



Universidade Federal  
de Campina Grande

CENTRO DE FORMAÇÃO DE PROFESSORES  
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA VIDA  
BACHARELADO EM MEDICINA

GABRIELLA AMÂNCIO MATOS

**ANÁLISE *IN SILICO* DA VARIABILIDADE GENÉTICA DO ONCOGENE E5 DO  
HPV 16**

CAJAZEIRAS – PB

2019

GABRIELLA AMÂNCIO MATOS

**ANÁLISE *IN SILICO* DA VARIABILIDADE GENÉTICA DO ONCOGENE E5 DO  
HPV 16**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado ao curso de Bacharelado em Medicina, da Unidade Acadêmica de Ciências da Vida (UACV), sob orientação do Prof. Dr. Antônio Humberto Pereira da Silva Júnior, como requisito parcial obrigatório à obtenção do título de Bacharel em Medicina.

CAJAZEIRAS – PB

2019

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

M433a Matos, Gabriella Amâncio.  
Análise *in silico* da variabilidade genética do oncogene E5 do HPV 16  
/ Gabriella Amâncio Matos. - Cajazeiras, 2019.  
58f.: il.  
Bibliografia.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Humberto Pereira da Silva Júnior.  
Monografia (Bacharelado em Medicina) UFCG/CFP, 2019.

1. Papilomavírus Humano 16. 2. HPV. 3. Oncogene. 4. Neoplasias do  
colo do uterino. 5. Câncer do colo do útero I. Silva Júnior, Antônio  
Humberto Pereira da. II. Universidade Federal de Campina Grande. III.  
Centro de Formação de Professores. IV. Título.

UFCG/CFP/BS

CDU - 616.97

GABRIELLA AMÂNCIO MATOS

**ANÁLISE *IN SILICO* DA VARIABILIDADE GENÉTICA DO ONCOGENE E5 DO  
HPV 16**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado ao curso de Bacharelado em Medicina, da Unidade Acadêmica de Ciências da Vida (UACV), sob orientação do Prof. Dr. Antônio Humberto Pereira da Silva Júnior, como requisito parcial obrigatório à obtenção do título de Médico.

O trabalho foi examinado e aprovado em 22 de novembro de 2019.

**BANCA EXAMINADORA**

Antônio Humberto P. de Silva Jr.

**Prof. Dr. Antônio Humberto Pereira da Silva Júnior**

Orientador

Unidade Acadêmica de Ciências da Vida (UACV)

Maria do Carmo Andrade Duarte de Farias

**Prof. Dra. Maria do Carmo Andrade Duarte de Farias**

Examinador

Unidade Acadêmica de Ciências da Vida (UACV)

Edvanina de Sousa Costa Queiroz

**Profa. Dra. Edvanina de Sousa Costa Queiroz**

Examinador

Unidade Acadêmica de Ciências da Vida (UACV)

CAJAZEIRAS – PB

2019

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais: Aurineide Amâncio Matos e Francisco Jocival Amâncio, que sacrificaram muito dos seus sonhos mais lindos e noites em claro trabalhando duro para que sua única filha estivesse realizando seu maior sonho. Meus pais sempre serão um exemplo de luta, humildade e sapiência e seus ensinamentos sempre serão seguidos como foco da minha realidade.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha família e meus amigos, que sempre me ensinaram a encarar a realidade com coragem e fé, e que mesmo nas horas mais sombrias sempre me mostraram onde acender a luz.

Também quero agradecer aos meus professores e orientadores que, individualmente, contribuíram para meu aprendizado, o qual levarei para cada dia do meu trabalho com muito carinho e gratificação.

“Em um lugar escuro nos encontramos e um pouco mais de conhecimento ilumina nosso caminho.” (Mestre Yoda)

## RESUMO

O Papilomavírus humano (HPV) é o grande responsável por causar diversos tipos de cânceres, destacando-se o câncer cervical, e as lesões genitais, sendo o oncogene E5 pertencente a esse patógeno importante para seu potencial oncogênico. Esse trabalho analisou a variabilidade genética *in silico* do gene E5 das sequências gênicas do HPV 16 utilizando o banco de dados genômicos do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) a fim de identificar, por meio do alinhamento dos códons, mudanças estruturais na organização da estrutura secundária da oncoproteína, que poderia influenciar em seu grau de patogenicidade. As análises das variações do oncogene E5 do HPV16 depositadas nos bancos de dados, revelaram a existência, por meio do software PSIPRED, de vários sítios polimórficos, por meio da investigação da estrutura secundária da proteína, bem como as variações encontradas nas sequências das variantes, em relação à sequência protótipo K02718. Em relação ao mapeamento dos epítomos conforme os padrões da plataforma IEDB, foi observado que a sequência da oncoproteína 16E5 da amostra de referência K02718, formou epítomos imunogênicos com moléculas pertencentes ao MHC-I (HLA-A e HLA-B) e MHC-II (HLA-DR), sendo as moléculas complexo HLA-A estão mais relacionadas com a ação da oncoproteína 16E5. As mutações não-sinônimas promovem mudanças no arcabouço da estrutura secundária da oncoproteína 16E5 necessitando-se de um estudo das células para sabermos o impacto que tais mudanças geram na progressão da carcinogênese. O estudo dos epítomos imunogênicos é bastante útil para o planejamento da identificação e da identificação de progressões carcinogênicas precoces, sendo a biologia computacional uma nova vertente de estudo científico para identificação e ação inicial para o desenvolvimento de estratégias imunoterapêuticas.

**Palavras-chave:** Papilomavírus Humano 16. Oncogene. Neoplasias do Colo Uterino.



## ABSTRACT

The human papillomavirus (HPV) is largely responsible for causing several types of cancer, especially cervical cancer, and genital lesions, being the oncogene E5 belonging to this pathogen important for its oncogenic potential. This work analyzed the in silico genetic variability of gene E5 of HPV 16 gene sequences using the National Center for Biotechnology Information (NCBI) genomic database in order to identify, through the alignment of the codons, structural changes in the organization of the secondary structure of oncoprotein, which could influence its degree of pathogenicity. Analysis of HPV16 oncogene E5 variations deposited in the databases revealed the existence, through the PSIPRED software, of several polymorphic sites, by investigating the secondary structure of the protein, as well as the variations found in the variant sequences, with respect to the prototype sequence K02718. Regarding the mapping of the epitopes according to the IEDB platform standards, it was observed that the oncoprotein 16E5 sequence of the reference sample K02718 formed immunogenic epitopes with molecules belonging to MHC-I (HLA-A and HLA-B) and MHC-II. (HLA-DR), where HLA-A complex molecules are more related to the action of oncoprotein 16E5. Non-synonymous mutations promote changes in the secondary structure of 16E5 oncoprotein requiring a cell study to determine the impact that such changes have on the progression of carcinogenesis. The study of immunogenic epitopes is very useful for planning the identification and identification of early carcinogenic progressions, being computational biology a new strand of scientific study for identification and initial action for the development of immunotherapeutic strategies.

**Keywords:** Human Papillomavirus 16. Oncogene. Cervical Neoplasms.

## **LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

Figura 1 -	Representação esquemática do genoma completo do HPV16	<b>28</b>
Figura 2 -	Processo infeccioso mediado pelo HPV no epitélio cervical	<b>30</b>
Figura 3 -	Representação esquemática da proteína E5 com 83 aminoácidos	<b>33</b>
Figura 4 -	Modelo hexamérico da proteína E5 do HPV16	<b>33</b>

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 -	Classificação TNM do estadiamento do câncer do colo do útero.	<b>22</b>
Tabela 2 -	Estimativas de novos casos de câncer cervical nos Estados da Região Nordeste do Brasil, para biênio 2018-2019.	<b>26</b>
Tabela 3 -	Estimativas de novos casos de câncer cervical nas Capitais da Região Nordeste do Brasil, para o biênio 2018-2019.	<b>27</b>
Tabela 4 -	Papel geral dos genes de expressão precoce (Earlier) e tardios (Late) no curso da carcinogênese cervical.	<b>29</b>
Tabela 5 -	Variações nucleotídicas do oncogene E5 do HPV16.	<b>42</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-1	Proteína ativadora 1
APC	Células apresentadoras de antígeno
ASCUS	Células escamosas atípicas de significado indeterminado
c-Cbl	Ubiquitina ligase c-Cbl
CD1d	Glioproteína expressa na superfície das APCs
c-fos	Proto-oncogene de ativação imediata
c-jun	Proteína quinase c-jun
COX	Ciclo-oxigenase
CTL	Linfócito T citotóxico
DC	Células Dendríticas
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EGFR	Receptor para o fator de crescimento epitelial
ETA	Receptores de endotelina acoplado à proteína G
ET-1	Ligante específico de endotelina
EVER1 e EVER2	Genes relacionados à Epidermiodisplasia verruciforme
FasL	Ligante do fator de necrose tumoral
FASTA	Alinhamento Rápido
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	Lesão intraepitelial escamosa alta
IEDB	Banco de Dados de Epitopo Imunológico
IC	Carcinoma invasivo
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus
IFN	Interferon
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer

KDa	Quilodálon
LCR	Região Longa de Controle
LR HPV	Papilomavírus de baixo risco oncogênico
LSIL	Lesão intraepitelial escamosa baixa
MAPK	Proteína-quinase ativada por mitógeno
MEGA	Análise Genética Evolutiva Molecular
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NCR	Região Não Codificante
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
NK	<i>Natural killer</i> (assassinas naturais)
ORF	Quadro Aberto de Leitura
ORI	Origem de replicação
Pae	Sítio de poliadenilação
PDB	Banco de Dados de Proteínas
pRb	Proteína Retinoblastoma
PSIPRED	Bancada de Análise de Sequência de Proteína
PV	Papilomavírus
SIL	Lesão intraepitelial escamosa
SNPs	Polimorfismo de nucleotídeo único
T cell	Células T
Th	Células T humorais
TLRs	Receptores Toll-like
TNF	Fator de necrose tumoral
TRAIL	Ligante do fator de necrose tumoral
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
3.1	O CÂNCER CERVICAL.....	18
<b>3.1.1</b>	<b>Prevenção e Diagnóstico.....</b>	<b>18</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Citopatológico.....</b>	<b>20</b>
<b>3.1.3</b>	<b>Rastreamento.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1.4</b>	<b>Estadiamento.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1.5</b>	<b>Tratamento.....</b>	<b>23</b>
3.2	OS PAPILOMAVÍRUS (PVS).....	25
<b>3.2.1</b>	<b>Histórico.....</b>	<b>25</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Câncer Cervical: Distribuição do Novos Casos no Brasil e Rastreamento....</b>	<b>26</b>
<b>3.2.3</b>	<b>HPV: Estrutura Viral e Organização Genômica.....</b>	<b>28</b>
3.3	HETEROGENEIDADE DOS PAPILOMAVÍRUS.....	30
3.4	ONCOPROTEÍNA E5.....	32
<b>3.4.1</b>	<b>Aspectos Estruturais e Biológicos</b>	<b>32</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Oncoproteína E5 e resposta imunológica.....</b>	<b>35</b>
<b>3.4.3</b>	<b>Importância da oncoproteína E5 como estratégia imunoterapêutica.....</b>	<b>36</b>
<b>4</b>	<b>MÉTODO.....</b>	<b>40</b>
4.1	TIPO DE ESTUDO.....	40
4.2	FONTE DOS DADOS E SEQUÊNCIAS ANALISADAS.....	40
4.3	ANÁLISE DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA DE E5.....	40
4.4	ANÁLISE DE EPÍTOPOS IMUNOGÊNICOS.....	41
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>42</b>
5.1	VARIABILIDADE GENÉTICA DO ONCOGENE E5 DO HPV16.....	42

5.2	ANÁLISE DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA.....	43
5.3	MAPEAMENTO DE EPÍTOPOS IMUNOGÊNICOS.....	44
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>48</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>50</b>
	<b>APÊNDICE A - Predição da estrutura secundária da oncoproteína 16E5...</b>	<b>57</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O papilomavírus humano (HPV) é responsável por causar o câncer cervical, o qual vem afetando, principalmente, um grande número de indivíduos jovens. Além deste, o HPV também está correlacionado com o desenvolvimento de outros tipos tais como o câncer na vagina, pênis, vulva e ânus. Também foram evidenciados infecções na região da cabeça e do pescoço, canal auditivo, seios nasais e cavidade oral (ABRAMOWITZ et al., 2019).

Os genótipos do HPV são divididos em duas categorias: HPV de alto risco (High Risk HPV (HR-HPV) e o HPV de baixo risco (Low Risk HPV (LR-HPV). Esta classificação é dada de acordo com a capacidade oncogênica do genótipo. De uma forma geral, os LR-HPVs são responsáveis pelo aparecimento de verrugas genitais, enquanto os HR-HPVs estão associados com mudanças celulares anormais que progredem para o câncer (CECCARELLI et al., 2018).

A maioria das infecções não se manifestam nos primeiros anos após o contágio e a ausência de lesões não significa a inexistência da infecção pelo HPV. Dessa forma, os testes de detecção do DNA do HPV têm sido amplamente utilizados para a detecção da infecção, que pode se encontrar em estado latente (ROMPALO, 2011).

Os genótipos HPV16 e HPV18 são considerados de alto risco oncogênico, amplamente distribuídos ao redor do mundo, contribuindo com mais de 70% dos casos de câncer cervical. Destes, o HPV16 é o genótipo com maior disseminação na população mundial (ZHANG et al., 2017).

Neste contexto, o estudo das variantes do HPV16 tem possibilitado a identificação de novos polimorfismos, denominados SNPs (single-nucleotide polymorphisms). Esta identificação molecular, tem permitido identificar as linhagens e sublinhagens do HPV16 com maior persistência no processo infeccioso e com maior predisposição ao desenvolvimento de lesões que culminem com o estabelecimento do processo carcinogênico cervical (BURK et al., 2013).

