

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL



SÁVIO AUGUSTO VIEIRA DE OLIVEIRA

**PERFIL DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE microRNAs NO COLO UTERINO EM
RESPOSTA À INFECÇÃO POR HPV E LESÃO CERVICAL**

RECIFE

2023

SÁVIO AUGUSTO VIEIRA DE OLIVEIRA

**PERFIL DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE microRNAs NO COLO UTERINO EM
RESPOSTA À INFECÇÃO POR HPV E LESÃO CERVICAL**



Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Medicina Tropical do centro de ciências médicas da Universidade Federal de Pernambuco para qualificação, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em ciências com ênfase em medicina tropical.

Área de concentração: Doenças infecto-parasitárias

Linha de Pesquisa: Infecções virais

Orientadoras: Dra. Virginia Maria Barros de Lorena

Dra. Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva

RECIFE

2023

O48p Oliveira, Sávio Augusto Vieira de.
 Perfil de expressão diferencial de micrnas no colo uterino em resposta à infecção por hpv e lesão cervical / Sávio Augusto Vieira de Oliveira – 2023.
 100 p.

Orientadora: Virgínia Maria Barros de Lorena
 Coorientadora: Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva
 Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Médicas. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Recife, 2023.
 Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Papilomavírus humano. 2. Patogenicidade. 3. Câncer de Colo Uterino. 4. Proteína E6. 5. Proteína E7. Lorena, Virgínia Maria Barros de (orientadora). II. Título.

616.988 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2023 - 255)



SÁVIO AUGUSTO VIEIRA DE OLIVEIRA

**PERFIL DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE microRNAs NO COLO UTERINO EM
RESPOSTA À INFECÇÃO POR HPV E LESÃO CERVICAL**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Medicina Tropical do centro de ciências médicas da Universidade Federal de Pernambuco para qualificação, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em ciências com ênfase em medicina tropical.

Área de concentração: Doenças infecto-parasitárias
Linha de Pesquisa: Infecções virais

Data de aprovação: 29.08.2023

Dr^a Renata dos Santos Almeida

Membro externo – Coordenação de Gestão de Programas de Pesquisa
(COPP)/CGFPS/DECIT/SECTICS/Ministério da Saúde

Dr. Luydson Richardson Silva Vasconcelos

Membro externo – Parasitologia, Fiocruz-PE

Dr^a Elisa de Almeida Neves Azevedo

Membro externo – Virologia, Fiocruz-PE

Dr^a Maria Amélia Vieira Maciel

Membro interno – PPGMedTrop, UFPE

Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto

Membro interno – PPGMedTrop, UFPE

Orientadoras:

Dr^a Virginia Maria Barros de Lorena

Orientadora – Imunologia, Fiocruz-PE

Dr^a Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva

Orientadora – Imunologia, Fiocruz-PE



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Alfredo Macedo Gomes

PRÓ-REITORA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Carol Virgínia Góis Leandro

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS

Luiz Alberto Mattos

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
TROPICAL**

Heloísa Ramos Lacerda de Melo

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
TROPICAL**

Vláudia Maria de Assis Costa

CORPO DOCENTE

Ana Catarina de Souza Lopes
Ana Lúcia Coutinho Domingues
André de Lima Aires
Carlos Alexandre Antunes de Brito
Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto
Fábio André Brayner dos Santos
Heloísa Ramos Lacerda de Melo
Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho
Paulo Sérgio Ramos de Araújo
Reginaldo Gonçalves de Lima Neto
Rejane Pereira Neves
Ricardo Arraes de Alencar Ximenes
Valdênia Maria Oliveira de Souza
Virginia Maria Barros de Lorena
Vláudia Maria de Assis Costa

CORPO DOCENTE COLABORADOR

Célia Maria Machado Barbosa de Castro
Líbia Cristina Rocha Vilela Moura
Maria Amélia Vieira Maciel

*À minha família, especialmente, meus pais,
minha irmã e minha esposa por permanecerem me
apoiando durante a realização do meu doutorado.*

AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer a mim mesmo, por ter a perseverança de continuar trabalhando e desenvolvendo este projeto durante o decorrer do processo de doutorado, tendo em vista as dificuldades enfrentadas, acredito ter realizado o melhor trabalho possível. Pois, confesso que esta jornada acadêmica, apesar linda e gratificante, por vezes foi desnecessariamente exaustiva e difícil, fatos que em certo momento quase me fizeram desistir.

Ao meu núcleo familiar, agradeço imensamente por terem sido base fundamental me fornecendo o apoio para que eu pudesse chegar onde cheguei e conquistar tudo que conquistei, por serem meus exemplos e me mostrarem diariamente o amor, a integridade, a gentileza e a generosidade, virtudes as quais eu sempre tentei direcionar às pessoas que me cercam e ao meu ambiente de trabalho tornando propício o desenvolvimento de uma construção colaborativa.

Ainda, aos familiares e amigos, vocês sempre se fizeram presentes em minha vida e eu gostaria de agradecer por todos os momentos felizes em que criamos juntos, pelos sorrisos genuínos e descontrolados que foram trocados, por cada piada, por cada brinde e cada encontro. Pois, foram estes momentos que trouxeram alívio durante o turbilhão de estresse, e tenho certeza que esta alegria e a motivação foi um dos fatores que me possibilitou concluir esta etapa.

A dr^a Norma Lucena por além de sua orientação acadêmica, por ter me possibilitado experienciar, definir e defender um posicionamento profissional em momentos conflituosos no ambiente de trabalho. Por me ajudar a desenvolver, através de exemplos, minha resiliência emocional aperfeiçoando meus processos de percepção e gestão interpessoal. Acredito que as situações vivenciadas e as dificuldades superadas contribuíram na minha formação profissional, pois, através delas pude estabelecer resoluções que me prepararam para ser um profissional de excelência.

A dr^a Virgínia Lorena pela orientação, pela força, pela amizade, por sua empatia, pela alegria com a qual sempre me recebia e pelas conversas que tivemos, elas me apontaram possibilidades, me acalmaram e me ajudaram a “segurar a barra” durante os momentos de maior dificuldade durante desenvolvimento do projeto.

Aos meus companheiros de laboratório, obrigado pela convivência, pela amizade, pelos momentos de conversa e escuta, além de toda ajuda que compartilhamos em nossas caminhadas.

Por fim, a todos que de maneira direta e indireta contribuíram para a conclusão desta tese, sou extremamente grato.

“A tarefa mais importante de uma pessoa que vem ao mundo é criar algo”.

Paulo Freire

OLIVEIRA, Sívio Augusto Vieira. Perfil de expressão diferencial de microRNAs no colo uterino em resposta à infecção por HPV e lesão cervical. 2023. Tese (doutorado em Medicina tropical) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2023.

RESUMO

MicroRNAs são pequenos RNAs não codificantes endógenos que influenciam os processos celulares pela regulação de vias. Embora o papilomavírus humano (HPV) seja considerado o principal fator etiológico no desenvolvimento do câncer cervical, os mecanismos de persistência viral e inflamação crônica que desencadeiam o processo oncogênico ainda não são totalmente compreendidos. Este projeto investigou o perfil de miRNA celular associado à infecção por HPV e seu impacto no desenvolvimento do câncer. Assim, realizamos estudos comparativos visando identificar microRNAs diferencialmente expressos (DE_miRNAs), além de validar sua expressão diferencial em células cervicais. Os DE_miRNAs foram descobertos através de técnicas de mineração de dados por bioinformática utilizando o banco de dados público do TCGA. As análises de mineração foram idealizadas através de uma série de processos de filtração, visando a diminuição da taxa de falsa descoberta e a relação entre os DE_miRNAs, as oncoproteínas (E6 e E7) e os genes supressores de tumor (p53 e pRb). Posteriormente, validamos os resultados em amostras cervicais com lesões pré-cancerosas. A análise de bioinformática sugeriu que a superexpressão de miR-150-3p e miR-330-3p e que a subexpressão de miR-204-3p estavam associadas ao desenvolvimento de câncer cervical secundário à infecção por HPV. No entanto, a validação funcional mostrou que o miR-150-3p não estava associado à infecção pelo HPV ou à gravidade da lesão. Porém, baixos níveis de miR-330-3p e altos níveis de miR-204-3p foram associados à infecção por HPV em lesões pré-cancerosas cervicais, sugerindo que a mudança de padrão desencadeia a tumorigênese, ao passo que o miR-150-3p parece estar associado ao processo de malignização. Salientamos que validações experimentais mais aprofundadas com foco em mecanismos de interação miRNA-mRNA dos genes-alvo impactados, no aumento do número amostral utilizado para as etapas de confirmação e na determinação da biodisponibilidade dessas moléculas em diferentes tipos amostrais poderá viabilizar o uso potencial das biomoléculas identificadas como ferramentas diagnósticas do sistema único de saúde, sendo utilizadas como biomarcadores nos processos de infecção, de prognóstico e de estadiamento do câncer cérvico-uterino.

Palavras-chave: papilomavírus humano; patogenicidade; Câncer de Colo Uterino; proteína E6; proteína E7; microRNAs.

OLIVEIRA, Sávio Augusto Vieira. Differential expression profile of uterine colon microRNAs in response to HPV infection and cervical injury. 2023. Thesis (doctorate in Tropical Medicine) - Federal University of Pernambuco, Recife, 2023.

