. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, p. 707–717, jun. 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-879X2006000600002> Acesso em: 03 de Agosto de 2017.

SICHERO, L. et al. High grade cervical lesions are caused preferentially by non- European variants of HPVs 16 and 18. *International Journal of Cancer*. **Journal International Du Cancer**, v. 120, n. 8, p. 1763–1768, 15 abr. 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1723052>> Acesso em: 31 de Julho de 2017.

SOUTO, R. S. et al. O Papilomavírus Humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Goiânia, v. 51, n. 2, p. 155-160, 2005. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/rbc/n_51/v02/pdf/revisao2.pdf> Acesso em 03 de Setembro de 2017.

STEENBERGEN, R. D. et al. HPV- mediated transformation of the anogenital tract. **J Clin Virol**. V. 32, n. 1, p. 25-33, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15753009>> Acesso em: 28 de Agosto de 2017.

SUDARSHAN, S. R. The human papillomavirus type 16 E5 protein: stress signaling and expression in cervical cancer cell lines. **Dissertação**, Faculty of the Graduate School of Arts and Sciences, Georgetown University, Washington D.C., 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC136856/>> Acesso em: 17 de Agosto de 2017.

TAMURA, K. et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, 4 maio 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21546353>> Acesso em: 28 de Agosto de 2017.

TERMINI, L. et al. Biomarcadores na Triagem do Câncer do Colo Uterino. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 20, n. 2, p. 125–131, 2008. Disponível em: <<http://www.annalab.com.br/uploads/file/8.pdf>> Acesso em: 28 de Agosto de 2017.

- TESHIMA, H. et al. Human papillomavirus type 18 DNA sequences in adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma of the uterine cervix. **Archives of gynecology and obstetrics**, v. 259, n. 4, p. 169–177, 1997. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9271836>> Acesso em: 17 de Agosto de 2017.
- VENUTI, A. et al. Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. **Molecular Cancer**, v. 10, p. 140, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3248866/>> Acesso em: 25 de Setembro de 2017.
- VILLA, L. L. et al. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. **The Journal of General Virology**, v. 81, n. Pt 12, p. 2959–2968, dez. 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11086127>> Acesso em: 28 de Agosto de 2017.
- WHO/ICO. Information Center on HPV and Cervical Cancer (HPV Information Centre) (2015) **Human papillomavirus and related cancers in Brazil**. Disponível em: <<http://www.hpvcentre.net/statistics/reports/BRA.pdf>> Acesso em: 28 de Julho de 2017.
- WOODMAN, C. B. J. et al. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nature Reviews Cancer**, v.7, n.1, p.11–22, jan. 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17186016>> Acesso em: 25 de Setembro de 2017.
- YEWDELL, J. W. Confronting complexity: real-world immunodominance in antiviral CD8+ T cell responses. **Immunity**, v. 25, n. 4, p. 533-543, 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17046682>> Acesso em: 25 de Setembro de 2017.
- YEWDELL, J. W. et al. Immunodominance in major histocompatibility complex class I-restricted T lymphocyte responses 1. **Annual review of immunology**, v. 17, n. 1, p. 51-88, 1999. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10358753>> Acesso em: 25 de Setembro de 2017.
- ZEHBE, I. et al. p53 codon 72 polymorphism and various human papillomavirus 16 E6 genotypes are risk factors for cervical cancer development. **Cancer Research**, v. 61, n. 2, p. 608–611, 15 jan. 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11212257>> Acesso em: 25 de Setembro de 2017.
- ZIGUI CHEN, L. B. F. et al. Evolution and classification of oncogenic human papillomavirus types and variants associated with cervical cancer. **Methods Mol Biol**. 2015; 1249: 3–26. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25348294>> Acesso em: 25 de Setembro de 2017.
- ZUR HAUSEN, H. Papill omaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nature Reviews. Cancer**, v. 2, n. 5, p. 342–350, maio 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12044010>> Acesso em: 05 de Fevereiro de 2018.
- ZUR HAUSEN, H. Papillomavirus infections-- a major cause of human cancers. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1288, n. 2, p. F55–78, 9 out. 1996. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8876633>> Acesso em: 05 de Fevereiro de 2018.