O gene E5 e sua oncoproteína vem sendo estudados pela sua relação com o processo de carcinogênese mediada pelo HPV. Ele estimula a proliferação celular, através da ativação dos receptores para o fator de crescimento epitelial (EGFR), e nas etapas de iniciação da carcinogênese, além de interagir com moléculas do sistema imune (DOORBAR et al., 2013).

Assim, a identificação dos principais genótipos circulantes numa população, bem como o entendimento das suas variações genéticas, tem sido objeto de análise por diversos grupos de pesquisa. A partir das análises filogenéticas e com a determinação de similaridades



entre as linhagens dos HPVs circulantes, podemos identificar o desenvolvimento e a prospecção de novas espécies de HPV, cujo o estudo genético das linhagens e das sublinhagens, podem ser úteis para o desenvolvimento de novas estratégias imunoterapêuticas.

Este trabalho tem como objetivo geral, identificar os polimorfismos do oncogene E5 do HPV16, a partir da coleta de sequencias gênicas disponíveis na base de dados de sequências genômicas do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Como pergunta de partida que norteou este trabalho indagou-se: qual a variabilidade genética descrita para o oncogene E5 do HPV16 nas bases genômicas?

A hipótese aventada é de estejam descritas variáveis genômicas que, mesmo em pequena quantidade, face a dificuldade de pesquisa desta região genômica e seu produto, contribuem com a infectividade do HPV.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar, *in silico*, a variabilidade genética do oncogene E5 do HPV16, das sequências gênicas depositadas no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI).

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar os sítios polimórficos na oncoproteína E5.
- Analisar os potenciais efeitos desta heterogeneidade genética no processo infeccioso.
- Identificar possíveis epítomos imunogênicos com os alelos da classe MHC-I e MHC-II.
- Realizar a predição da estrutura secundária da oncoproteína E5 do HPV16 e comparar a morfologia entre as variantes 16E5.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 O CÂNCER CERVICAL

O câncer cervical é o segundo câncer mais comumente diagnosticado na atualidade e a terceira principal causa de morte oncológica entre as mulheres nos países em desenvolvimento (CHEN et al., 2017). Atualmente, apresentam-se no mundo cerca de 530 mil casos novos e, no Brasil, representa a quarta causa de morte por câncer e atingiu 5.430 mortes no ano de 2013.

Nos países desenvolvidos, predominam os tipos de câncer associados a fatores de urbanização e desenvolvimento (pulmão, próstata, mama feminina, cólon e reto). Por outro lado, nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento predomina grande incidência de cânceres associados a infecções como os do colo do útero, estômago, esôfago, fígado (INCA, 2018).

As taxas de morbimortalidade por câncer de colo de útero são altas em países em desenvolvimento, principalmente pelo fato de ser uma patologia de fácil disseminação por via sexual e por ter uma evolução relativamente lenta comparado a outros tipos de cânceres. No que diz respeito aos cofatores associados à carcinogênese cervical, o principal fator relacionado com o surgimento e a progressão das lesões cervicais é o HPV. O HPV é transmitido principalmente por via sexual através do contato direto com a pele ou mucosa infectada. No entanto, embora estas lesões possam ser assintomáticas e transitórias, algumas mulheres desenvolvem infecções persistentes e que possivelmente resultarão em lesões precursoras do câncer do colo do útero. (FREITAS et al., 2012).

No entanto, diversos cofatores estão associados à progressão das lesões e ao estabelecimento do câncer cervical. Dentre eles, podemos considerar o contato sexual cada vez mais precoce, múltiplos parceiros sexuais, imunossupressão, tabagismo, co-infecções, uso constante de contraceptivos orais, condição socioeconômico e educação precárias (EBRAHIMI, 2017; TRAVASSOS et al., 2017).

O processo infeccioso se dá a partir de microlacerações da pele e mucosa desenvolvidas durante a relação sexual, possibilitando a passagem do vírus às células indiferenciadas da camada basal do epitélio. Outras vias de transmissão têm sido investigadas, como através da placenta ou até o leite materno (FERRARO et al., 2011).

### 3.1.1 Prevenção e Diagnóstico

A prevenção primária do câncer do colo do útero está relacionada à diminuição do risco de contágio pelo HPV, o qual pode se dar através da aquisição de conhecimento dos fatores de risco associados à transmissão.

As ações de prevenção de câncer cervical podem ser atingidas com a difusão da vacinação e na triagem com o método de rastreamento do Papanicolau (TEIXEIRA, 2015). Isso é explicado pelo fato de o número de casos de HPV e sua distribuição em pacientes com lesões pré-cancerosas dependem de fatores como acesso ao exame citológico e a distribuição de vacinas na região (LI et al., 2017).

Atualmente, são utilizadas duas vacinas profiláticas contra o HPV: a vacina bivalente e a vacina tetravalente. A vacina bivalente apresenta proteção contra infecção incidente ou persistente dos sorotipos de alto risco tipos 16 e 18, e também previne as lesões neoplásicas (LIMBERGER et al., 2012). Já a vacina tetravalente, conhecida como Gardasil, protege contra HPVs de alto risco e também inclui prevenção contra HPV6 e HPV11. Recentemente foi aprovada a vacina Gardasil 9 expande ainda mais a proteção adicionando cinco tipos adicionais de sorotipos do HPV (31, 33, 45, 52 e 58) (KRASHIAS et al., 2017).

Desde 2014, a vacina tetravalente apresenta-se disponível na rede pública, que visa a proteção contra os sorotipos 6, 11, 16 e 18 do HPV para meninas de 9 a 13 anos; e, a partir de 2017, também para os meninos de 11 a 13 anos (INCA, 2018).

Quando foi introduzida no calendário nacional de vacinação do SUS, a vacina HPV quadrivalente foi adotada pelo Ministério da Saúde através de esquema de três doses, com a segunda dose após seis meses da aplicação da primeira, e a terceira dose administrada 5 anos após o uso da segunda. Houve redução de três para duas doses, por comprovação de equidade de eficácia e, em 2014, o Ministério da Saúde incrementou no calendário vacinal a vacina tetravalente, para meninas de 9 a 13 anos. Em 2017, o esquema de vacinação foi estendido pelo Sistema Único de Saúde (SUS), para as meninas de 9 a 14 anos e os meninos de 11 a 14 anos (SANTOS; DIAS, 2018).

Em estudos clínicos, a vacina mostrou-se altamente efetiva contra o câncer na região anogenital, com eficácia superior a 95%, contra lesões pré-cancerosas e câncer vaginal/vulvar, neoplasia intra-epitelial cervical e contra lesões genitais causadas por HPV tipos 6, 11, 16 e 18. A duração da imunidade desta vacina é de pelo menos cinco anos (SANTOS; DIAS, 2018).

Também é difundido o esquema de três doses (zero, dois e seis meses) para mulheres entre 9 e 26 anos de idade portadores de HIV. Em 2017, a população do sexo masculino também foi incluída nas estratégias de prevenção, sendo oferecido também o esquema de três doses (zero, dois e seis meses) para indivíduos do sexo masculino portadores do HIV, entre 9 e 26 anos de idade (SANTOS; DIAS, 2018).

Para diagnóstico podem ser utilizados exames clínicos, laboratoriais ou radiológicos, de pessoas com sinais sugestivos da doença, além de método de rastreamento por citológico (INCA, 2018).

A difusão da citologia, o maior acesso ao tratamento e o acesso oportuno à confirmação diagnóstica, tem ajudado na diminuição da mortalidade decorrente de câncer cervical, sendo esse o método de triagem considerado o padrão-ouro no Brasil. É considerado um exame de baixo custo, com alta especificidade, porém pouca sensibilidade na detecção de lesões pré-malignas (RINCON; MORALES; RINCÓN-OROZCO, 2017).

Em apresentações clínicas típicas, o diagnóstico é baseado em achados clínicos, mas, se houver alguma dúvida na conduta clínica, são realizadas análises laboratoriais adequadas, como avaliações histopatológicas ou microbiológicas. (EBRAHIMI, 2017).

O diagnóstico definitivo é elaborado por meio da detecção do DNA viral através do uso de testes moleculares, como a hibridização *in situ*, captura híbrida e a reação em cadeia da polimerase, sendo este último o mais comum (HOFFMANN, 2015).

### 3.1.2 Citopatológico

A nomenclatura atualmente em uso no Brasil tem como base o Sistema de Bethesda, que é a classificação mais utilizada em citologia do esfregaço cervical. Neste sistema são adotadas as seguintes nomenclaturas: lesões intraepiteliais de baixo grau (LSIL) e lesões intraepiteliais de alto grau (HSIL) (INCA, 2018).

De acordo com o INCA (2018), em relação às atipias celulares, podemos subdividir o padrão de aparecimento celular em:

- **Células atípicas de significado indeterminado:** Para qualquer célula envolvida, essas alterações podem ser possivelmente não neoplásicas ou não podendo excluir lesão intraepitelial de alto grau. Essas atipias podem ser de células escamosas (ASC), glandulares (AGC) ou de origem indefinida;
- **Atipias em células escamosas:** são separadas em lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL – que inclui a neoplasia intraepitelial grau I (NIC grau I) e efeito citopático

causado pelo HIV), lesão intraepitelial de alto grau (HSIL – NIC graus II e III, com maior potencial de evolução maligna), lesão intraepitelial de alto grau não podendo excluir microinvasão, e carcinoma epidermoide invasor;

- **Atipias em células glandulares:** inclui o adenocarcinoma *in situ* (AIS) e o adenocarcinoma invasor, que pode ser cervical, endometrial ou sem outras especificações (referente a adenocarcinomas de origem uterina);
- **Outras neoplasias malignas:** item no qual devem ser descritos os achados correspondentes a neoplasias glandulares de origem extrauterina.

### 3.1.3 Rastreamento

O método atual e eficaz de rastreamento do câncer cervical no Brasil é o exame citopatológico, conhecido como exame do Papanicolaou. Nos países que adotaram o exame de Papanicolaou, a incidência e a mortalidade do câncer do colo do útero diminuíram (FELDMAN, GOODMAN, PEIPERT, 2019).

O citopatológico deve ser oferecido às mulheres assintomáticas na faixa etária de 25 a 64 anos e que já desenvolveram ao menos uma relação sexual. O intervalo entre os exames deve ser de três anos, após dois exames negativos, com intervalo anual. Em caso de resultado de lesão de baixo grau, a indicação é de repetição do exame em seis meses (INCA, 2018).

O papanicolau é um dos métodos de rastreio mais eficientes adotado em países subdesenvolvidos. A Triagem pode detectar os estágios iniciais do carcinoma de células escamosas e do adenocarcinoma (FELDMAN, GOODMAN, PEIPERT, 2019). Entretanto, o exame citopatológico apresenta falhas, pois a taxa de resultados falso-negativos pode variar de 2% a 50%, principalmente devido a erro de coleta, de escrutínio e de interpretação, além do fato de não abranger toda a população feminina (TAVARES, 2007).

Por conta da elevada taxa de resultados falso-negativos, novos métodos moleculares têm sido empregados, para a detecção do DNA do HPV, com resultados promissores quando comparados com a citologia oncótica (LIMA et al., 2017).

### 3.1.4 Estadiamento

Após estabelecido o diagnóstico de câncer de colo de útero, deve-se prosseguir a investigação com as medidas necessárias para o estadiamento da doença, a fim de determinar as melhores opções terapêuticas para cada caso (CIBULA et al., 2018).

Em relação aos exames laboratoriais, preconiza-se a realização de hemograma, exames de função hepática e renal. A investigação radiológica inclui ressonância magnética de pelve, ressonância magnética de abdome e tomografia de tórax. A cistoscopia, se houver suspeita de invasão da bexiga, e a retossigmoidoscopia, se houver suspeita de invasão retal. O estadiamento do câncer de colo uterino, a partir dos exames expostos acima e segundo a classificação TNM, está descrito a seguir (Tabela 1) (CIBULA et al., 2018).

**Tabela 1 - Classificação TNM do estadiamento do câncer do colo do útero.**

<b>T- Tumor primário</b>	
Tx	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Sem evidência de tumor primário
T1a	Carcinoma invasivo microscópico, invasão do estroma cervical $\leq 5$ mm e extensão horizontal $\leq 7$ mm
T1a1	Invasão do estroma $\leq 3$ mm e extensão $\leq 7$ mm
T1a2	Invasão do estroma $> 3$ e $\leq 5$ mm e extensão $\leq 7$ mm
T1b	Lesão clínica confinada ao colo uterino ou lesão microscópica maior que T1a
T1b1	Lesão clínica $\leq 4$ cm na maior dimensão
T1b2	Lesão clínica $> 4$ cm na maior dimensão
T2	Tumor invade além do útero, mas não a parede pélvica ou o terço inferior da vagina
T2a	Sem invasão de paramétrios
T2a1	Lesão clínica $\leq 4$ cm
T2a2	Lesão clínica $> 4$ cm
T2b	Invasão de paramétrios
T3	Tumor estende-se até a parede pélvica e/ou envolve o terço inferior da vagina e/ou causa hidronefrose ou rim não funcionante
T3a	Envolvimento do terço inferior da vagina, sem extensão para a parede pélvica
T3b	Extensão até a parede pélvica e/ou e/ou hidronefrose ou rim não funcionante
T4	Extensão para além da pelve verdadeira ou invasão (confirmada por biópsia) da mucosa da bexiga ou reto. Edema bolhoso vesical apenas não permite que um caso seja alocado como T4
T4a	Invasão da mucosa da bexiga ou reto. Edema bolhoso vesical apenas não permite que um caso seja alocado como T4
T4b	Extensão para além da pelve verdadeira
<b>N – Linfonodos</b>	
Nx	Linfonodos regionais não acessados
N0	Sem metástases para linfonodos regionais
N1	Metástases para linfonodos regionais
<b>M – Metástases à distância</b>	

---

M0	Sem metástase à distância		
M1	Metástase à distância		
<b>Agrupamento TNM</b>			
Estadio I	T1	N0	M0
Estadio IA	T1a	N0	M0
Estadio IA1	T1a1	N0	M0
Estadio Ia2	T1a2	N0	M0
Estadio IB	T1b	N0	M0
Estadio IB1	T1b1	N0	M0
Estadio IB2	T1b2	N0	M0
Estadio II	T2	N0	M0
Estadio IIA	T2a	N0	M0
Estadio IIA1	T2a1	N0	M0
Estadio IIA2	T2a2	N0	M0
Estadio IIB	T2b	N0	M0
Estadio III	T3	N0	M0
Estadio IIIA	T3a	N0	M0
Estadio IIIB	T3b	N0-1	M0
	T1-3	N1	M0
Estadio IVA	T4	N0-1	M0
Estadio IVB	T1-3	N0-1	M1

---

Adaptado de Cibula et al. (2018).