ABSTRACT

MicroRNAs are endogenous small non-coding RNAs that influence cellular processes by regulating pathways. Although the human papillomavirus (HPV) is considered the main etiological factor in the development of cervical cancer, the mechanisms of viral persistence and chronic inflammation that trigger the oncogenic process are not yet fully understood. This project investigated the cellular miRNA profile associated with HPV infection and its impact on cancer development. Therefore, we carried out comparative studies aiming to identify differentially expressed microRNAs (DE_miRNAs), in addition to validating their differential expression in cervical cells. DE_miRNAs were discovered through bioinformatics data mining techniques using the TCGA public database. The mining analyzes were designed through a series of filtration processes, aiming to reduce the false discovery rate and the relationship between DE_miRNAs, oncoproteins (E6 and E7) and tumor suppressor genes (p53 and pRb). We subsequently validated the results on cervical samples with precancerous lesions. Bioinformatics analysis suggested that over expression of miR-150-3p and miR-330-3p and under expression of miR-204-3p were associated with the development of cervical cancer secondary to HPV infection. However, functional validation showed that miR-150-3p was not associated with HPV infection or lesion severity. However, low levels of miR-330-3p and high levels of miR-204-3p were associated with HPV infection in cervical precancerous lesions, suggesting that the pattern change triggers tumorigenesis, whereas miR-150-3p 3p appears to be associated with the malignancy process. We emphasize that more in-depth experimental validations focusing on mechanisms of miRNA-mRNA interaction of impacted target genes, increasing the sample number used for confirmation steps and determining the bioavailability of these molecules in different sample types may enable the potential use of biomolecules identified as diagnostic tools of the unified health system, being used as biomarkers in the processes of infection, prognosis and staging of cervical-uterine cancer.

Keywords: Human Papillomavirus Viruses; HPV Pathogenicity; Uterine Cervical Neoplasms; E6 Protein; E7 Protein; microRNAs.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ranque de incidência, mortalidade e prevalência no mundo por tipo de câncer (2020).....	19
Figura 2 – Ranque de incidência e mortalidade no câncer do colo uterino por continente (2020).....	20
Figura 3 – Prevalência, em números absolutos de casos e taxas ajustadas pela população mundial, de câncer do colo do útero no mundo (2020).....	21
Figura 4 – Incidência, em números absolutos de casos e taxas ajustadas pela população mundial, de câncer do colo do útero no mundo (2020).....	22
Figura 5 – Mortalidade, em números absolutos de casos e taxas ajustadas pela população mundial, de câncer do colo do útero no mundo (2020).....	23
Figura 6 – Principais dados epidemiológicos do câncer de colo uterino do Brasil (2020).....	24
Figura 7 – Taxa de mortalidade ajustada pela população mundial por câncer do colo do útero nas regiões do Brasil no período de (1979 – 2020).....	25
Figura 8 – Tipos histológicos do câncer de colo uterino.....	26
Figura 9 – Principais etapas no desenvolvimento do câncer de colo uterino.....	27
Figura 10 – Incidência bruta dos casos de câncer associados a agentes infecciosos como fatores etiológicos no mundo, subdivididos por espécies (2020).....	29
Figura 11 – Incidência bruta dos casos de câncer associados a agentes infecciosos como fatores etiológicos na América Latina, subdivididos por espécies (2020).....	29
Figura 12 – Genoma do HPV e a expressão de suas proteínas durante o processo de maturação do epitélio infectado.....	30
Figura 13 – Vias desreguladas pela expressão das oncoproteína E6.....	35
Figura 14 – Vias desreguladas pela expressão das oncoproteína E7.....	36
Figura 15 – Mecanismo da oncoproteína E5 regulando o sistema imune através da regulação do MCH/HLA nas células e vias que a expressão dessa proteína é capaz de desregular.....	37
Figura 16 – Biogênese do miRNA e função no RNA mensageiros alvo.....	39
Figura 17 – Ação de regulação de forma endócrina dos miRNAs.....	40
Figura 18 – Alinhamento realizado contra o banco de dados específico HPV-PAVE.....	54

Figura 19 – Estrutura das interações entre miR-mRNA.....	65
Figura 20 – Principais genes alvo relacionados a via do câncer enriquecidos pela base de dados de vias KEGG para miR-150-3p, miR-204-3p e miR-330-3p, classificados por interação e modulação dirigidas por miRNA.....	67
Figura 21 – Mapeamento cruzado para os miR-204-3p e miR-330-3p dos genes destacados na via de câncer (KEEG) e seus processos biológicos (GO).....	70
Figura 22 – Níveis de expressão de miRNAs por infecção por HPV e status de lesão intraepitelial escamosa (SIL), respectivamente, quantificação relativa para hsa-miR-150-3p, hsa-miR-204-3p e hsa-miR-330-3p.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tipos mais comuns de HPV em lesões da pele e mucosa anogenital.....	32
Tabela 2 – Cepas infectantes incluídas na análise de expressão diferencial de miRNA com o respectivo número de pacientes de cada grupo.....	52
Tabela 3 – Perfil de infecção por tipos de cepas de HPV em dois centros de referência, IMIP e CISAM, localizados em Recife-PE no período de 2018-2020.....	53
Tabela 4 – Predição da interação entre miRNA, oncogenes de HPV e genes supressores de tumor humano. Os miRNAs expressos diferencialmente em células cervicais infectadas por HPV em comparação com as não infectadas foram testados quanto à afinidade de ligação aos genes virais E6 e E7 e aos genes humanos TP53 e RB1, usando a energia livre de Gibbs (ΔG) de -30 Kcal/mol como o corte.....	62
Tabela 5 – Características das interações DE_miRNA/mRNA. A energia livre de Gibbs (ΔG) estima a afinidade de ligação presumida. O primeiro nucleotídeo da interação miRNA-sequência alvo indica o sítio de ligação no gene alvo, na sequência codificante (CDS) e na região 3' não traduzida (3'UTR) dos genes supressores de tumor (TP53 e RB1).....	63
Tabela 6 – Processos biológicos em nível direto do <i>Gene Ontology</i> regulados por miRNA mais relevantes estatisticamente.....	68
Tabela 7 – Vias do <i>Kegg</i> reguladas por miRNA estatisticamente mais relevantes.....	69
Tabela suplementar 1 – Predição da interação entre miRNA, oncogenes de HPV e genes supressores de tumor humano. Os miRNAs expressos diferencialmente em células cervicais infectadas por HPV em comparação com as não infectadas foram testados quanto à afinidade de ligação aos genes virais E6 e E7, e aos genes humanos TP53 e RB1, utilizando o valor de energia livre de Gibbs (ΔG) -30 Kcal/mol como ponto de corte.....	84
Tabela suplementar 2 – Predição da interação entre miRNA, genes do HPV sem o limite de energia livre de Gibbs (ΔG) -30 Kcal/mol.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLAST	Ferramenta de procura de alinhamento local básico Do inglês - <i>Basic Local Alignment search tool</i>
CCU	Câncer de colo uterino
CCL20	Ligante 20 de quimiocina (motivo CC) Do inglês - <i>Chemokine (C-C motif) ligand 20</i>
CDK6	Quinase dependente de Ciclina 6 Do inglês - <i>Cyclin dependent kinase 6</i>
CESC	Carcinoma de células escamosas cervicais e adenocarcinoma
CISAM	Centro integrado de saúde Amaury de Medeiros
DEA	Análise de expressão diferencial
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dsRNA	RNA de fita dupla
EUA	Estados Unidos da América
FDR	Taxa de falsa descoberta
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GDC	Portal de dados <i>Genomic data Commons</i>
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
HPV	Papilomavírus humano
IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	interleucina
IMIP	Instituto de Medicina Integral Professor Fernando
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LCC	Leucemia linfocítica crônica
LCR	Região de controle longo
MHC	Complexo maior de histocompatibilidade
mRNA	RNA mensageiro
miRNA	microRNA
miRNAs_DE	miRNAs diferencialmente expressos
NCBI	National Center for Biotechnology Information

NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
NIH	Instituto Nacional de Saúde Do inglês - <i>National Institutes of Health</i>
NK	Células <i>Natural Killer</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAVE	Base de dados Epistema do PapilomaVírus Do inglês - <i>PapillomaVirus Episteme</i>
<i>PTEN</i>	Homólogo Fosfatase-Tensina
RNA	Ácido ribonucleico
<i>SEED</i>	Estrutura de ligação entre o miRNA e o mRNA alvo
siRNA	RNA de interferência pequeno
TCGA	O Atlas do Genoma do Câncer Do inglês - <i>The Cancer Genome Atlas</i>
TGF	Fator de crescimento tumoral
TNF	Fator de necrose tumoral
Tregs	Células T regulatórias
ΔG	Energia livre de Gibbs

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	REVISÃO DE LITERATURA	19
1.2.1	Situação epidemiológica do câncer do colo do útero	19
1.2.2	Classificação e desenvolvimento do CCU	26
1.2.3	Papilomavírus humano (HPV)	28
1.2.4	HPV, o sistema imune e o escape imunológico	32
1.2.5	microRNAs: biogênese, função e regulação	37
1.2.6	microRNAs e o câncer	41
2	OBJETIVOS	44
2.1	GERAL	44
2.2	ESPECÍFICOS	44
3	MATERIAIS E METODOS	45
3.1	POPULAÇÃO UTILIZADA NOS ESTUDOS DE BIOINFORMÁTICA	45
3.2	FILTRAGEM E MINERAÇÃO DE DADOS UTILIZANDO O AMBIENTE R	45
3.3	ANÁLISE DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL (DEA)	46
3.4	PREDIÇÃO DE ALVO DE MIRNA	46
3.5	POPULAÇÃO UTILIZADA NA CONFIRMAÇÃO DOS ACHADOS DE BIOINFORMÁTICA	47
3.6	DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE INFECÇÃO POR HPV	48
3.7	PREPARAÇÃO DA AMOSTRA PARA ESTUDO DE MIRNAS	49
3.8	VALIDAÇÃO DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS MIRNAS IDENTIFICADOS	49
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
4	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	51
5	RESULTADOS	52
5.1	POPULAÇÕES DE ESTUDO	52
5.1.1	Característica da população do banco de dados TCGA	52
5.1.2	Coorte para validação e perfil de infecção por HPV em Pernambuco	53

5.2	ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ.....	55
6	CONCLUSÃO	87
	REFERÊNCIAS	88
	APÊNDICE A – ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO (2018).....	93
	APÊNDICE B – ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO (2018).....	94
	APÊNDICE C – ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO (2019).....	95
	APÊNDICE D – ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO (2022).....	96
	APÊNDICE E – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	97
	ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	100

1 INTRODUÇÃO

O papel dos miRNAs nas infecções por papilomavírus humano (HPV) e sua relação com o câncer de colo uterino (CCU) ainda são incipientes, principalmente na desregulação gerada por essas moléculas nas vias do sistema imune em que seus genes alvo atuam. Assim como, na validação dos miRNAs diferencialmente expressos (miRNAs_DE) identificados *in silico* através de scripts e programas de bioinformática.

O estudo desenvolvido por Ben et al., (2015) demonstrou o papel da oncoproteína E6 do HPV na alteração da expressão de miRNAs, dentre eles, destacou-se o miR-21 que teve sua expressão aumentada gerando a supressão do gene *PTEN* (*Phosphatase-Tensin Homolog*). Por outro lado, Wang et al., (2015), em seu estudo, evidenciaram a redução da expressão do miR-145 e o consequente aumento do gene *CDK6* (*cyclin dependent kinase 6*), associando esta alteração à maior proliferação celular e a um pior prognóstico. Sharma et al., (2015), identificaram 182 miRNAs_DE entre as células infectadas e não infectadas pelo HPV, ainda, demonstraram a relação dos miR-892b, miR-500 e miR-711 nas lesões cervicais pré-cancerosas e no câncer. No entanto, apesar dos estudos supracitados comprovarem a relação dos miRNAs na infecção por HPV e na carcinogênese, ambos se limitaram ao avaliar a expressão diferencial de miRNAs em linhagens celulares infectadas *in vitro*.

Além disso, somente os genes alvo relacionados ao ciclo celular foram avaliados quanto ao impacto gerado pela expressão aberrante de miRNAs. Assim, salientamos que estudos demonstraram o envolvimento da expressão de miRNAs alterando a expressão de genes das vias regulatórias do sistema imune, como o trabalho de Yao et al., (2012) que demonstrou através de ensaio de luciferase, a diminuição da expressão do gene *CCL20* causada pelo miR-21; e o trabalho de Hui et al., (2013) que evidenciaram a interferência do cluster miR-106b-25 na via de sinalização do TGF- β diminuindo sua resposta no carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. No entanto, apesar destes trabalhos demonstrarem o potencial dos miRNAs atuando em vias regulatórias do sistema imune, a experimentação realizada através de uma validação da interação de miRNA com gene alvo e identificação de miRNAs em um tipo de câncer correlato ao cervical.

Neste sentido, realizamos estudos comparativos do tipo caso-controle permitindo identificar miRNAs_DE, associados a infecção por HPV no câncer cervical e após essa etapa, utilizamos a coorte construída para realização da validação dos miRNAs_DE identificados através da mineração realizada por bioinformática. Ainda, avaliamos os genes dos processos de controle

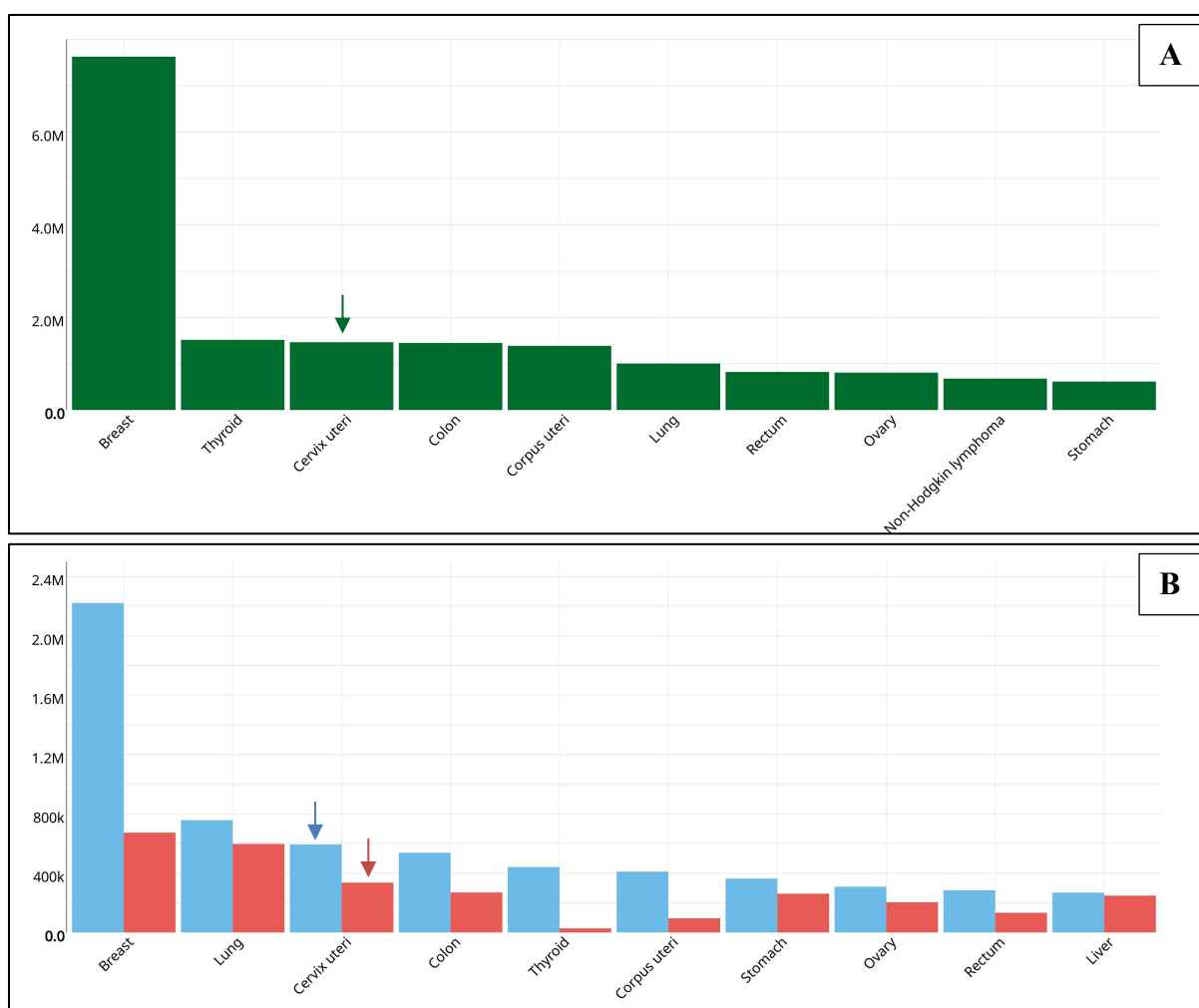
do ciclo celular, tumorigênese e regulação do sistema imune em que miRNAs_{DE} atuam, além de, relacioná-los a via de desenvolvimento do câncer. Desta forma, poderemos contribuir para o entendimento das bases biológicas da evasão do HPV à resposta imunológica e a progressão tumoral, além de avaliar o potencial de utilização, das moléculas identificadas neste estudo, como marcadores de prognóstico e de estadiamento do CCU.

1.1 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 Situação epidemiológica do câncer do colo do útero

O câncer de colo uterino (CCU) é atualmente a terceira neoplasia maligna mais comum em mulheres, apresentando uma prevalência nos últimos 5 anos estimada de aproximadamente 1,5 milhão de casos em todo o mundo (**Figura 1A**), com o surgimento de algo próximo a 570 mil novos casos anuais e uma taxa de incidência ajustada pela idade de 13,3 por 100.000 mulheres (GLOBOCAN, 2020). Além disso, é a terceira causa principal de morte relacionada ao câncer em mulheres, ocasionando pouco mais de 340 mil mortes anuais (**Figura 1B**), apresentando uma taxa de mortalidade ajustada pela idade de 7,3 por 100.000 mulheres (GLOBOCAN, 2020).