### 3.1.5 Tratamento

O tratamento de precusores e doença em estágio inicial pode prevenir o desenvolvimento de câncer invasivo do colo do útero e reduzir a mortalidade por câncer do colo do útero (FELDMAN; GOODMAN; PEIPERT, 2019).

O tratamento da doença cervical pré-invasiva se baseia na extensão da doença. Nestes casos, as pacientes podem ser tratadas com criocirurgia, eletrocauterização, vaporização com laser, excisão eletrocirúrgica com alça (LEEP) ou conização da cérvix. O carcinoma de colo uterino localizado (estágios I a IIA) pode ser tratado com cirurgia isolada, só com radioterapia ou com uma combinação de cirurgia e radioterapia. O carcinoma cervical avançado (estágios IIB a IV) é tratado com radioterapia isolada. Se ocorrer câncer cervical pré-invasivo (carcinoma in situ) quando uma mulher completou a fase reprodutora, uma histerectomia é usualmente recomendada (OTTO, 2002).



Mulheres com câncer cervical limitado ao útero apresentam a doença em estágio inicial, sendo esses 1A, 1B1 e 1B2. As opções de tratamento para essas mulheres incluem histerectomia radical modificada, cirurgia poupadora de fertilidade ou radioterapia primária (RT) com ou sem quimioterapia.

A cirurgia e quimiorradioterapia são sozinhas ou concomitantes potencialmente curativas, com cirurgia reservada para pequenos (4 cm) tumores locais (estágios IA, IB1 e IIA1). A cirurgia radical pode ser uma opção de tratamento nos pacientes com do tumor >4 cm (estágio FIGO 1B3 / 2A2) e linfonodos negativos no estadiamento radiológico (HALDOSEN et al., 2019). A traquelectomia radical e a linfadenectomia opções para preservação de fertilidade para mulheres com doença em estágio inicial com tumor menor que 2 cm, com ausência de metástases (LEE, CATALANO, DEHDASHTI, 2015).

Quando a mulher não completou a fase reprodutora e a invasão é inferior a 1 mm, uma biópsia em cone pode ser suficiente (SMELTZER; BARE, 2002). A mesma autora relata que as pacientes que apresentam lesões precursoras ou pré-malignas devem ser tranquilizadas de que não possuem câncer. Entretanto, a importância do acompanhamento de perto é enfatizada, porque a condição, quando não tratada por um longo período, pode progredir para o câncer. Os pacientes com câncer cervical *in situ* também precisam saber que esse é, em geral, um tipo de câncer de crescimento lento e não-agressivo, provavelmente sem recidiva depois do tratamento apropriado.

O acompanhamento frequente após a cirurgia é imperativo porque o risco de recidiva é de 35% depois do tratamento para o câncer cervical invasivo. Em geral, a recidiva ocorre dentro dos 2 primeiros anos. As recidivas são frequentes no quarto superior da vagina, e a obstrução ureteral pode ser um sinal. Perda de peso, edema da perna e dor pélvica podem ser os sinais de obstrução linfática e metástase (SMELTZER; BARE, 2002).

O tratamento da HSIL é conização, geralmente com um ciclo de diatermia (“procedimento eletrocirúrgico de loop” também conhecido como CAF) que consegue controlar a doença na maioria dos casos).

A doença da forma metastática representa-se quando há linfonodos pélvicos ou paraaórticos positivos, sendo fundamental a imagem por ultrassonografia transvaginal ou transretal ou ressonância magnética para saber-se a extensão do tumor pélvico. No câncer de colo localmente avançado, a tomografia por emissão de pósitrons é importante, uma vez que a identificação de linfonodal metastática e metástases à distância tem consequências terapêuticas (HALDOSEN et al., 2019).

Após o tratamento, a doença voltará a ocorrer em aproximadamente um terço pacientes tratados para câncer localmente avançado, principalmente nos 2 primeiros anos (LEE, CATALANO, DEHDASHTI, 2015). A colposcopia, a citologia e o teste para HPVs de alto risco são úteis no monitoramento das infecções.

## 3.2 OS PAPILOMAVÍRUS (PVS)

### 3.2.1 Histórico

Em meados da década de 1950 e início dos anos 1960, quando as observações sobre os poliomavírus e os papilomavírus foram realizadas com o auxílio da microscopia eletrônica, pode-se constatar que ambos os vírus eram constituídos por um genoma de DNA circular dupla fita e por um capsídeo com formato icosaédrico não-envelopado. Como consequência destes achados, ambos os vírus foram classificados dentro de uma mesma família denominada *Papovaviridae* (ZUR HAUSEN, 2002; BERNARD, 2005).

Por volta dos anos 1970, os estudos sobre a biologia da infecção provocada pelos papilomavírus, atraíram um grande interesse, por se tratarem de agentes que provocam o aparecimento de verrugas. Estas lesões benignas foram observadas em humanos e outros mamíferos, e por muito tempo foi considerado um problema de ordem estética, e não um problema de saúde pública (ZUR HAUSEN, 2002).

A coleta de verrugas e a análise das lesões dos pacientes com Epidermiodisplasia verruciforme (EV), foi utilizada para isolar grandes quantidades de partículas virais, objetivando-se isolar o DNA genômico dos vírus com o propósito de interpretar o padrão de bandas por digestão enzimática e hibridização por Southern Blot (VILLIERS et al., 2004).

Nos anos 1980, dezenas de HPVs foram detectados em lesões de mucosa de natureza benigna e maligna. Os estudos das sequências gênicas demonstraram que as similaridades encontradas entre os poliomavírus e os papilomavírus, que os faziam pertencer à mesma família, eram muito superficiais para se estabelecer uma possível relação de parentesco. Um dos achados, estava na análise do tamanho do genoma; enquanto os poliomavírus apresentam um genoma de tamanho de 5 Kb, os papilomavírus possuem um genoma com tamanho aproximado de 8 Kb (REBRIKOV et al., 2002).

No início dos anos 2000, a família *Papillomaviridae* tornou-se oficialmente reconhecido pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV). Os dados atuais

mostram a existência de mais de 200 tipos de HPVs, com o seu genoma isolado e totalmente sequenciados (De VILLIERS *et al.*, 2004).

### 3.2.2 Câncer Cervical: Distribuição do Novos Casos no Brasil e Rastreamento

O câncer cervical representa a quarta causa mais comum de cânceres em mulheres ao redor do mundo, tendo sido estimado cerca de 528 mil novos casos e 266 mil mortes, no ano de 2012 (Ferlay *et al.*, 2015). No Brasil foram estimados 16.370 novos casos de câncer cervical para o biênio 2018-2019, com um risco estimado de 15,43 casos a cada 100 mil mulheres, ocupando a terceira posição dos tipos de cânceres mais frequentes no país e, no Nordeste do Brasil, ocupa a segunda posição, com um risco estimado de 20,47 para cada 100 mil mulheres (Tabela 2) (INCA, 2018).

**Tabela 2 – Estimativas de novos casos de câncer cervical nos Estados da Região Nordeste do Brasil, para biênio 2018-2019.**

<b>Estado</b>	<b>Número de Casos Estimados</b>	<b>Taxa Bruta por 100 mil hab.</b>
Bahia	1230	15,72
Maranhão	1090	30,55
Pernambuco	1030	20,84
Ceará	990	21,24
Piauí	430	26,19
Paraíba	370	17,57
Alagoas	320	18,49
Rio Grande do Norte	320	17,93
Sergipe	250	20,78

Fonte: Inca (2018).

No Estado da Paraíba, estima-se 370 novos casos diagnosticados no ano de 2018, com uma taxa bruta de 17,57 novos casos/100.000 habitantes (tabela 1) e, na Capital, o aparecimento de 80 novos casos (Tabela 3) (INCA, 2018).

**Tabela 3 – Estimativas de novos casos de câncer cervical nas Capitais da Região Nordeste do Brasil, para o biênio 2018-2019.**

<b>Capital</b>	<b>Estimativa de casos de Câncer Cervical</b>
Salvador	300
São Luís	240
Fortaleza	290
Recife	180
Teresina	140
Maceió	130
Natal	100
João Pessoa	80
Aracaju	60

Fonte: Inca (2018).

No Brasil, temos diversos programas de prevenção, controle e rastreamento do câncer cervical, o que permite a conscientização e a detecção precoce das anormalidades citológicas (ANGHEBEM-OLIVEIRA; MERLIN, 2010).

Para o rastreamento do câncer cervical, temos o exame citopatológico, através do teste Papanicolau, recomendado pelo Ministério da Saúde e adotado em mulheres sexualmente ativas, prioritariamente entre 25 a 64 anos, o qual permite detectar lesões pré-invasivas, o que demonstra a necessidade e a importância da precocidade e exatidão do diagnóstico (STEENBERGEN et al., 2005). Por outro lado, a análise histopatológica, vem sendo considerado o padrão-ouro para o diagnóstico, embora ocorram variações na interpretação das atipias celulares (ANGHEBEM-OLIVEIRA; MERLIN, 2010).

Os tipos virais que estão associados com o desenvolvimento e progressão das lesões são denominados HPVs de alto risco (*High Risk HPV*), ou simplesmente HR-HPV (MUÑOZ et al., 2006). Atualmente, mais de 200 genomas de HPVs foram totalmente sequenciados. Deste total, cerca de quinze genótipos estão associados com o alto risco oncogênico e, na Região Nordeste do Brasil, os mais prevalentes em lesões cervicais foram já identificados foram os HPV16, HPV18, HPV31, HPV33 e HPV58 (CHAGAS et al., 2013; GURGEL et al., 2015).

A transmissão do HPV se dá através de relações sexuais (vaginal, oral e/ou anal), onde a presença de microtraumas na mucosa são utilizadas para alcançar as células basais do epitélio cervical. Nos indivíduos imunocompetentes, o vírus pode ser eliminado do organismo antes de causar a lesão, caso contrário, teremos a formação de lesões intraepiteliais denominadas de *Neoplasias Intraepiteliais Cervicais* (NICs), que podem evoluir gradativamente, em três estágios, reconhecidas como lesão grau 1, de baixo risco oncogênico, e as lesões grau 2 e grau 3, de alto risco oncogênico, simbolicamente representadas por NICI, NICII e NICIII, respectivamente, até o estabelecimento da neoplasia maligna (STEENBERGEN et al., 2005), este último, ocorre devido a uma infecção persistente, onde evidencia-se a integração do genoma viral no genoma do hospedeiro (WOODMAN et al., 2007).

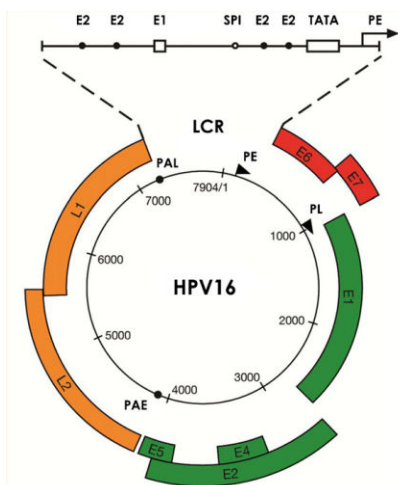
Este processo infeccioso mediado pelo HPV visa a modulação da proliferação celular, apoptose e o controle da resposta imune do hospedeiro. A resposta imune celular corresponde ao principal tipo de proteção contra a infecção pelo HPV e, no caso das infecções persistentes, a resposta imune é inibida, o que contribui para o não reconhecimento do vírus pelo organismo hospedeiro e consequente manifestação do seu perfil infeccioso (YU et al., 2012).

### 3.2.3 HPV: Estrutura Viral e Organização Genômica

O HPV é um pequeno vírus de DNA não-envelopado, com diâmetro de 55 nm, DNA circular de fita dupla, com cerca de 8000 pares de base (pb), associados às histonas, e tem como característica exibir tropismo por células epiteliais cervicais (ZUR HAUSEN, 1996).

O seu genoma apresenta oito quadros abertos de leitura (*Open Reading Frames* – ORFs) e pode ser dividido nas seguintes regiões: (1) uma região de controle denominada de Região Longa de Controle (LCR); (2) genes de expressão precoce, denominados genes *Earlier* (genes E); (3) genes de expressão tardia, denominados genes *Late* (genes L); e (4) uma região de controle, denominada *Non-Coding Region* (NCR) (Figura 1) (ZUR HAUSEN, 1996).

**Figura 1** – Representação esquemática do genoma completo do HPV16.



A estrutura é representada por um DNA circular fita dupla, com cerca de 8kb. Genes E: genes de expressão precoce; Genes L: genes de expressão tardia.  
Fonte: Doorbar et al. (2012).