Figura 1 – Ranque de incidência, mortalidade e prevalência no mundo por tipo de câncer (2020)



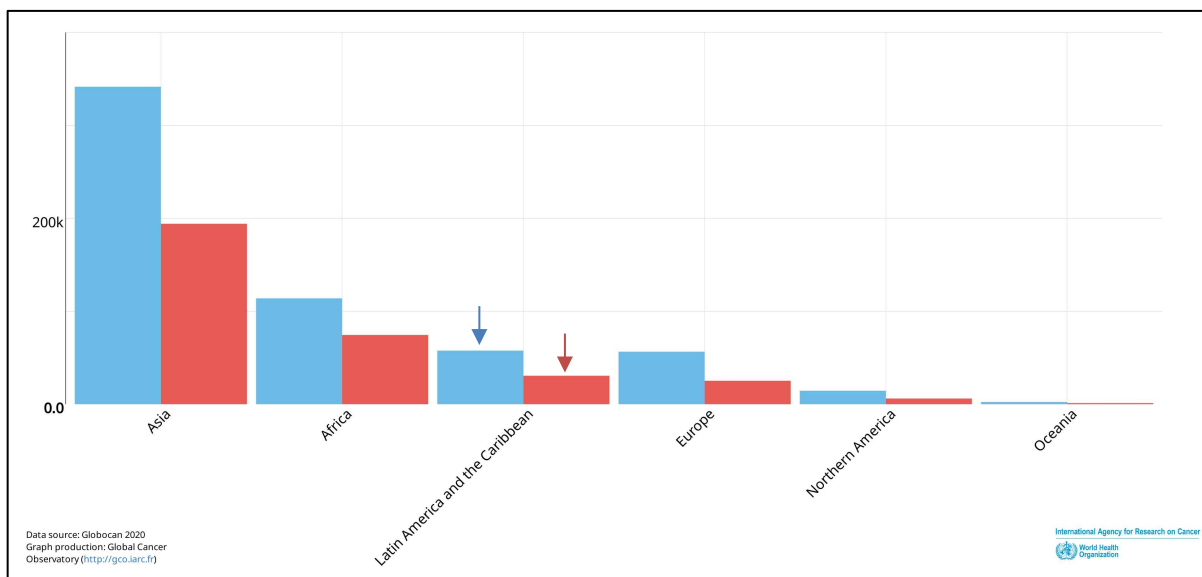
Fonte: Elaborado pelo autor adaptado de GLOBOCAN, 2023.

Legenda: A figura gráfica demonstrando os números brutos de casos da população mundial (eixo y) por tipos de câncer **A)** prevalência e **B)** incidência (azul) e mortalidade (vermelha), evidenciando o CCU na terceira colocação.

A América Latina, atualmente é o terceiro continente com maior número absoluto de novos casos e mortes por câncer de colo uterino (**Figura 2**) e a quarta maior prevalência de 5 anos do mundo (**Figura 3**). Ao levar em consideração as taxas de incidência e mortalidade ajustadas pela idade da população mundial, a América Latina é apontada como o segundo continente mais incidente (**Figura 4**), apresentando também a segunda maior mortalidade causada por este tipo (**Figura 5**) de câncer de colo uterino com 14,9 e 7,6 por 100.000 mulheres respectivamente (GLOBOCAN, 2020).

Apesar de ser o país com maior número de novos casos e maior número de mortes por câncer de colo uterino da América Latina, com números que ranqueiam o Brasil como o quarto país no mundo com o maior número de novos casos e maior número de mortes, segundo dados da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC – *International Agency for Research on Cancer*) da Organização Mundial da Saúde (OMS). O Brasil demonstra taxas de incidência e mortalidade ajustadas pela população mundial menores do que a América Latina, contribuindo com taxas de 12,7 e 6,3 para o calculo da média deste continente, respectivamente (GLOBOCAN, 2020; IARC, 2020).

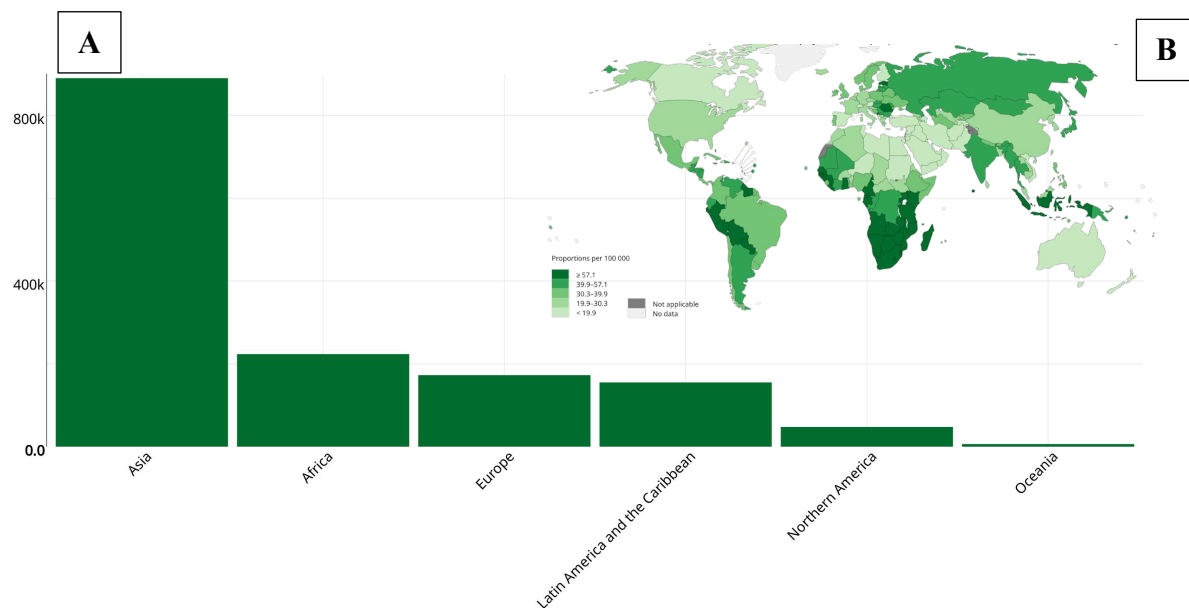
Figura 2 – Ranque de incidência e mortalidade no câncer do colo uterino por continente (2020)



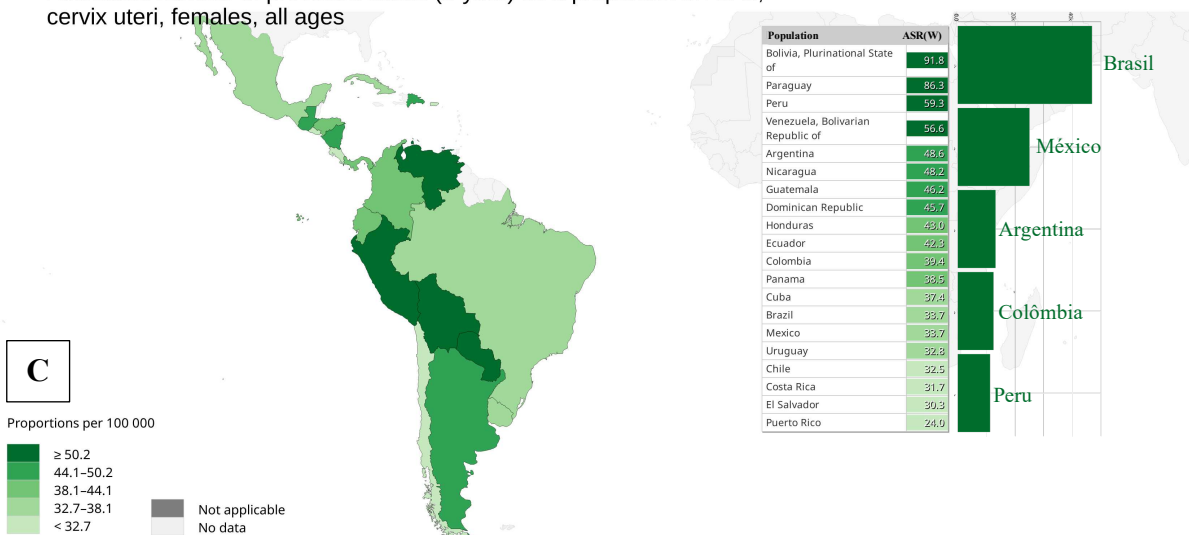
Fonte: Elaborado pelo autor adaptado de GLOBOCAN, 2023.

Legenda: A figura gráfica demonstrando os números brutos (eixo y) de incidência (barras na cor azul) e mortalidade (barras na cor vermelha) dos casos de câncer de colo do útero, evidenciando a América Latina ocupando a terceira posição no *ranking*.

Figura 3 – Prevalência, em números absolutos de casos e taxas ajustadas pela população mundial, de câncer do colo do útero no mundo (2020)



Estimated number of prevalent cases (5-year) as a proportion in 2020, cervix uteri, females, all ages



All rights reserved. The designations employed and the presentation of the material in this publication do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization / International Agency for Research on Cancer concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted and dashed lines on maps represent approximate borderlines for which there may not yet be full agreement.

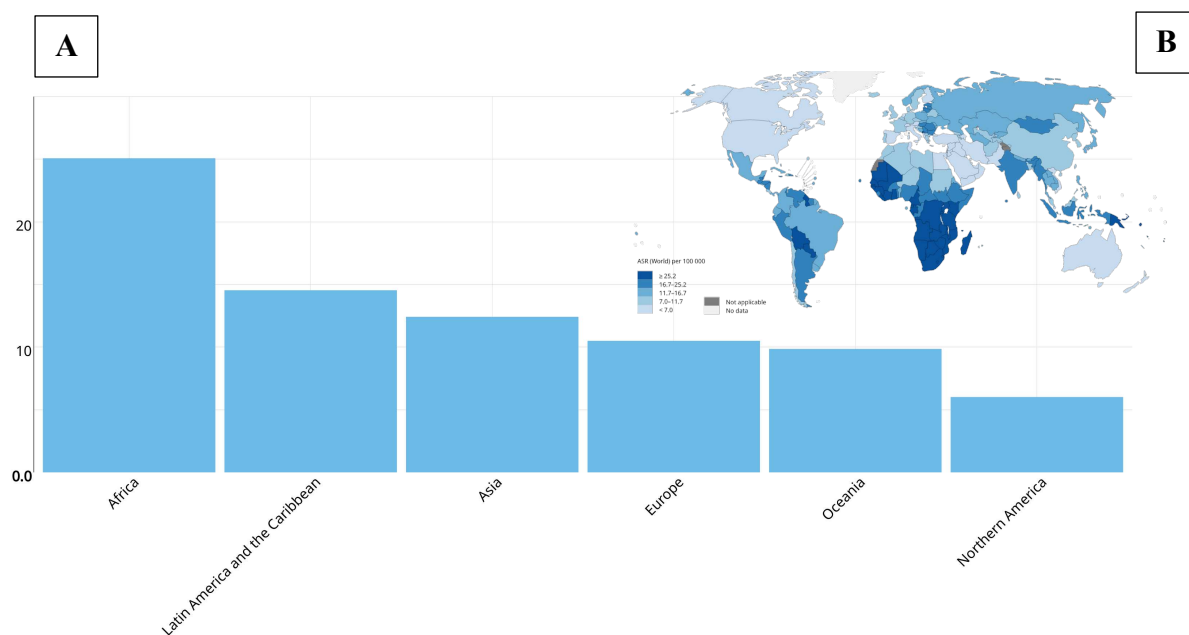
Data source: GLOBOCAN 2020
Map production: IARC
(<http://gco.iarc.fr/today>)
World Health Organization

World Health Organization
© International Agency for Research on Cancer 2020
All rights reserved

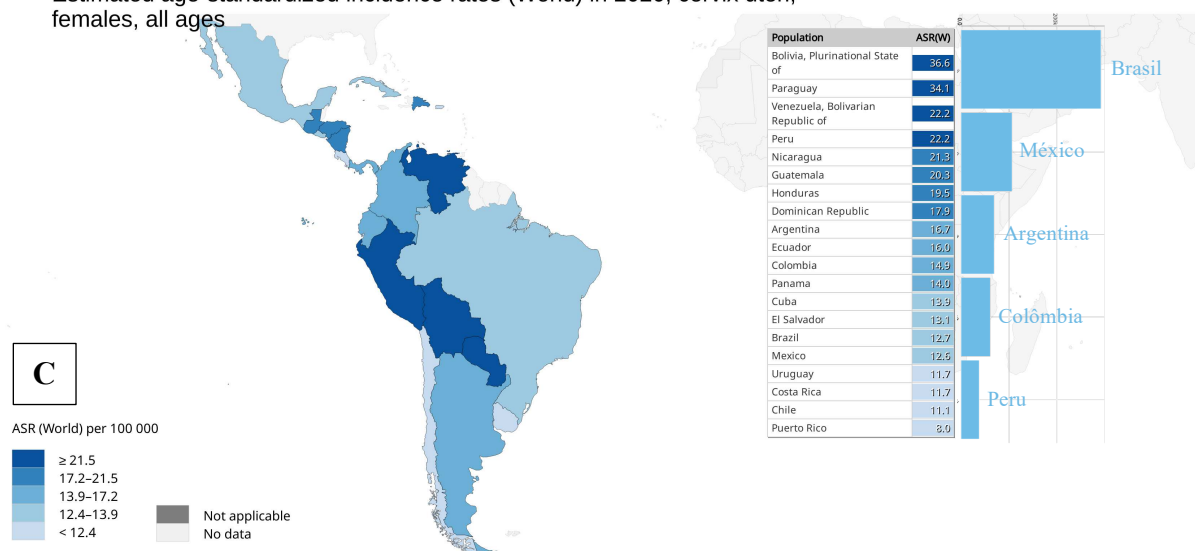
Fonte: Elaborado pelo autor adaptado de GLOBOCAN, 2023.

Legenda: A figura demonstra a situação da prevalência do câncer de colo do útero no mundo. **A)** Ranque de número bruto de casos (eixo y) por continentes; **B)** Taxa ajustada pela população mundial situação dos países no mundo, países preenchidos com maior intensidade de cor verde apresentam maior taxa de prevalência e **C)** Ranque de países na América Latina da prevalência por taxas ajustadas do câncer, evidenciando através das barras os 5 países dessa região que apresentaram maiores números de casos absolutos prevalentes.

Figura 4 – Incidência, em números absolutos de casos e taxas ajustadas pela população mundial, de câncer do colo do útero no mundo (2020)



Estimated age-standardized incidence rates (World) in 2020, cervix uteri, females, all ages



All rights reserved. The designations employed and the presentation of the material in this publication do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization / International Agency for Research on Cancer concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted and dashed lines on maps represent approximate borderlines for which there may not yet be full agreement.

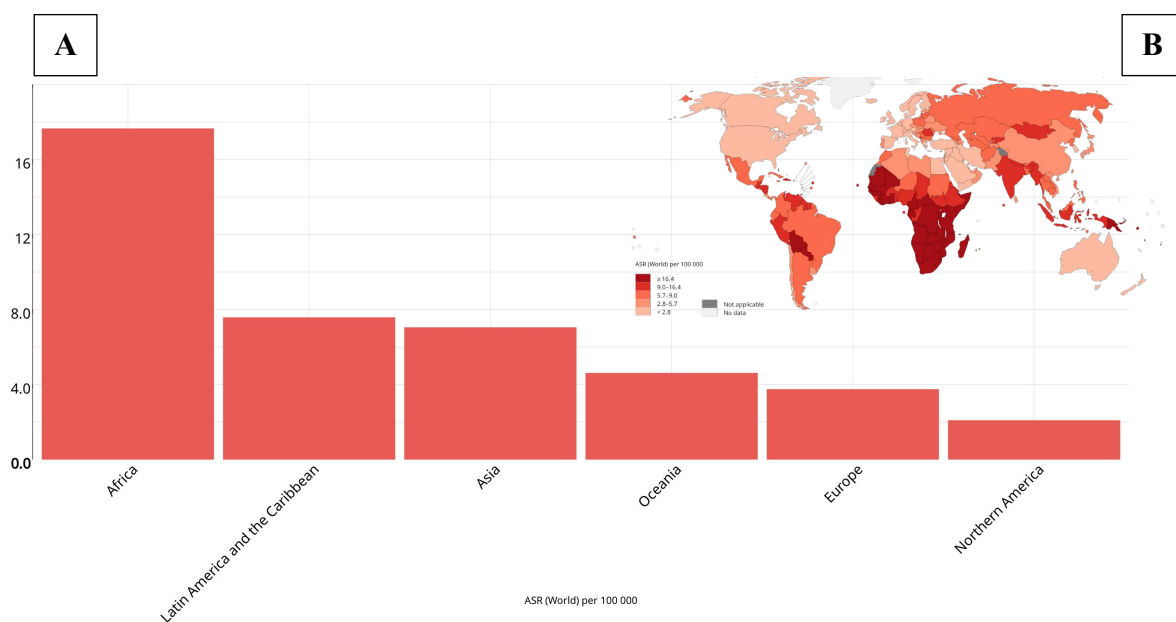
Data source: GLOBOCAN 2020
Map production: IARC
(<http://gco.iarc.fr/today>)
World Health Organization

World Health Organization
© International Agency for Research on Cancer 2020
All rights reserved

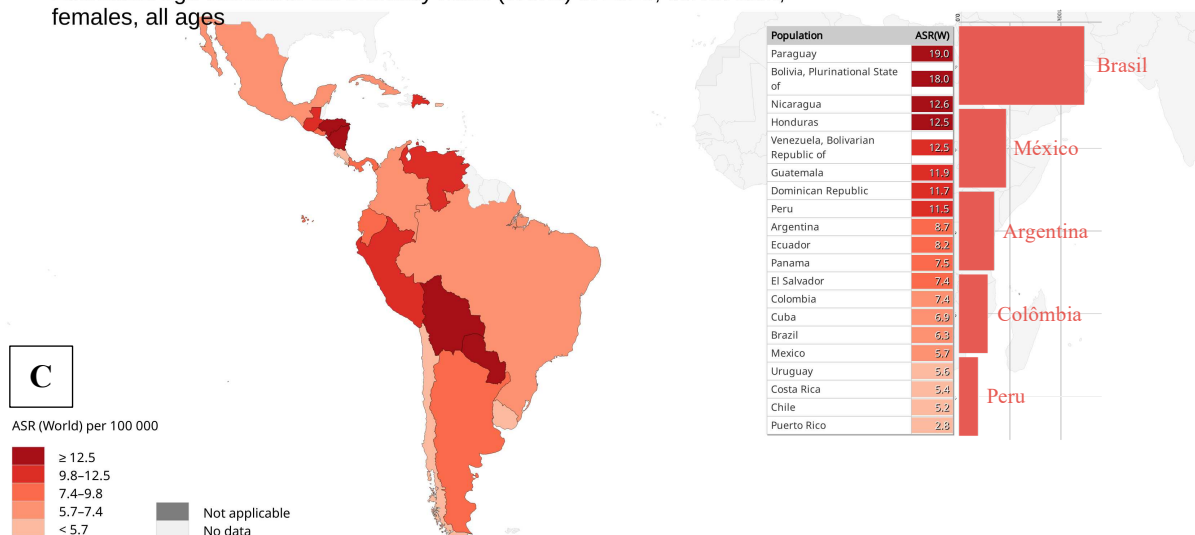
Fonte: Elaborado pelo autor adaptado de GLOBOCAN, 2023.