As regiões LCR e NCR apresenta na sua estrutura a origem de replicação viral (denominada de ORI), além de alguns sítios de transcrição gênica. A sequência NCR, em particular, contém um sítio de poliadenilação (pAE), que é responsável pela regulação dos genes precoce do genoma viral. Os genes E estão representados pelas regiões E1, E2, E4, E5, E6 e E7, que estão relacionados à regulação do ciclo viral, e os genes L responsáveis por sintetizar a estrutura do capsídeo viral (ZUR HAUSEN, 1996). O papel dos genes E e L estão sintetizados a seguir (tabela 4).

**Tabela 4 – Papel geral dos genes de expressão precoce (Earlier) e tardios (Late) no curso da carcinogênese cervical.**

Gene	Significado Biológico
<b>L1</b>	Síntese da proteína maior do capsídeo, empacotamento do genoma e liberação de partículas virais.
<b>L2</b>	Síntese da proteína menor do capsídeo, empacotamento do genoma e liberação de partículas virais.
<b>E1</b>	Atividade de DNA helicase e ligação de ATP DNA dependente. Atua no controle da replicação do DNA viral na célula infectada. Forma um complexo com a proteínas E2, o que permite a sua atividade catalítica.
<b>E2</b>	Atua como regulador da transcrição, ativando ou reprimindo a ativação dos genes precoces do genoma viral, além de atuar, juntamente com a proteína E1, no controle do ciclo de replicação viral.
<b>E4</b>	Expressão primária no epitélio em diferenciação, associado ao citoesqueleto de queratina das células epiteliais em cultura. Atua na liberação das partículas virais.
<b>E5</b>	Estimula a proliferação celular, através da ativação dos receptores para o fator de crescimento epitelial (EGFR), e nas etapas de iniciação da carcinogênese, além de interagir com moléculas do sistema imune.
<b>E6</b>	Papel na transformação celular juntamente com a proteína E7 e na degradação da proteína p53 e de

---

	outras proteínas que atuam na supressão tumoral. Também é responsável pela inibição da apoptose.
<b>E7</b>	Semelhante à proteína E6, atua na transformação dos queratinócitos e provoca a inativação de pRb, induzindo, assim, a proliferação celular.

---

Fonte: McBride (2013); Doorbar et al. (2013).

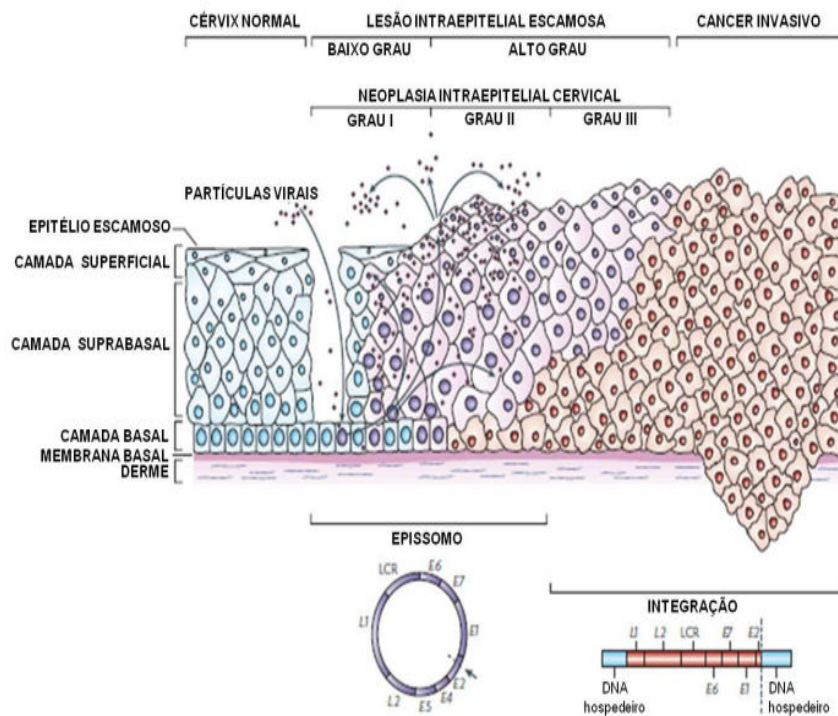
Atualmente são descritos mais de 200 genótipos de HPV já identificados, onde cerca de 40 destes estão relacionadas as infecções do trato genital feminino. Na última década foi registrado cerca de 15 genótipos potencialmente oncogênicos, dentre os quais os tipos 16 e 18, os de maior prevalência e oncogenicidade em diversas populações (FREITAS et al., 2017). Dentre os genótipos considerados de alto risco oncogênico (HR-HPV), destacam-se os HPV -16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -58, -59, -68, -73 e -82, e os de baixo risco (LR-HPV), os tipos HPV -6, -11, -40, -42, -43, -44, -54, -61, -70, -72 e -81 (CLIFFORD et al., 2003).

Os tipos HPV16, -18, -31 e -52, são encontrados com maior frequência em mulheres com lesão intraepitelial e em mulheres sem lesão intraepitelial. Nas lesões de baixo grau histológico (*Low Squamous Intraepitelial Lesion* - LSIL), os genótipos mais encontrados são os 16, 51, 31 e 52, e nas lesões de alto grau (*High Squamous Intraepitelial Lesion* - HSIL) e no carcinoma invasivo, os genótipos mais frequentes são os 16, 18, 31, 58 e 33. Estes dados estão diretamente relacionados à geografia da localidade estudada, por exemplo, nos países em desenvolvimento encontram-se uma ampla distribuição os HPV16, 18, 58 e 33 e, nos países desenvolvidos, os genótipos 16, 18, 31 e 33 (SANJOSE et al., 2010).

### 3.3 HETEROGENEIDADE DOS PAPILOMAVÍRUS

O desenvolvimento do câncer cervical segue os estágios de exposição sexual a um HPV oncogênico, persistência da infecção e progressão da lesão pré-cancerosa para o câncer invasivo. Em cada estágio pode-se ter a influência dos fatores ambientais, da biologia do hospedeiro e das variações genômicas dos vírus (Figura 2) (SCHIFFMAN; WENTZENSEN, 2013).

**Figura 2** – Processo infeccioso mediado pelo HPV no epitélio cervical.



Adaptado de Woodman et al. (2007).

A contribuição das variantes virais no desenvolvimento do câncer cervical, está nas diferenças de infectividade, dado a partir das exposições a um tipo ou outro de HPV, refletindo em respostas diferenciadas do sistema imune, na proliferação e diferenciação viral (FREITAS et al., 2012; SCHIFFMAN; WENTZENSEN, 2013).

O estudo da heterogeneidade dos HPVs, tem demonstrado que a principal via de variação genética vem surgindo ao longo do acúmulo de alterações nas sequências de nucleotídeos, que contribuem para a diversificação e especiação destes vírus. No HPV 16, por exemplo, percebe-se a existência de cinco categorias distintas, chamadas de linhagem Européia (E), Asiática (As), Asiático-Americana (AA), Africana-1 (Af-1) e Africana-2 (Af-2) (BURK et al., 2013).

Estas variações genômicas podem ser compreendidas, como importantes marcadores no genoma dos HPVs e podem ser devidamente utilizados em estudos de etiologia e epidemiologia, objetivando-se investigar a sua transmissão intra e interpopulacional. Por exemplo, a utilização das variações genômicas encontradas no HPV16 pode ser utilizado para diferenciar as infecções persistentes de uma nova infecção, provocada por outra variante do mesmo genótipo HPV16 (MAYRAND et al., 2000).

No sistema de classificação mais atual, os HPVs oncogênicos de maior prevalência no Brasil, os tipos 16, 18, 31, 33 e 58, passaram por uma reformulação em relação a sua classificação em variantes e sublinhagens. O HPV16 possui quatro variantes designadas por



A, B, C e D e dez sublinhagens denominadas A1, A2, A3, A4, B1, B2, C, D1, D2 e a D3. O HPV31 possui três variantes, designadas A, B e C e sete sublinhagens denominadas A1, A2, B1, B2, C1, C2 e C3 (BURK et al., 2013).

Esta heterogeneidade mostra que a substituição de nucleotídeos pode culminar com o surgimento de novas variantes de HPVs e afetar o seu potencial oncogênico. Por exemplo, no estudo de prevalência das variantes Af e AA do HPV16, percebeu-se uma elevada disseminação desta variante na América Latina, África e Ásia e, coincidentemente, ocorreu o aumento no número de casos relacionados aos cânceres anogenitais (VILLA et al., 2000; BERUMEN et al., 2001). Assim, algumas variantes podem ser consideradas mais oncogênicas em relação a outras, o que justifica uma investigação detalhada destas variações genômicas, para um melhor entendimento do processo infeccioso e avaliação do seu grau de patogenicidade (FREITAS et al., 2012).

Assim sendo, o papel funcional das variantes dos HPVs, pode estar diretamente associada com a diversidade patogênica, o que pode interferir na alteração do funcionamento dos elementos regulatórios dentro do genoma, influenciando a persistência da infecção e o risco aumentado para o surgimento do carcinoma invasivo (SCHIFFMAN et al., 2005), além de influenciar a ativação dos oncogenes virais, que naturalmente atuam sobre importantes componentes do ciclo celular e elementos regulatórios e de reparo do DNA, como as proteínas p53 e pRb (FREITAS et al., 2012).

### 3.4 ONCOPROTEÍNA E5

#### 3.4.1 Aspectos Estruturais e Biológicos

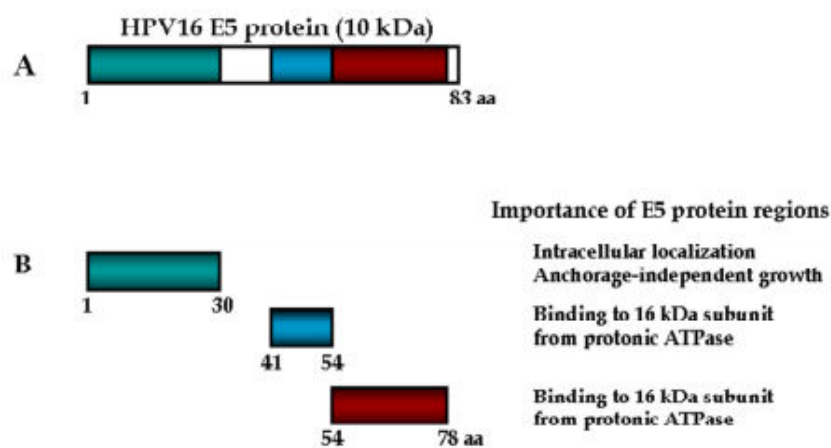
A oncoproteína E5 do HPV possui um tamanho que varia entre 40 a 83 aminoácidos, e apresenta um baixo peso molecular de 10 kDa. É uma proteína de natureza hidrofóbica e com a capacidade de se ligar a diversas membranas celulares, tais como o Aparato de Golgi e o Retículo Endoplasmático, além de se inserir na membrana dos endossomos, alterando a acidez do meio (VENUTI et al., 2011).

O seu modo de ação na carcinogênese cervical ainda está sob investigação, principalmente devido a algumas características peculiares desta oncoproteína, como o seu pequeno tamanho e hidrofobicidade, que a torna uma proteína de difícil detecção, aliado aos seus baixos níveis de expressão gênica nos tecidos-alvo infectados (KAVATI, 2012).

No HPV16, a oncoproteína E5 (16E5) tem sido alvo de diversas análises. Isoladamente, o oncogene E5 possui baixa ação transformante na célula hospedeira, porém quando em cooperação com outras oncoproteínas virais, a exemplo de E6 e E7, aumenta o risco carcinogênico (BRAVO; ALONSO, 2004). Nesta relação, temos o aumento da capacidade da E7 de imortalizar os queratinócitos e, conseqüentemente, um maior potencial carcinogênico, apresentando maior vantagem na infecção e maior probabilidade de transformação oncogênica (VENUTI et al., 2011; DIMAIO; PETTI, 2013).

O seu pequeno tamanho e natureza hidrofóbica, faz com que seja necessário que a oncoproteína E5 se desestruture para conseguir se ligar e interagir com suas proteínas alvo, modificando a sua interface. Seus grupos amina e carboxila formam interações de hidrogênio, adotando uma estrutura energeticamente favorável, onde as cadeias laterais de aminoácidos ficam do lado de fora do eixo helicoidal, podendo dessa forma, interagir com os segmentos transmembranares de outras proteínas celulares (DIMAIO; PETTI, 2013).

A primeira região hidrofóbica de E5 está associada à capacidade dessas células invadirem queratinócitos e a matriz extracelular (Figura 3).

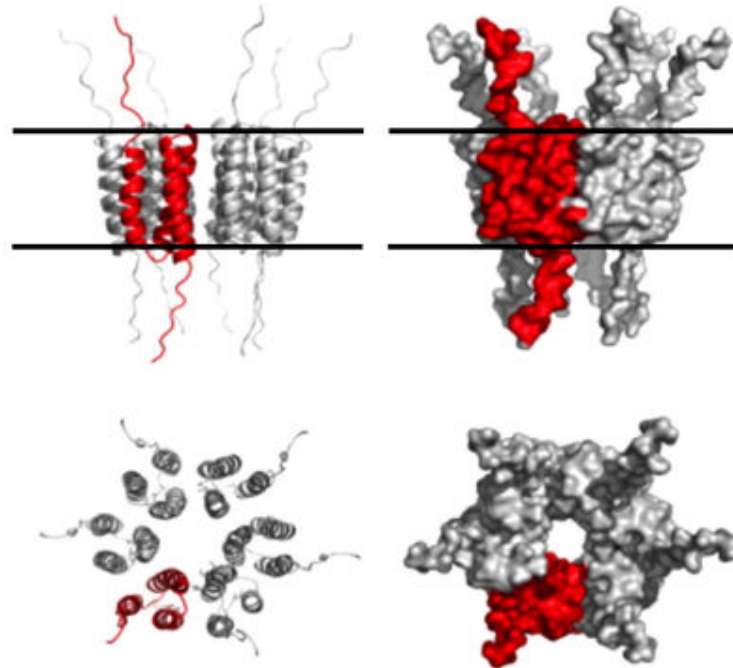


**Figura 3** - Representação esquemática da proteína E5 com 83 aminoácidos.

A proteína encontra-se composta por três regiões hidrofóbicas, onde a primeira porção está relacionada ao seu posicionamento na membrana, e a segunda e terceira porções, envolvidas com o estímulo do crescimento celular. Adaptado de Saavedra et al. (2012).

Através da modelagem molecular, percebe-se que a oncoproteína E5 possui 3 hélices transmembranares e pequenas regiões hidrofílicas nas regiões C-terminal e N-terminal (figura 4) (WETHERILL et al., 2012).

**Figura 4** – Modelo hexamérico da proteína E5 do HPV16.



A figura mostra um canal iônico gerado pela proteína E5 do HPV16 *in vitro*. Adaptado de Wetherill *et al.* (2012).

A oncoproteína E5 atua na modulação da atividade de outras proteínas celulares, afetando principalmente a atividade e metabolismo dos receptores dos fatores de crescimento celular, como o Fator de Crescimento Epidérmico (EGF) (DIMAIO; PETTI, 2013).

Durante a multiplicação celular, uma das vias de regulação da mitose se dá através da atividade da bomba de prótons com ação ATPase. Esta bomba é responsável pela acidificação dos endossomos, o que gera a degradação dos receptores de superfície dos EGFRs, e impossibilita a continuidade do ciclo mitótico. A proteína 16E5 associa-se à subunidade 16kDa do vacúolo de bomba de prótons, provocando o seu bloqueio, o que gera uma inibição da acidificação do endossomos e, conseqüentemente, inibe a degradação dos EGFRs, aumentando a sinalização para a mitose (VENUTI *et al.*, 2011; KAVATI *et al.*, 2012).

O aumento do tempo de meia-vida dos EGFRs, bem como de outros receptores de fatores de crescimento, estimula a proliferação celular e a expansão dos queratinócitos infectados. Com o bloqueio da degradação dos EGFRs, estes receptores interagem com a c-Cbl, uma ubiquitina-ligase responsável por controlar negativamente os receptores de membrana. Com esta atividade bloqueada, teremos uma constante sinalização para a transdução de sinal (VENUTI *et al.*, 2011; DIMAIO; PETTI, 2013).

16E5 também é responsável por ativar quinases protéicas, a exemplo da MAPK, responsável por aumentar a transcrição dos oncogenes c-fos e c-jun, que estimulam a

transcrição de E6, E7 e de outros genes envolvidos no crescimento celular, através da formação do complexo AP-1, um fator de transcrição essencial para o ciclo do HPV e crescimento celular. A ligação de E5 com outras proteínas membranares, como EVER1 e EVER2, também aumenta a quantidade de AP-1, e conseqüentemente de c-fos e c-jun, podendo gerar mutação destes genes e levando à tumores de pele (PATEL et al., 2008).

Dentre outras funções celulares atribuídas à oncoproteína E5 estão (1) aumento da expressão dos genes COX2 (ciclo-oxigenase-2), (2) aumento dos receptores EP4 de prostaglandinas, o que leva a um aumento na expressão do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), necessários para o crescimento do tumor, (3) angiogênese e metástase.

Há ainda, os receptores de endotelina acoplados à proteína G (ETA), que assim como as EGFRs possuem atividade mitogênica. A E5 aumenta a atividade de ETA através da indução de seu ligante específico endotelina-1 (ET-1), aumentando a sinalização mitogênica dos queratinócitos. Outro mecanismo que E5 utiliza para desregular o crescimento celular é através da inibição das proteínas p21 e p27, envolvidas na inibição do ciclo celular (DIMAIO; PETTI, 2013).

Nos HPVs alto risco, E5 também está envolvida em alterações morfológicas, como aumento do tamanho nuclear, aumento do conteúdo do DNA, poliploidia e binucleação (fusão célula-célula), e instabilidade cromossômica (VENUTI et al., 2011; DIMAIO; PETTI, 2013). Sugere-se que a função primária de E5 é inibir a apoptose em queratinócitos nos estágios iniciais da infecção, através da destruição do ligante do fator de necrose tumoral (*FasL*) e/ou do ligante do fator de necrose tumoral relacionado à indução de apoptose (TRAIL). De fato, queratinócitos que expressam 16E5 são imunes à ação anti-apoptótica destes dois fatores (VENUTI et al., 2011).

### **3.4.2 Oncoproteína E5 e resposta imunológica**

A frequência de infecções pelo HPV e a progressão para o câncer cervical é dependente de fatores imunológicos: mulheres imunocompetentes tendem a eliminar o vírus, ao passo que mulheres imunossuprimidas tendem a persistir com o vírus, podendo desenvolver lesões que podem progredir, levando ao processo neoplásico. Fica claro dessa forma, a importância do envolvimento da resposta imune na eliminação da infecção viral (CAMARA et al., 2003; MONFRÉ, 2011).

A principal resposta imune utilizada contra o vírus é a Th1 (celular), que secreta IFN- $\gamma$  e ativa os macrófagos. O MHC de classe I expresso na superfície das células, quando

associado a antígenos intracelulares, ativa os linfócitos T CD8<sup>+</sup> e sua consequente ação citotóxica. Paralelamente, o aumento da resposta de linfócitos T CD4<sup>+</sup> está diretamente relacionado com a eliminação do HPV e condilomas (MONFRÉ, 2011).

O HPV age por diferentes mecanismos para escapar da resposta imune, entre eles, o fato do vírus não causar a lise celular, e dessa forma, não haver o recrutamento dos macrófagos (VENUTI et al., 2011). Tumores cervicais e lesões de alto grau estão associadas com a diminuição da resposta Th1, e conseqüentemente, de IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$ . Dessa forma, percebe-se que as concentrações de IL-2 e IFN- $\gamma$  presentes nos estágios iniciais do tumor cervical, são suprimidos por IL-4 e IL-10 em estágios mais avançados (MONFRÉ, 2011).

A proteína E5 auxilia na evasão imune promovendo a diminuição da sinalização de infecção 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 (VENUTI et al., 2011).

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<sup>+</sup>, e não ocorre a resposta adaptativa. (DIMAIO e PETTI, 2013; VENUTI et al., 2011). A oncoproteína 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. A inibição do HLA de classe I pode ser reversível através da administração de Interferon (MONFRÉ, 2011).

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).

### **3.4.3 Importância da oncoproteína E5 como estratégia imunoterapêutica**

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. 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).

Diversos estudos têm avaliado a interação entre os HR-HPVs e o sistema imunológico do hospedeiro, objetivando ampliar diversas as estratégias terapêuticas e modular a resposta imune no combate à infecção (VICI et al., 2014).

Atualmente, não temos medicamentos antivirais contra as infecções provocadas pelo HPV, sendo necessário o tratamento via quimioterapia, radioterapia, cirurgia ou histerectomia. Embora existam essas possibilidades, podemos ter uma alta recorrência e um aumento no número de mortes (WHO, 2016).

Novas infecções por HPV podem ser prevenidas com a aplicação de vacinas profiláticas recentemente introduzidas, mas estas vacinas não têm um efeito terapêutico nos milhões de infectados com o HPV. O tratamento torna-se limitado a estes procedimentos intervencionistas e, portanto, o desenvolvimento de um agente antiviral eficaz e específico é extremamente desejável (WETHERIL et al., 2012).

O câncer associado ao HPV é frequentemente associado à integração do genoma do HPV nos cromossomos do hospedeiro. Em muitos casos, isso resulta em perda do E5 ORF. Entretanto, dado que a análise de mRNA indica alta expressão de E5 em lesões pré-cancerosas (CHANG et al., 2001).

Um recente estudo mostra que a oncoproteína E5 funciona como um canal iônico e esta atividade biológica pode ser explorada com uma finalidade terapêutica (WETHERIL et al., 2012). Canais iônicos codificados por vírus (vioporinas), já mostraram ser alvos de drogas viáveis, a exemplo do canal M2 do vírus influenza A, que o torna suscetível à inibição pelas drogas antivirais amantadina e rimantadina. No contexto das infecções provocadas pelo

HPV16, o alvo E5 também foi relatado como suscetível à inibição por estes compostos, bem como um número de outras moléculas inibidoras de viroporina reconhecidas (SCHNELL; CHOU, 2008).

Em relação ao desenvolvimento de estratégias vacinais, duas vacinas profiláticas (bivalente e quadrivalente) foram produzidas para prevenir a infecção pelo HPV (MARIANI; PAGLIUSI, 2008), e recentemente foi aprovada uma vacina nonavalente, que protege de nove genótipos de HPV (6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, e 58) (JOURA et al., 2015). Estas vacinas geralmente visam ativar células imunes, seja de resposta inata ou adaptativa (ROSALES, 2014), a fim de simular a resposta imune natural e reverter os mecanismos imunomoduladores virais.

As oncoproteínas do HPV têm sido amplamente empregadas na imunoterapia do câncer cervical e os oncogenes E6 e E7 foram amplamente testados. No entanto, os estudos demonstram que as estratégias adotadas visando estas duas oncoproteínas ainda estão longe de evitar as lesões pré-cancerígenas. Dessa forma, os estudos sobre a oncoproteína E5 vem se tornando uma alternativa (LIAO et al., 2015), pois visa estimular a resposta imunológica do hospedeiro no combate a infecção viral e progressão das lesões.

Dentre as metodologias testadas para o E5, as vacinas vetoriais virais são uma estratégia terapêutica promissora para a apresentação de antígenos patogênicos para sensibilizar o sistema imune do hospedeiro, induzindo forte resposta citotóxica. Estas vacinas são altamente imunogênicas, pois são capazes de penetrar nas células hospedeiras onde sintetizam os antígenos de interesse causando o rompimento das células infectadas (ROSALES, 2014).

Um dos primeiros estudos a avaliar a vacina terapêutica HPV16 E5 utilizou a bioengenharia de adenovírus recombinante para expressar E5 em modelo murino, cujo resultado observado foi a redução do crescimento do tumor *in vitro* e, além disso, a resposta imunológica foi T CD8+ dependente e T CD4+ independente, sugerindo sua ação antigênica com capacidade de reduzir o tumor (LIU et al., 2000).

Numa vacina de DNA que codifica as oncoproteínas de HPV16, E5 foi associado a E6 e E7, e foi geneticamente fundido à glicoproteína D do vírus do herpes. Esta vacina mostrou uma resposta T CD8+ específica para cada oncoproteína individualmente num modelo murino, além de exibir um maior efeito anti-câncer quando combinadas, por exemplo, com IL-12 (DINIZ et al., 2010). Essas citocinas são co-estimuladoras da resposta imune e recrutam células centrais do sistema inato, como as células dendríticas e as *Natural Killers* (NK), o que resulta na maturação da resposta dos linfócitos T citotóxicos, por exemplo (PERALTA-

ZARAGOZA et al., 2012). IL-12 atuando como um co-estimulador foi utilizado com sucesso em ensaios pré-clínicos e clínicos da terapia do câncer do colo do útero (PERALTA-ZARAGOZA et al., 2012; VICI et al., 2014).

Outros estudos mostram que a resposta imune mediada por células T, induzida pela oncoproteína E5 de HPV16, pode ser influenciada pelo HLA-A. O epítipo HPV16 E5 reduziu o potencial oncogênico e gerou células de memória T, restritas ao HLA-A\*0201 (LIU et al., 2007).

A utilização de potentes peptídeos pode ser útil para induzir um hospedeiro à resposta imune contra o vírus, como mostrado *in silico* para a oncoproteína E5 (ROSALES, 2014). O estudo *in silico* avaliou os epítopos mais potentes da oncoproteína HPV16 E5, que eram capazes de estimular as atividades das células T e B e também eram totalmente imunogênicas através do MHC classe I e II (KUMAR et al., 2015).

Outras estratégias de vacina para o E5 permanecem não testadas. Um exemplo é o uso da vacina autóloga de células dendríticas (DC). Neste estudo, os monócitos autólogos foram diferenciados em DC *in vitro* que foram, em seguida, administradas de volta ao paciente após serem carregadas com antígenos de HPV 16/18, em sistema cultivado com a oncoproteína E7. Os resultados apontaram para um aumento na atividade das células T CD8<sup>+</sup> e secreção de IFN- $\gamma$ . DC é conhecida como a célula mais potente para a indução de CTL, e o uso de oncoproteínas HPV16/18 como antígenos para o desenvolvimento de vacinas DC mostraram bons resultados, mas não foram realizados ensaios para a oncoproteína E5 (LIU et al., 2016).

O uso de E5 por meio dessas estratégias deve fornecer mais conhecimento sobre a atividade E5 como um antígeno e ajudar na busca de uma terapia apropriada contra o câncer cervical. De uma forma geral, essas vacinas de E5 podem representar uma boa estratégia, embora mais estudos sejam necessários para validar este alvo molecular como uma boa ferramenta imunoterapêutica (PALADINI et al., 2016).



## 4 MÉTODO

### 4.1 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo descritivo, de natureza quanti-qualitativa, ao apresentar o mapeamento e quantificar as regiões polimórficas do gene E5. Os dados coletados são de natureza secundária, pois são provenientes de bancos de dados genômicos, disponíveis para o acesso da comunidade científica.