Legenda: A figura demonstra a situação da incidência do câncer de colo do útero no mundo. **A)** Ranque de número bruto de casos (eixo y) por continentes; **B)** Taxa ajustada pela população mundial situação dos países no mundo, países preenchidos com maior intensidade de cor azul apresentam maior taxa de incidência e **C)** Ranque de países na América Latina da incidência por taxas ajustadas do câncer de colo do útero, evidenciando através das barras os 5 países dessa região que apresentaram maiores números absolutos novos casos da doença.

Figura 5 – Mortalidade, em números absolutos de casos e taxas ajustadas pela população mundial, de câncer do colo do útero no mundo (2020)



Estimated age-standardized mortality rates (World) in 2020, cervix uteri, females, all ages



All rights reserved. The designations employed and the presentation of the material in this publication do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization / International Agency for Research on Cancer concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted and dashed lines on maps represent approximate borderlines for which there may not yet be full agreement.

Data source: GLOBOCAN 2020
Map production: IARC
(<http://gco.iarc.fr/today>)
World Health Organization

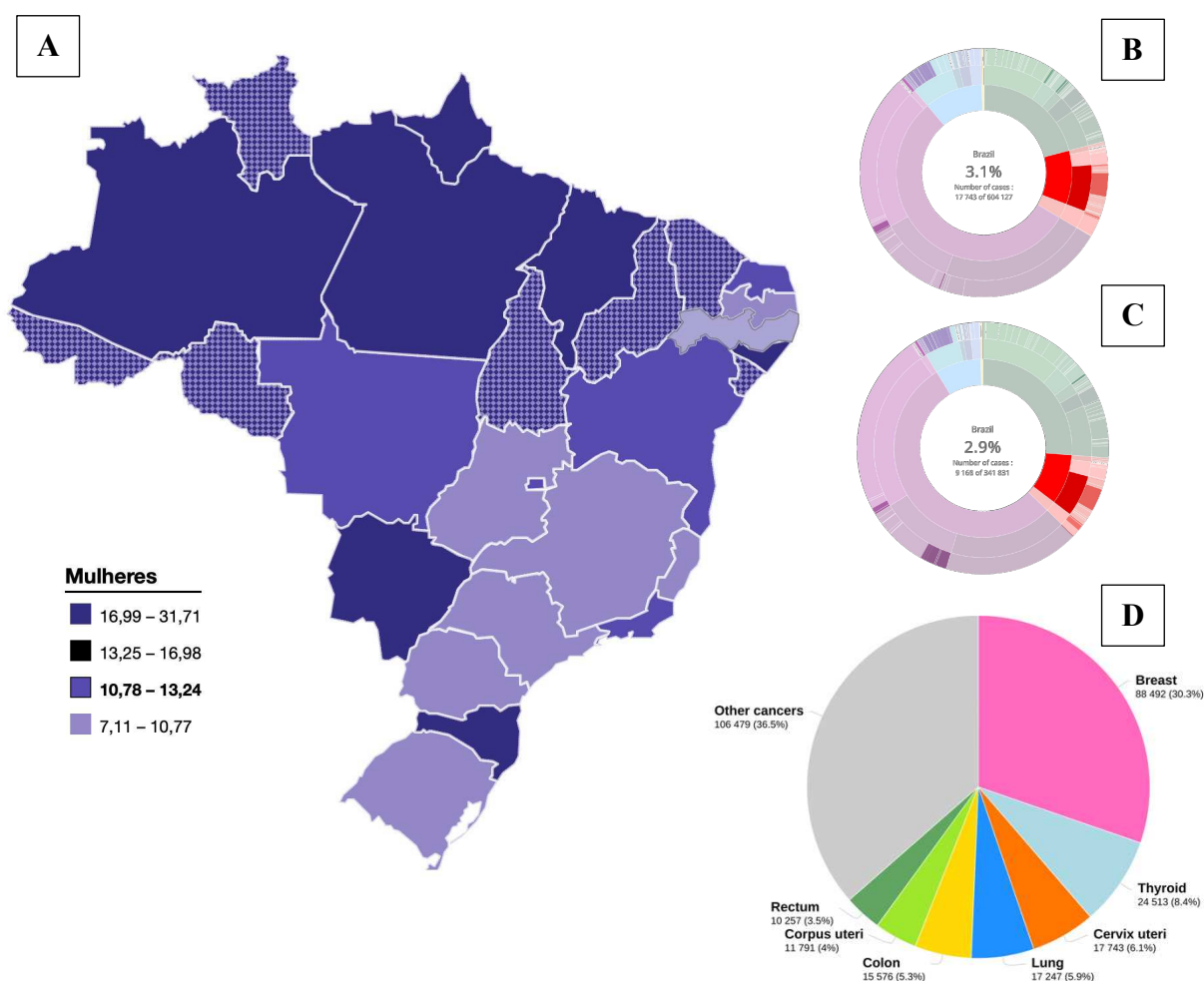
World Health Organization
© International Agency for Research on Cancer 2020
All rights reserved

Fonte: Elaborado pelo autor adaptado de GLOBOCAN, 2023.

Legenda: A figura demonstra a situação da mortalidade do câncer de colo do útero no mundo. **A)** Ranque de número bruto de casos (eixo y) por continentes; **B)** Taxa ajustada pela população mundial situação dos países no mundo, países preenchidos com maior intensidade de cor vermelha apresentam maior taxa de mortalidade e **C)** Ranque de países na América Latina da mortalidade por taxas ajustadas do câncer de colo do útero, evidenciando através das barras os 5 países dessa região que apresentaram maiores números absolutos de morte.

No Brasil, os casos de câncer de colo uterino representaram, em 2020, aproximadamente 3,1% dos novos casos e 2,9% das mortes causadas pela doença no mundo (**Figuras 6B e 6C**), ocorreram 9.168 óbitos por esta neoplasia, representando uma taxa de mortalidade ajustada para a população mundial de 6,3 óbitos para cada 100 mil mulheres. Atualmente, o CCU figura como a terceiro mais incidente e a terceira maior mortalidade por câncer em mulheres no país (**Figura 6D**). O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima que o Brasil apresentará em 2023 17.010 casos incidentes e um risco estimado de 13,25 casos a cada 100 mil mulheres (BRUNI et al., 2018; GLOBOCAN, 2020; INCA, 2020).

Figura 6 – Principais dados epidemiológicos do câncer de colo uterino do Brasil (2020)

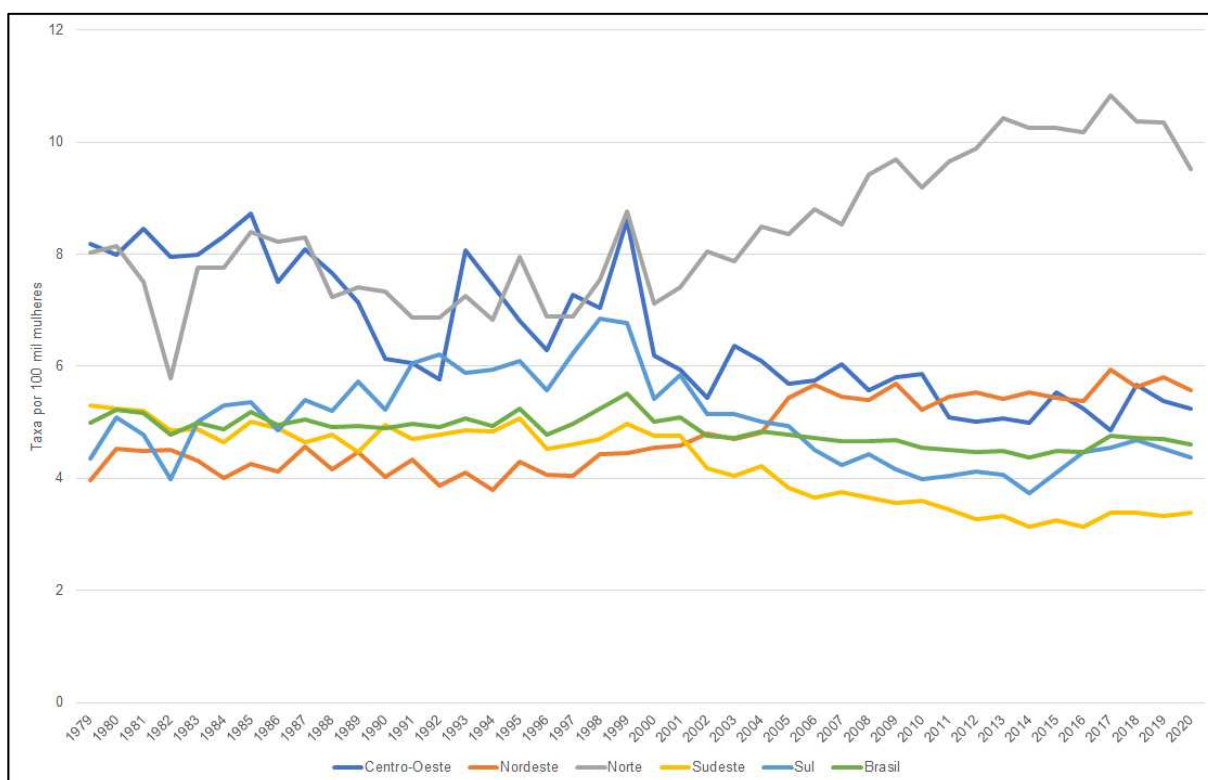


Fonte: Elaborado pelo autor adaptado de GLOBOCAN, 2023; INCA, 2023.

Legenda: **A)** mapa demonstrando as taxas de incidência ajustadas dos entes federados brasileiros; **B)** diagrama demonstrando os dados de incidência mundial por câncer de colo uterino de forma hierárquica, evidenciando em vermelho a porcentagem correspondente aos casos brasileiros (3,1%); **C)** diagrama demonstrando os dados de mortalidade mundial por câncer de colo uterino de forma hierárquica, evidenciando em vermelho a porcentagem correspondente aos casos brasileiros (2,9%); **D)** gráfico em pizza evidenciando a incidência dos principais tipos de câncer no Brasil, evidenciando o câncer de colo uterino em laranja como quarta maior em número de novos casos.

Ao realizar uma análise regional do câncer de colo uterino no Brasil, a região Nordeste é apontada como a segunda maior taxa ajustada de incidência e mortalidade do país apresentando 13,85 e 5,58 por 100.000 mulheres respectivamente, ficando atrás, em ambos os casos, somente da região Norte, como aponta o gráfico da série histórica da taxa de mortalidade no Brasil (**Figura 7**) (INCA, 2023). Ainda, segundo o INCA (2023), as estimativas apontam para a permanência da região Nordeste nessa posição, que ocupa majoritariamente desde 2010. Em Pernambuco estima-se que, em 2023, o número de novos casos de CCU seja de 770 mulheres, definindo assim uma taxa de incidência para a população pernambucana de 12,14 por 100.000 mulheres, a sexta maior incidência do nordeste e a décima quinta do país (INCA, 2020).

Figura 7 – Taxa de mortalidade ajustada pela população mundial por câncer do colo do útero nas regiões do Brasil no período de (1979 – 2020)



Fonte: Adaptado de INCA, 2023.

Legenda: gráfico demonstrando as taxas de mortalidade por câncer de colo uterino no Brasil ajustadas pela estrutura etária da população mundial no período de 1979 a 2020, evidenciando pela reta vermelha a região nordeste como segunda maior de maior incidência e mortalidade.

1.2.2 Classificação e desenvolvimento do CCU

O câncer de colo uterino caracteriza-se pelo crescimento anormal das células epiteliais da cérvix uterina; que em estágios avançados podem adquirir a capacidade de invadir, através da camada basal, outros tecidos (carcinoma invasor) (SANTANA et al., 2008). O CCU, apresenta uma grande variedade de subtipos (**Quadro 1**), dentre todos os tipos o carcinoma de células escamosas, o adenocarcinoma e o carcinoma adenoescamoso representam os principais tipos de câncer cervical, apresentando frequências aproximadas de 75%, 21% e 3%, respectivamente (DIZ; MEDEIROS, 2009).

No geral, a lesão cervical apresenta uma progressão lenta e requer, em média 20 anos para sua evolução, do estágio de lesão pré-cancerosa até o carcinoma invasor (SANTANA et al., 2008). A existência de diversos fatores de risco associados ao desenvolvimento dos cânceres cervicais, é, atualmente, consenso no conhecimento científico, sabe-se também que estes fatores diferem de acordo com o tipo do câncer cervical estabelecido no desfecho, como o tabagismo sendo associado ao maior risco de desenvolver o carcinoma de células escamosas e o adenocarcinoma tendo uso prolongado de anticoncepcionais orais sendo associado a maior probabilidade deste desfecho (DIZ; MEDEIROS, 2009).

Quadro 1 – Tipos histológicos do câncer de colo uterino

Carcinoma de células escamosas *	Adenocarcinoma tipo células claras
Carcinoma de células escamosas queratinizante de grandes células	Adenocarcinoma seroso
Carcinoma de células escamosas não-queratinizante de grandes células	Adenocarcinoma tipo mesonéfrico
Carcinoma verrucoso	Adenocarcinoma tipo células em anel de sinete
Carcinoma de células transicionais	Adenoma maligno
Carcinoma linfoepitelioma-like	Adenocarcinoma viloglandular
Adenocarcinoma	Carcinoma adenoescamoso
Endocervical (mucinoso)	Carcinoma adenoide cístico
Endometriode	Carcinoma de pequenas células
Adenocarcinoma padrão intestinal	Carcinoma indiferenciado

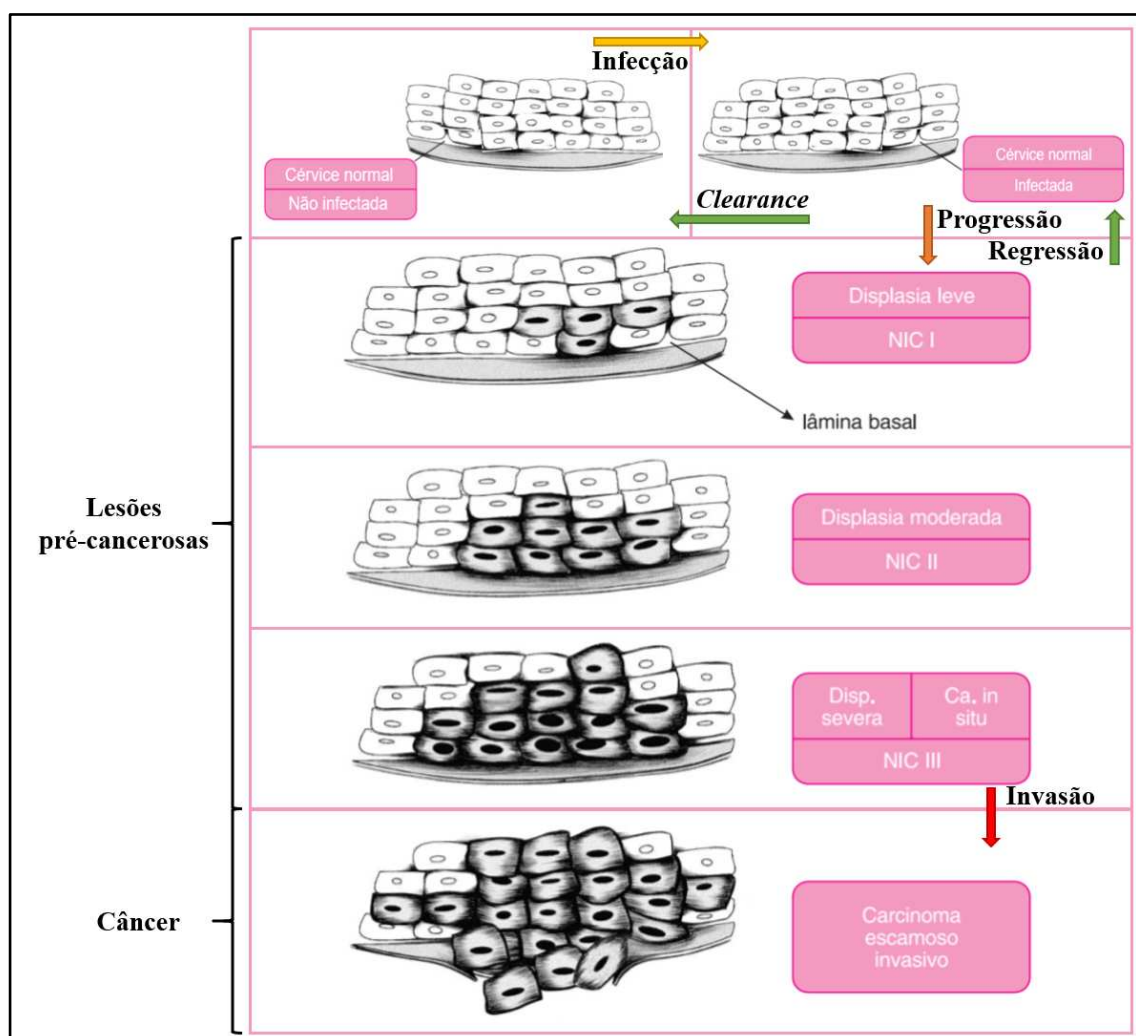
Fonte: Adaptado de Diz, Medeiros, 2009.