Num banco de dados genômico, “as sequências de DNA e RNA são normalmente apresentadas juntamente com outras informações como o organismo a qual a sequência pertence ou ainda com as funções fisiológicas relacionadas à sequência” (KRÖGER, 2001, p. 30).

### 4.2 FONTE DOS DADOS E SEQUÊNCIAS ANALISADAS

Para a coleta das sequências gênicas, foi utilizado o banco de dados genômicos do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

As sequências coletadas para o HPV16 foram: K02718 (sequência de referência, A1), AF536179 (A2), HQ644236 (A3), AF534061 (A4), AF536180 (B1), HQ644298 (B2), AF472509 (C), HQ644257 (D1), AY686579 (D2) e AF402678 (D3). As sequências utilizadas neste estudo, bem como a sua padronização filogenética, estão disponíveis em Burk *et al.*, 2013.

As sequências gênicas foram coletadas no formato FASTA. Posteriormente, foi utilizado o programa CLUSTALW, do pacote de dados do *software* MEGA6, para a realização do alinhamento múltiplo das sequências (TAMURA *et al.*, 2011). Esta análise permite a identificação de sítios polimórficos entre duas ou mais sequências gênicas.

Após a identificação de sítios polimórficos e a sua devida anotação, foi realizado o alinhamento múltiplo da sequência de aminoácidos da oncoproteína 16E5. Esta etapa permitiu identificar mudanças estruturais na organização da estrutura secundária da oncoproteína, a partir do alinhamento dos códons.

### 4.3 ANÁLISE DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA DE E5

Após a obtenção da sequência de aminoácidos da oncoproteína E5, foi utilizado o servidor *on line* Psipred, para a predição da estrutura secundária da oncoproteína. Este servidor 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), possibilitando a geração de uma estrutura secundária mais robusta em relação a outros métodos computacionais.

### 4.4 ANÁLISE DE EPÍTOPOS IMUNOGÊNICOS

Para a identificação de possíveis epítopos 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 epítopos imunogênicos.

Foi utilizado a sequência de referência K02718 (A1), para o mapeamento dos potenciais epítopos imunogênicos, com moléculas pertencentes aos alelos de MHC-I e MHC-II.

Para o MHC-I, a análise dos epítopos seguiu o padrão de set de alelos do servidor, que reúne os alelos mais frequentes e distribuídos na população mundial, comprimento da sequência do epítipo (que variou entre 9-10mer), classificação dos epítopos de acordo com o percentile rank <1 e immunogenicity score >0,5. Estes critérios de seleção dão suporte à identificação de potentes epítopos imunogênicos.

Na identificação de potenciais epítopos para as moléculas do MHC-II, novos critérios foram incluídos, como a análise do percentile value e o IC50 value (<50nM).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 VARIABILIDADE GENÉTICA DO ONCOGENE E5 DO HPV16

As variantes do oncogene E5 do HPV16 circulantes na população mundial são classificadas, atualmente, nas linhagens A, B, C e D e nas suas respectivas sublinhagens A1 (European, E), A2 (European, E), A3 (European, E), A4 (Asian, E (As)), B1 (African-1, Afr1a), B2 (African-1, Afr1b), C (African-2, Afr2a), D1 (North American (NA)1), D2 (Asian-American (AA)2) e D3 (Asian-American (AA)1), sendo a sublinhagem A1 denominada a sequência de referência. As análises das variações do oncogene E5 do HPV16 depositadas nos bancos de dados, revelaram a existência de vários sítios polimórficos (tabela 5).

**Tabela 5 – Variações nucleotídicas do oncogene E5 do HPV16.**

Isolados	Posição dos Sítios Polimórficos												Variante	Sublinhagem	
	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4		
	8	8	9	9	9	0	0	0	0	0	0	0	0		
	5	6	6	7	9	1	3	4	4	4	5	7	8		
	8	8	7	9	1	7	4	2	3	9	9	7	9		
<b>Referência</b> <b>K02718</b>	T	G	A	A	C	G	T	A	T	T	A	A	T	A	A1
<b>AF536179</b>	*	*	*	C	*	*	G	*	*	G	*	*	*	A	A2
<b>HQ644236</b>	*	*	*	C	G	*	*	G	*	*	*	*	*	A	A3
<b>AF534061</b>	*	*	*	C	*	*	G	G	G	*	*	T	*	A	A4
<b>AF536180</b>	C	A	*	C	T	*	*	T	*	*	*	*	C	B	B1
<b>HQ644298</b>	C	A	*	C	T	*	*	T	*	*	*	*	C	B	B2
<b>AF472509</b>	C	*	*	C	G	*	*	G	*	*	C	*	C	C	C1
<b>HQ644257</b>	C	*	*	C	T	A	*	G	*	*	*	*	C	D	D1
<b>AY686579</b>	C	*	G	C	G	A	*	G	*	*	*	*	C	D	D2
<b>AF402678</b>	C	*	*	C	G	A	*	G	*	*	*	*	C	D	D3

Nucleotídeos conservados em relação a sequência de referência K02718 estão marcados com asterístico (\*).

Os resultados apresentados na tabela 5 apontam para a identificação de um número total de 13 sítios mutacionais, obtidos a partir do alinhamento múltiplo das 10 amostras variantes de 16E5 depositadas no NCBI, sendo a sublinhagem D2 a mais polimórfica.

No Brasil, o HPV16 é um dos tipos virais com ampla distribuição nas diversas regiões do País, em especial na região Nordeste (CHAGAS et al., 2011, 2013; GURGEL et al., 2015). Inúmeras variantes do HPV16 têm sido identificadas em diferentes localidades e grupos étnicos ao redor do mundo, e exibe diferentes potenciais oncogênicos, indicando que algumas linhagens específicas podem afetar a persistência da infecção pelo HPV e a progressão das lesões precursoras do câncer cervical (LI et al., 2011; SUN et al., 2013).

Estas variantes do HPV16 diferem na prevalência e nas propriedades bioquímicas e biológicas, com implicações incertas na etiologia do câncer do colo do útero (PLEASA et al., 2014). No entanto, a distribuição de variantes do oncogene 16E5 no Brasil, ainda não foi avaliado.

No Nordeste do Brasil, estudo anteriores identificaram a circulação de variantes do oncogene E5 pertencentes às linhagens A (linhagem européia) e D (linhagem não-européia) do HPV16 (CHAGAS et al., 2011, 2013).

De um modo geral, as variantes do HPV16 apresentam diferentes efeitos distintos, no que tange à sua patogenezidade, sendo observado mudanças na taxa de replicação celular, além de modificações na transcrição de alguns genes, como aqueles relacionados à apoptose. Este cenário contribui com a eficiência, persistência e a progressão da infecção viral (BERNARD et al., 2010; SCHIFFMAN; WENTZENSEN, 2010; FREITAS et al., 2012; BURK et al., 2013).

Outros estudos apontam para o impacto dos polimorfismos presentes nas linhagens não-européias (B, C e D). Nestas, foi identificado um maior potencial carcinogênico, em relação aos polimorfismos identificados em variantes da linhagem europeia (A) (SCHIFFMAN et al., 2010; SMITH et al., 2011).

## 5.2 ANÁLISE DA ESTRUTURA SECUNDÁRIA

Em HPV16, a oncoproteína E5 é uma proteína transmembrana do tipo  $\alpha$ -hélice, de caráter hidrofóbica e constituída por um total de 83 aminoácidos. De acordo com Saavedra et al. (2012), na estrutura secundária do oncogene E5 do HPV16, representada pela sequência de referência K02718, são distinguíveis três regiões importantes para o funcionamento desta oncoproteína: (1) região localizada entre os aminoácidos 1 e 30, responsável pela localização celular e ancoragem independente de crescimento, (2) região localizada entre os aminoácidos 41 e 54 e (3) região localizada entre os aminoácidos 54 ao 78, ambas contendo domínios de

ligação da subunidade da bomba de prótons ATPase-16 kDa, responsável pela acidificação dos endossomos.

Neste estudo, as sequências que foram analisadas da oncoproteína 16E5, foram derivadas da análise de sequências da oncoproteína E5 depositadas no banco de dados do NCBI e, posteriormente, analisadas no software PSIPRED, com o objetivo de investigar a estrutura secundária da proteína, bem como as variações encontradas nas sequências das variantes, em relação à sequência protótipo K02718.

O software PSIPRED disponibiliza uma acurácia dos resultados obtidos com a análise das sequências das variantes estudadas, permitindo gerar dados mais robustos sobre a estrutura e a topologia destas proteínas transmembranares (Apêndice 1).

### 5.3 MAPEAMENTO DE EPÍTOPOS IMUNOGÊNICOS

Em relação a predição dos epítomos para os alelos MHC-I e MHC-II, está evidente que a diversidade dos alelos MHC é variável entre os inúmeros grupos étnicos, o que também é percebido pela resposta imune, de acordo com a diversidade genotípica encontrada entre as variantes de HPV16.

De acordo com o mapeamento dos epítomos realizado mediante o uso dos padrões estabelecidos na plataforma IEDB, foi observado que a sequência da oncoproteína 16E5 da amostra de referência K02718, formou epítomos imunogênicos com moléculas pertencentes ao MHC-I (HLA-A e HLA-B) e MHC-II (HLA-DR).

Para o MHC-I, o principal método escolhido pela plataforma foi o método Consensus (ann/smm) e os principais epítomos estão mapeados com as moléculas HLA-A\*26:01 (FIVYIIFVY; posição 60-68), HLA-A\*02:01 (LLIRPLLSV; posição 27-36), que obtiveram o Percentile rank de 0.17. O mesmo método Consensus (ann/smm) adotado pelo software IEDB, permitiu elencar outros epítomos, tais como HLA-A\*02:03, HLA-A\*02:06, HLA-A\*68:01, HLA-A\*68:02, HLA-A\*33:01, HLA-A\*23:01.

Em relação aos alelos HLA-B, o melhor Percentile rank foi de 0.41, mediante a análise do método Consensus (ann/smm), representado pelo alelo HLA-B\*15:01 (ASAFRCFIVY; posição 54-63); no entanto, outros alelos também foram anotados, tais como o HLA-B\*51:01 e o HLA-B\*57:01. Não foi observado formação de epítomos imunogênicos com moléculas HLA-C. O escore de imunogenicidade obtido para a amostra de referência foi de 1.85434.

Na análise dos epítomos mapeados com as moléculas pertencentes ao MHC-II (HLA-DR, -DP and -DQ), para a amostra de referência K02718, observamos que o método mais

utilizado foi o Consensus (comb.lib./smm/nn). Os valores de referência do IEDB para a seleção dos epítomos foram percentile rank < 1 e IC50(nM) <50, tendo sido considerados os parâmetros do SMM align IC50 (nM) and NN align IC50 (nM). Sendo assim, observamos que os principais epítomos formados pela amostra de referência K02718 foram representados pelos alelos HLA-DPA1\*01:03/DPB1\*02:01 (FIVYIIFVYIPLFLI; posição 60-74), HLA-DPA1\*03:01/DPB1\*04:02 (STYTSLIILVLLLWI; posição 37-51), HLA-DRB1\*07:01 (YIPLFLIHTHARFLI, posição 68-82), HLA-DQA1\*01:02/DQB1\*06:02 (TNLDTASTTLLACFL; posição 2-16), HLA-DQA1\*01:02/DQB1\*06:02 (MTNLDTASTTLLACF, posição 01-15), HLA-DPA1\*02:01/DPB1\*01:01 (RCFIVYIIFVYIPLF, posição 58-72), HLA-DRB1\*11:01 (LIILVLLLWITAASA, posição 42-56), HLA-DRB5\*01:01 (VYIIFVYIPLFLIHT, posição 62-76), HLA-DRB1\*01:01 (ILVLLLWITAASAFR, posição 44-58) e HLA-DRB1\*01:01 (IILVLLLWITAASAF, posição 43-57).

Na etapa de mapeamento dos epítomos imunogênicos, foram observadas várias regiões da proteína que apresentam interações com as moléculas do MHC-I e MHC-II, o que pode simbolizar uma forma de atuação do sistema imunológico afim de evitar uma evasão do vírus.

A predição computacional de regiões de ligação com moléculas do MHC classe I, vem sendo amplamente utilizada na identificação de epítomos imunogênicos e no desenvolvimento de estratégias vacinais. Para isso, várias ferramentas e pesquisas em bioinformática tem permitido a predição de sítios de ligação de peptídeos às moléculas pertencentes à classe I e II do MHC, a exemplo do software *on line* IEDB.

A relevância destes achados, que envolve um estudo *in silico* da oncoproteína E5, 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 oncoproteína E5, nas células infectadas, tem demonstrado o potencial de alterar a apresentação dos antígenos celulares, reduzindo a expressão de moléculas do antígeno leucocitário humano (HLA), de Classe I, e também está relacionado em alterar a expressão de moléculas do MHC classe II na superfície celular (Ashrafi et al., 2005; Zhang et al., 2007).

A regulação do MHC classe I por E5, para impedir o reconhecimento das células infectadas pelos linfócitos T citotóxicos, ajuda a diminuir a sua expressão na superfície celular, deixando as células suscetíveis ao reconhecimento e ataque pelas células Natural Killers (NK). Estas células possuem receptores que reconhecem moléculas clássicas

(inclusive HLA-C), e não clássicas (HLA-E) de HLA classe I. Quando essas moléculas não estão presentes e não são reconhecidas ocorre a lise celular mediada por NK. Por este motivo, a oncoproteína E5 consegue inibir a expressão na superfície celular de HLA-A e HLA-B, mas não altera a expressão de HLA-C e HLA-E, evitando a morte celular tanto pela via de linfócitos T citotóxicos quanto pela via das células NK (CAMPO et al., 2010).

No Brasil, o HPV16 é um dos tipos virais com ampla distribuição nas diversas regiões do País, em especial na região Nordeste (CHAGAS et al., 2011, 2013; GURGEL et al., 2015). Inúmeras variantes do HPV16 têm sido identificadas em diferentes localidades e grupos étnicos ao redor do mundo, e exibe diferentes potenciais oncogênicos, indicando que algumas linhagens específicas podem afetar a persistência da infecção pelo HPV e a progressão das lesões precursoras do câncer cervical (LI et al., 2011; SUN et al., 2013).

As variantes do HPV16 diferem na prevalência e nas propriedades bioquímicas e biológicas, com implicações incertas na etiologia do câncer do colo do útero (PLEASA et al., 2014). No entanto, a distribuição de variantes do oncogene 16E5 no Brasil, ainda não foi devidamente avaliado.

Diversos estudos têm mostrado que as variantes do HPV16 apresentam diferentes efeitos no que tange à sua patogênese, sendo observado mudanças na taxa de replicação celular com ampla multiplicação, além de modificações na transcrição de alguns genes, como aqueles relacionados à apoptose e, este cenário, contribui com a eficiência, persistência e a progressão da infecção viral (CHAGAS et al., 2011, 2013; FREITAS et al., 2012; BURK et al., 2013). Por exemplo, em HPV16, tem-se observado que os polimorfismos presentes nas linhagens não-européias (B, C e D), as tornam com uma maior capacidade de desenvolver o seu potencial carcinogênico, em relação aos polimorfismos identificados em variantes da linhagem europeia (A) (SCHIFFMAN et al., 2010; SMITH et al., 2011).

Nath et al. (2006), avaliaram o impacto das seguintes variantes de 16E5: Leu<sup>44</sup>Val<sup>65</sup>, Thr<sup>37</sup>Leu<sup>44</sup>Val<sup>65</sup>, Thr<sup>64</sup> e Tyr<sup>8</sup>Leu<sup>44</sup>Val<sup>65</sup>, cujos produtos de amplificação foram clonados em *pcDNA3.1Myc-His* e, posteriormente, avaliaram os resultados destas construções em células NIH-3T3 transfectadas. Os resultados observados foram um aumento nos níveis de expressão da construção Tyr<sup>8</sup>Leu<sup>44</sup>Val<sup>65</sup> em relação a Thr<sup>37</sup>Leu<sup>44</sup>Val<sup>65</sup> e Leu<sup>44</sup>Val<sup>65</sup>, e baixos níveis de transcritos gerados pela variante Thr<sup>64</sup>.

A variante Leu<sup>44</sup>Val<sup>65</sup> foi a responsável em provocar a maior redução na fase G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> e, nas etapas subsequentes do ciclo celular, um aumento da fase G<sub>2</sub>-M, sugerindo que estas variantes estejam relacionadas ao crescimento celular (NATH et al., 2006).

I65V e I44L também foram relacionados à repressão de p21 (NATH et al., 2006). Apesar dos resultados apresentados, ainda não dispomos de relatos sobre o papel exercido pelos polimorfismos em 16E5 isoladamente, nem tampouco de construções gênicas contendo múltiplas substituições de nucleotídeos numa mesma variante.

Estruturalmente, 16E5 corresponde a uma proteína  $\alpha$ -hélice transmembrana (BIBLE et al., 2000; NATH et al., 2006; SAAVEDRA et al., 2012).

Plesa et al. (2014), realizaram uma análise dos polimorfismos circulantes na Romênia e as mutações mais prevalentes foram T3904A, T3910C, G3919C, T3928C, A3978C, T3988C, T3991G, T4033C, A4041G/C, onde os respectivos códons mutantes passaram a ser representados pelos seguintes resíduos de aminoácidos: F19I, V21A, C24S, L27P, I44L, L47S, L48A, V62A, I65V/L.

O sequenciamento do oncogene 16E5 e a análise da sua heterogeneidade também foi avaliado em amostras de pacientes com neoplasia intraepitelial grau III (CIN III) e carcinoma cervical na Suécia, onde um total de 09 variações foram identificadas, dentre as quais cinco delas não-sinônimas, e as mais comuns ocorreram na posição 3979 e 4042 (HU et al., 2001). Este resultado reflete a circulação das variantes nos resíduos 44 e 65 da oncoproteína E5 na Suécia e, como já apresentado, esta variação também esteve amplamente distribuída na população do Reino Unido.

Todas estas variações intratípicas se tornaram objeto de estudo para a avaliação dos epítomos imunogênicos formados pelas variantes 16E5. Este fato se deve, principalmente, por saber que esta oncoproteína tem sido considerada um alvo de estudo para o desenvolvimento de estratégias imunoterapêuticas e para o desenvolvimento de vacinas (CORDEIRO et al., 2014). Sendo assim, uma análise *in silico* prévia contribui para o delineamento de novas estratégias imunoterapêuticas.

Kumar et al. (2015), idealizou um estudo *in silico* objetivando a identificação de epítomos da oncoproteína E5 do HPV16, utilizando a sequência de referência K02718 do HPV16. Para o mapeamento dos epítomos, foi utilizado a plataforma IEDB, cujos os parâmetros para o MHC-I foram percentile value < 1.0 e, para o MHC-II, além do percentile value <1.0, foram considerados os parâmetros de IC50 value (<50nM). Considerando os principais alelos distribuídos na população indiana, o servidor IEDB listou os principais epítomos relacionados aos alelos para o MHC-I e MHC-II.

Finalmente, 16E5 por se tratar de uma oncoproteína que atua nas fases iniciais do ciclo infeccioso, os resultados obtidos justificam uma melhor investigação sobre a biologia da



infecção para o estudo de novos métodos que possam estar relacionados com o desenvolvimento de estratégias imunoterapêuticas.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização do Software MEGA6 se mostrou como uma importante ferramenta de identificação de regiões polimórficas do oncogene e da oncoproteína E5 do HPV16.

As mutações não-sinônimas promovem sensíveis mudanças no arcabouço da estrutura secundária da oncoproteína 16E5. No entanto, é necessário realizar estudos com cultura de células para se averiguar o impacto destas mutações sobre a persistência e progressão das lesões.

Embora o exame do Papanicolau seja considerado o padrão-ouro e adotado pelo Ministério da Saúde, no Brasil, ficou evidenciado que a análise molecular traz resultados mais conclusivos sobre a presença de variantes com alto potencial oncogênico presentes em lesões de baixo grau.

O estudo e o mapeamento de epítomos imunogênicos são extremamente úteis para a idealização de novas estratégias de identificação e combate à progressão das lesões de forma precoce.

As análises *in silico* foram fundamentais para a identificação de regiões relacionadas à formação de epítomos imunogênicos. As variações encontradas na sequência de aminoácidos da oncoproteína E5 dos HPVs 16 e 31, apresentaram regiões de epítomos com o MHC classe I e MHC classe II.

As moléculas do complexo HLA-A estão mais relacionadas com a ação da oncoproteína 16E5 e 31E5. No entanto, outras moléculas não-clássicas também podem ser alvos moleculares de E5, comprometendo o sistema imunológico do paciente.

As substituições de aminoácidos presentes na oncoproteína 16E5, conduziram para discretas modificações na estrutura secundária, que pode refletir numa interação celular diferenciada entre a oncoproteína E5 e os seus alvos.

A biologia computacional traz uma nova vertente de estudo científico, onde os custos podem ser minimizados, utilizando-se pacotes de softwares, antes da idealização de experimentos e a replicação destes dados até a sua validação.

O estudo dessas variantes implica na ampliação do conhecimento sobre o potencial de infecção das variantes dos HPVs 16 e 31, além de contribuir para melhorar nosso conhecimento sobre sua construção genética e seu potencial carcinogênico.

As mutações identificadas precisam ser avaliadas com o auxílio de estudos funcionais que levem a uma melhor interpretação do impacto dessas mutações no curso do processo carcinogênico, uma vez que os testes *in silico* demonstraram alterações conformacionais na estrutura proteica das variantes estudadas, bem como a formação de epítomos imunogênicos, que pode ser útil para o desenvolvimento de estratégias imunoterapêuticas.

## REFERÊNCIAS

- ABRAMOWITZ, Laurent et al. Epidemiological and economic burden of potentially HPV-related cancers in France. **Plos One**, [s.l.], v. 13, n. 9, e0202564, set. 2018.
- ANAYA-SAAVEDRA, Gabriela et al. HPV oral lesions in HIV-infected patients: the impact of long-term HAART. **Journal Of Oral Pathology & Medicine**, [s.l.], v. 42, n. 6, p.443-449, dez. 2012.
- ANGHEBEM-OLIVEIRA, M.; MERLI, J. C. A proteína p16 é um novo marcador para progressão neoplásica no colo uterino? **RBAC**, v. 42, n. 3, p. 181-185, 2010.
- ASHRAFI, G. Hossein et al. E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I. **International Journal Of Cancer**, [s.l.], v. 113, n. 2, p.276-283, jan. 2004.
- BERGVALL, Monika; MELENDY, Thomas; ARCHAMBAULT, Jacques. The E1 proteins. **Virology**, [s.l.], v. 445, n. 1-2, p.35-56, out. 2013.
- BERNARD, Hans-ulrich et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**, [s.l.], v. 401, n. 1, p.70-79, maio 2010.
- BERNARD, Hans-ulrich. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. **Journal Of Clinical Virology**, [s.l.], v. 32, p.1-6, mar. 2005.
- BERUMEN, J. et al. Asian-American Variants of Human Papillomavirus 16 and Risk for Cervical Cancer: a Case-Control Study. **Jnci Journal Of The National Cancer Institute**, [s.l.], v. 93, n. 17, p.1325-1330, set. 2001.
- BIBLE, Jon M. et al. Cervical lesions are associated with human papillomavirus type 16 intratypic variants that have high transcriptional activity and increased usage of common mammalian codons. **Journal Of General Virology**, [s.l.], v. 81, n. 6, p.1517-1527, jun. 2000.
- BRAVO, I. G.; ALONSO, A.. Mucosal Human Papillomaviruses Encode Four Different E5 Proteins Whose Chemistry and Phylogeny Correlate with Malignant or Benign Growth. **Journal Of Virology**, [s.l.], v. 78, n. 24, p.13613-13626, nov. 2004.
- BURK, Robert D.; HARARI, Ariana; CHEN, Zigui. Human papillomavirus genome variants. **Virology**, [s.l.], v. 445, n. 1-2, p.232-243, out. 2013.
- CAMARA, G. N. N. L. et al. Os papilomavírus humanos–HPV: Carcinogênese e imunogênese. **Universitas Ciências da Saúde**, [s.l.], v. 1, n. 1, p. 159-168, 2003.
- CECCARELLI, Manuela et al. Head and neck squamous cell carcinoma and its correlation with human papillomavirus in people living with HIV: a systematic review. **Oncotarget**, [s.l.], v. 9, n. 24, p.17171-17180, mar. 2018.

CHAGAS, Bárbara S. et al. New variants of E6 and E7 oncogenes of human papillomavirus type 31 identified in Northeastern Brazil. **Gynecologic Oncology**, [s.l.], v. 123, n. 2, p.284-288, nov. 2011.

CHAGAS, Bárbara Simas et al. Novel E6 and E7 oncogenes variants of human papillomavirus type 31 in Brazilian women with abnormal cervical cytology. **Infection, Genetics And Evolution**, [s.l.], v. 16, p.13-18, jun. 2013.

CHANG, J. L. et al. The expression of HPV-16 E5 protein in squamous neoplastic changes in the uterine cervix. **Journal Of Biomedical Science**, [s.l.], v. 8, n. 2, p.206-213, mar. 2001.

CHEN, X. et al. Prevalence and genotype distribution of human papillomavirus in 961,029 screening tests in southeastern China (Zhejiang Province) between 2011 and 2015, **Scientific Reports**, China , v. 7, n. 14813, p. 1-8, nov./2017.

CIBULA, D. et al. The European Society of Gynaecological Oncology/European Society for Radiotherapy and Oncology/European Society of Pathology Guidelines for the Management of Patients With Cervical Cancer. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 28, n. 4, p. 641-655, Maio 2018.

CLIFFORD, G M et al. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. **British Journal Of Cancer**, [s.l.], v. 89, n. 1, p.101-105, jul. 2003.

CORDEIRO, Marcelo Nazário et al. Anti-tumor effects of genetic vaccines against HPV major oncogenes. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.45-52, nov. 2014.

DIMAIO, Daniel; PETTI, Lisa M. The E5 proteins. **Virology**, [s.l.], v. 445, n. 1-2, p.99-114, out. 2013.

DINIZ, M. O. et al. Immune Responses and Therapeutic Antitumor Effects of an Experimental DNA Vaccine Encoding Human Papillomavirus Type 16 Oncoproteins Genetically Fused to Herpesvirus Glycoprotein D. **Clinical and Vaccine Immunology**, [s.l.], v. 17, n. 10, p.1576-1583, 25 ago. 2010.

DOORBAR, John. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. **Virology**, [s.l.], v. 445, n. 1-2, p.80-98, out. 2013.

EBRAHIMI, A. et al. Comparison of the risk factors and HPV types in males with anogenital warts with and without involvement of the urethral meatus in western Iran. *Acta Dermatovenerologica APA, Iran.*, v. 6, p. 55-58, abr/ ago, 2017.

FELDMAN, S., GOODMAN, A., PEIPERT, J. F. Screening for cervical cancer. UpToDate. 2019.

FERLAY, Jacques et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal Of Cancer**, [s.l.], v. 136, n. 5, p.359-386, 9 out. 2014.

FERRARO, C. L. L. et al. Infecção oral pelo HPV e lesões epiteliais proliferativas associadas. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 47, n. 4, p. 451-459, agosto. 2011.

FREITAS, Antonio Carlos de et al. HrHPV E5 oncoprotein: immune evasion and related immunotherapies. *Journal Of Experimental & Clinical Cancer Research*, [s.l.], v. 36, n. 1, p.1-15, 25 maio 2017.

FREITAS, Antonio Carlos de et al. Susceptibility to cervical cancer: An overview. *Gynecologic Oncology*, [s.l.], v. 126, n. 2, p.304-311, ago. 2012.

GURGEL, Ana Pavla Almeida Diniz et al. Prevalence of Human Papillomavirus Variants and Genetic Diversity in the L1 Gene and Long Control Region of HPV16, HPV31, and HPV58 Found in North-East Brazil. *Biomed Research International*, [s.l.], v. 2015, p.1-12, 2015.

HALDORSEN, I. S, et al. What Is the Role of Imaging at Primary Diagnostic Work-Up in Uterine Cervical Cancer?. *Current Oncology Report*. V. 21, N. 9, P.77, 2019.

HOFFMANN, Tiago. Influência da educação proporcionada pela atenção básica na redução de casos de infecção pelo hpv em mulheres sexualmente ativas. 2015. 15 f. **Trabalho de Conclusão de Curso** (especialização) – Universidade Federal do Ceará; Fortaleza, Ceará.

HU, Xinrong et al. Oncogene lineages of human papillomavirus type 16 E6, E7 and E5 in preinvasive and invasive cervical squamous cell carcinoma. *The Journal Of Pathology*, [s.l.], v. 195, n. 3, p.307-311, ago. 2001.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativas 2018: incidência de Câncer no Brasil**. INCA, 2018.

JOURA, Elmar A. et al. A 9-Valent HPV Vaccine against Infection and Intraepithelial Neoplasia in Women. *New England Journal Of Medicine*, [s.l.], v. 372, n. 8, p.711-723, 19 fev. 2015.

KAVATI, Erica Akemi. **Interação de oncoproteínas virais E6 e E7 de HPV16/18 com alvos celulares potenciais para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas**. 2012. 50 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia, Universidade de Paulo, São Paulo, 2012.

KRASHIAS, G. et al. HPV prevalence and type distribution in Cypriot women with cervical cytological abnormalities. *BMC Infectious Diseases*, Cyprus, v. 17, n. 346, p. 1-10, 2017. Disponível em: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

KRÖGER, P. **Molecular Biology Data: Database Overview, Modelling Issues, and Perspectives**. Zorneding, 2001.

KUMAR, Anoop et al. Identification of immunotherapeutic epitope of E5 protein of human papillomavirus-16: An in silico approach. *Biologicals*, [s.l.], v. 43, n. 5, p.344-348, set. 2015.

LEE, S. I.; CATALANO, O. A.; DEHDASHTI, F. Evaluation of Gynecologic Cancer with MR Imaging, 18F-FDG PET/CT, and PET/MR Imaging. *The journal of nuclear medicine*, v. 56, n. 3, March 2015.

LI, Ni 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**, [s.l.], v. 128, n. 4, p.927-935, 19 abr. 2010.

LI, N. et al. Persistence of type-specific human papillomavirus infection among Daqing City women in China with normal cytology: a pilot prospective study. **Oncotarget**, v. 8, n. 46, p. 81455-81461, Agosto 2017.

LIAO, Shujie et al. A novel “priming-boosting” strategy for immune interventions in cervical cancer. **Molecular Immunology**, [s.l.], v. 64, n. 2, p.295-305, abr. 2015.

LIMA, M. A. P; SILVA, C. G. L; Rabenhors, S. H. B. Papel das Proteínas Precoces do Papilomavírus Humano na Carcinogênese. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 59, n.4, p. 565-573. 2013.

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. 111-122, jan./jun. 2012.

LIU, D. W. et al. Induction of CD8 T Cells by Vaccination with Recombinant Adenovirus Expressing Human Papillomavirus Type 16 E5 Gene Reduces Tumor Growth. **Journal Of Virology**, [s.l.], v. 74, n. 19, p.9083-9089, out. 2000.

LIU, D.-w. et al. Cytotoxic T-Lymphocyte Responses to Human Papillomavirus Type 16 E5 and E7 Proteins and HLA-A\*0201-Restricted T-Cell Peptides in Cervical Cancer Patients. **Journal Of Virology**, [s.l.], v. 81, n. 6, p.2869-2879, jan. 2007.

LIU, Zhida et al. A novel dendritic cell targeting HPV16 E7 synthetic vaccine in combination with PD-L1 blockade elicits therapeutic antitumor immunity in mice. **Oncoimmunology**, [s.l.], v. 5, n. 6, e1147641, mar. 2016.

MARIANI, Luciano; PAGLIUSI, Sonia. Vaccination and screening programs: harmonizing prevention strategies for HPV-related diseases. **Journal Of Experimental & Clinical Cancer Research**, [s.l.], v. 27, n. 1, p.1-6, dez. 2008.

MAYRAND, M et al. Detection of Human Papillomavirus Type 16 DNA in Consecutive Genital Samples Does Not Always Represent Persistent Infection as Determined by Molecular Variant Analysis. **Journal Of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 38, n. 9, p.3388-3393, set. 2000.

MCBRIDE, Alison A. The Papillomavirus E2 proteins. **Virology**, [s.l.], v. 445, n. 1-2, p.57-79, out. 2013.

MCGUFFIN, L. J.; BRYSON, K.; JONES, D. T.. The PSIPRED protein structure prediction server. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 16, n. 4, p.404-405, abr. 2000.

MONFRÉ, Elaine Rodrigues Mello. **Avaliação dos níveis de citocinas e HLA-G solúvel em linhagens celulares tumorais de colo uterino tratadas com alcalóides de *Pterogyne nitens***. 2011. xi, 176 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2011.

MUÑOZ, Nubia et al. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**, [s.l.], v. 24, p.S1-S10, ago. 2006.

NATH, Rahul et al. Analyses of variant human papillomavirus type-16 E5 proteins for their ability to induce mitogenesis of murine fibroblasts. **Cancer Cell International**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.1-9, ago. 2006.

OTTO, S. E.Oncologia. Rio de Janeiro: **Reichamann & Afonso Editores**, 2002.

PALADINI, Laura et al. Targeting microRNAs as key modulators of tumor immune response. **Journal Of Experimental & Clinical Cancer Research**, [s.l.], v. 35, n. 1, p.1-19, jun. 2016.

PATEL, Pragna et al. Incidence of Types of Cancer among HIV-Infected Persons Compared with the General Population in the United States, 1992–2003. **Annals Of Internal Medicine**, [s.l.], v. 148, n. 10, p.728-736, maio 2008.

PERALTA-ZARAGOZA, Oscar et al. Targeted treatments for cervical cancer: a review. **Oncotargets And Therapy**, [s.l.], v. 5, p.315-328, nov. 2012.

PLESA, Adriana et al. Molecular variants of human papilloma virus 16 E2, E4, E5, E6 and E7 genes associated with cervical neoplasia in Romanian patients. **Archives Of Virology**, [s.l.], v. 159, n. 12, p.3305-3320, ago. 2014.

POTTER, C. D. et al. The European Society of Gynaecological Oncology/European Society for Radiotherapy and Oncology/European Society of Pathology Guidelines for the Management of Patients With Cervical Cancer. **International Journal Of Gynecologic Cancer**, [s.l.], v. 28, n. 4, p.641-655, maio 2018.

REBRIKOV, D V et al. Complete genome sequence of a novel extrachromosomal virus-like element identified in planarian *Girardia tigrina*. **Bmc Genomics**, [s.l.], v. 15, n. 3, p.1-9, jun. 2002.

RINCON R, Diego F; MORALES L, Liliana A; RINCON-OROZCO, Bladimiro. Modernas metodologías diagnosticas para la detección del Virus del Papiloma Humano y prevención del cáncer de cuello uterino. **Rev. Univ. Ind. Santander. Salud**, Bucaramanga , v. 49, n. 3, p. 478-488, Sept. 2017 .

ROMPALO, Anne. Preventing sexually transmitted infections: back to basics. **Journal Of Clinical Investigation**, [s.l.], v. 121, n. 12, p.4580-4583, 1 dez. 2011.

ROSALES, Ricardo; ROSALES, Carlos. Immune therapy for human papillomaviruses-related cancers. **World Journal Of Clinical Oncology**, [s.l.], v. 5, n. 5, p.1002-1019, dez. 2014.

SAAVEDRA-PEDRAZA, A. et al. Molecular Bases of Human Papillomavirus Pathogenesis in the Development of Cervical Cancer. In: BROEK, D. V. (Ed.). **Human Papillomavirus and Related Diseases - From Bench to Bedside - Research aspects**. [s.l.], 2012. ISBN: 978-953-307-855-7.

- SANTOS, J. G. C, DIAS, J. M. G. Vacinação pública contra o papilomavirus humano no Brasil. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 28, n. 1958, 2018.
- SANJOSE, Silvia de et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. **The Lancet Oncology**, [s.l.], v. 11, n. 11, p.1048-1056, nov. 2010.
- SAPP, Martin; BIENKOWSKA HABA, M. et al. Viral entry mechanisms: human papillomavirus and a long journey from extracellular matrix to the nucleus. **Febs Journal**, [s.l.], v. 276, n. 24, p.7206-7216, out. 2009.
- SCHIFFMAN, M. et al. A Study of the Impact of Adding HPV Types to Cervical Cancer Screening and Triage Tests. **Jnci Journal Of The National Cancer Institute**, [s.l.], v. 97, n. 2, p.147-150, jan. 2005.
- SCHIFFMAN, M.; WENTZENSEN, N.. Human Papillomavirus Infection and the Multistage Carcinogenesis of Cervical Cancer. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, [s.l.], v. 22, n. 4, p.553-560, abr. 2013.
- SCHNELL, Jason R.; CHOU, James J.. Structure and mechanism of the M2 proton channel of influenza A virus. **Nature**, [s.l.], v. 451, n. 7178, p.591-595, jan. 2008.
- SMELTZER, S. C. BARE, B. G. Tratado de enfermagem médico-cirúrgico. **Brunner & Suddarth**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2016.
- SMITH, Benjamin et al. Sequence Imputation of HPV16 Genomes for Genetic Association Studies. **Plos One**, [s.l.], v. 6, n. 6, p. e21375, jun. 2011.
- STEENBERGEN, Renske D.m. et al. HPV-mediated transformation of the anogenital tract. **Journal Of Clinical Virology**, [s.l.], v. 32, supl. 1, p.25-33, mar. 2005.
- SUN, Zhengrong et al. Genetic variations of E6 and long control region of human papillomavirus type 16 from patients with cervical lesion in Liaoning, China. **Bmc Cancer**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.1-8, out. 2013.
- TAMURA, K. et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology And Evolution**, [s.l.], v. 28, n. 10, p.2731-2739, maio 2011.
- TAVARES, S. B. do N. et al. Controle da qualidade em citopatologia cervical: revisão de literatura. **Revista brasileira de cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 355-364, abr. 20.
- TRAVASSOS, A. G. et al. Predictors of HPV Incidence and Clearance in a Cohort of Brazilian HIV-Infected Women. **PLoS ONE**, United States, n. 12, v. 10, Set/out 2017.
- VAN DOORSLAER, Koenraad. Evolution of the Papillomaviridae. **Virology**, [s.l.], v. 445, n. 1-2, p.11-20, out. 2013.
- VENUTI, Aldo et al. Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. **Molecular Cancer**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.140-158, nov. 2011.



VICI, Patrizia et al. Immunologic treatments for precancerous lesions and uterine cervical cancer. **Journal Of Experimental & Clinical Cancer Research**, [s.l.], v. 33, n. 1, p.29-44, mar. 2014.

VILLA, L., MARTINS, N.; PEREYRA, E. **Biologia Molecular: conceitos e princípios básicos**. São Paulo: Frontis, 2000. p. 137-43.

VILLIERS, Ethel-michele de et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, [s.l.], v. 324, n. 1, p.17-27, jun. 2004.

WETHERILL, L. F.; ROSS R.; MACDONALD, A. HPV E5: an enigmatic oncoprotein. In: GASTON, K. (Ed.). **Small DNA Tumour Viruses**. Bristol: Caister Academic Press, 2012.

WHO. World Health Organization. Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer. World Health Organization, 2016. Disponível em: <http://www.who.int/immunization/topics/hpv/en/>. Acesso em: 30 ago. 2019.

WOODMAN, Ciaran B. J.; COLLINS, Stuart I.; YOUNG, Lawrence S.. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nature Reviews Cancer**, [s.l.], v. 7, n. 1, p.11-22, jan. 2007.

YU, Shui-lian et al. Antagonist-mediated down-regulation of toll-like receptors increases the prevalence of human papillomavirus infection in systemic lupus erythematosus. **Arthritis Research & Therapy**, [s.l.], v. 14, n. 2, p.80-82, abr. 2012.

ZHANG, Lei et al. Human papillomavirus infections among women with cervical lesions and cervical cancer in Eastern China: genotype-specific prevalence and attribution. **Bmc Infectious Diseases**, [s.l.], v. 17, n. 1, p.107-115, 31 jan. 2017.

ZHANG, Shen-ying et al. Human Toll-like receptor-dependent induction of interferons in protective immunity to viruses. **Immunological Reviews**, [s.l.], v. 220, n. 1, p.225-236, dez. 2007.

ZUR HAUSEN, Harald. Papillomavirus infections — a major cause of human cancers. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Reviews On Cancer**, [s.l.], v. 1288, n. 2, p. F55-F78, out. 1996.

ZUR HAUSEN, Harald. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nature Reviews Cancer**, [s.l.], v. 2, n. 5, p.342-350, maio 2002.