Legenda: A imagem demonstra todos os tipos histológicos possíveis de câncer de colo uterino. * tipo mais frequente de câncer cervical.

Embora os fatores de risco para estabelecimento e desenvolvimento do câncer cervical possam diferir, existem fatores de risco que são comuns para os principais tipos de câncer cervical como o início precoce da vida sexual, a multiplicidade de parceiros, a multiparidade, a

imunossupressão, o nível socioeconômico, sendo a infecção pelo *papilomavírus humano* (HPV), o fator de risco mais importante para o desenvolvimento do CCU (DIZ; MEDEIROS, 2009; LIMBERGER et al., 2012; MARTINS et al., 2014b; SANTANA et al., 2008). Além da infecção pelo HPV ser bastante comum na população sexualmente ativa, estima-se que aproximadamente 20% desta população esteja infectada e que 80% das mulheres serão contaminadas ao menos uma vez até os 50 anos (LIMBERGER et al., 2012; SANTANA et al., 2008). Assim, evidenciamos que a infecção por HPV é associada a estágios clínicos bem definidos (**Figura 8**) (ZUR HAUSEN, 2002).

Figura 8 – Principais etapas no desenvolvimento do câncer de colo uterino



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Legenda: A imagem demonstra de forma resumida as principais etapas que ocorrem durante o processo de desenvolvimento do CCU, iniciando pela infecção da cérvix (seta amarela) a qual pode ser espontaneamente revertida através da eliminação viral (*clearance* – seta verde horizontal), no entanto, se a infecção persistir teremos a progressão do epitélio formando assim as lesões pré-cancerosas (seta laranja). Estas lesões podem regredir após pequenas intervenções médicas (seta verde vertical), geralmente o processo de biópsia ou a conização do colo uterino já são suficientes para estimular o sistema imunológico e gerar a regressão. Porém, caso a mesma não ocorra a progressão continuará a se desenvolver até que o tecido infectado invada a camada basal do epitélio (seta vermelha), gerando assim, o carcinoma escamoso invasor.

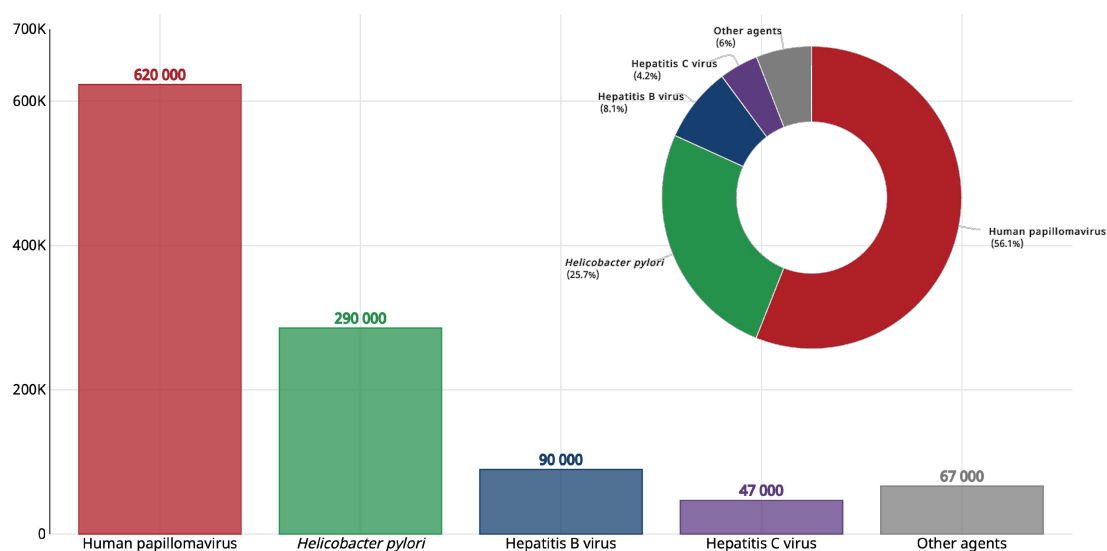
Portanto, todas as bases de conhecimento atual demonstram o HPV como agente etiológico do CCU, inclusive com frequência de infecção presente em aproximadamente 90% dos casos deste agravo (BOSCH et al., 1995; LIMBERGER et al., 2012; NAHAND et al., 2019; WALBOOMERS et al., 1999). No entanto, somente a infecção pelo HPV não é suficiente para o estabelecimento do câncer cervical; pois, são necessários a presença de outros fatores durante o processo de desenvolvimento do CCU (DIZ, MEDEIROS, 2009). Dentre estes fatores estão a infecção do epitélio na zona de transformação metaplásica, a necessidade do vírus infectante ser de uma cepa com alto risco de oncogenicidade, a carga viral, a persistência viral, a progressão do epitélio infectado para lesões pré-cancerosas (neoplasia intraepitelial cervical - NIC), estado imunológico da hospedeira e, por fim, a invasão das células infectadas através da camada basal do epitélio (SANTANA et al., 2008; SCHIFFMAN et al., 2007).

1.2.3 Papilomavírus humano (HPV)

Em face dos dados mais recentes disponíveis (OMS, 2019; GLOBOCAN, 2023; IARC, 2023), podemos afirmar HPV como o principal fator etiológico dentre todos os cânceres causados por agentes infecciosos em mulheres, sendo o agente causador de aproximadamente 620.000 casos no ano de 2018, número que corresponde à 56,1% de todos os casos de cânceres em todo mundo (**Figura 9**). Estes números quando analisados na América do sul apresentam-se ainda mais elevados, chegando o HPV a representar 64% das infecções nos casos de desenvolvimento de câncer (**Figura 10**).

O HPV é um vírus icosaédrico e não envelopado da família *papillomaviridae*, cada partícula viral tem tamanho aproximado 55 nm e um genoma circular de dupla fita de DNA com aproximadamente 8kb (LIMBERGER et al., 2012; VILLIERS, et al., 2004). O genoma do HPV está dividido em 3 domínios principais: os genes de expressão precoce, codificando seis proteínas denominada E1, E2, E4, E5, E6 e E7 (do inglês *Early*, que em tradução livre significa “precoce”) em sequência; os genes de expressão tardia, com duas proteínas a L1 e L2 (do inglês *Late*, significando “tardio” em tradução livre) e uma região controladora longa de expressão gênica, denominada LCR (do inglês *Long Control Region*).

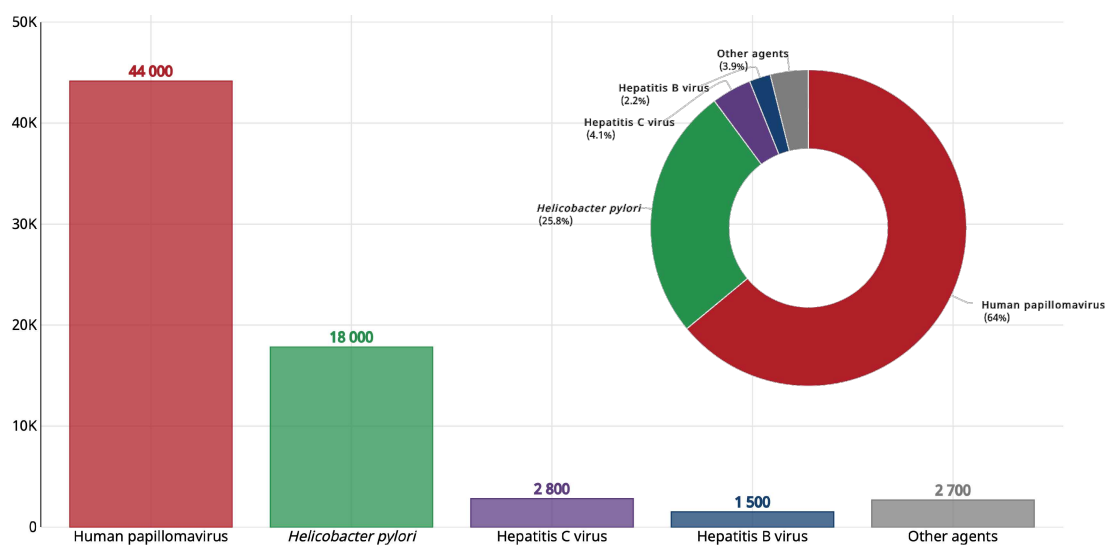
Figura 9 – Incidência bruta dos casos de câncer associados a agentes infecciosos como fatores etiológicos no mundo, subdivididos por espécies (2020)



Fonte: elaborado pelo autor adaptado de GLOBOCAN, 2023.

Legenda: gráfico de barras demonstrando os números absolutos de incidência (eixo y) de cânceres causados por agentes infecciosos e o ranque dos principais fatores etiológicos, o diagrama em rosca evidencia a porcentagem dos casos correspondentes aos agentes infecciosos em vermelho a porcentagem correspondente ao papilomavírus humano (56,1%).

Figura 10 – Incidência bruta dos casos de câncer associados a agentes infecciosos como fatores etiológicos na América Latina, subdivididos por espécies (2020)

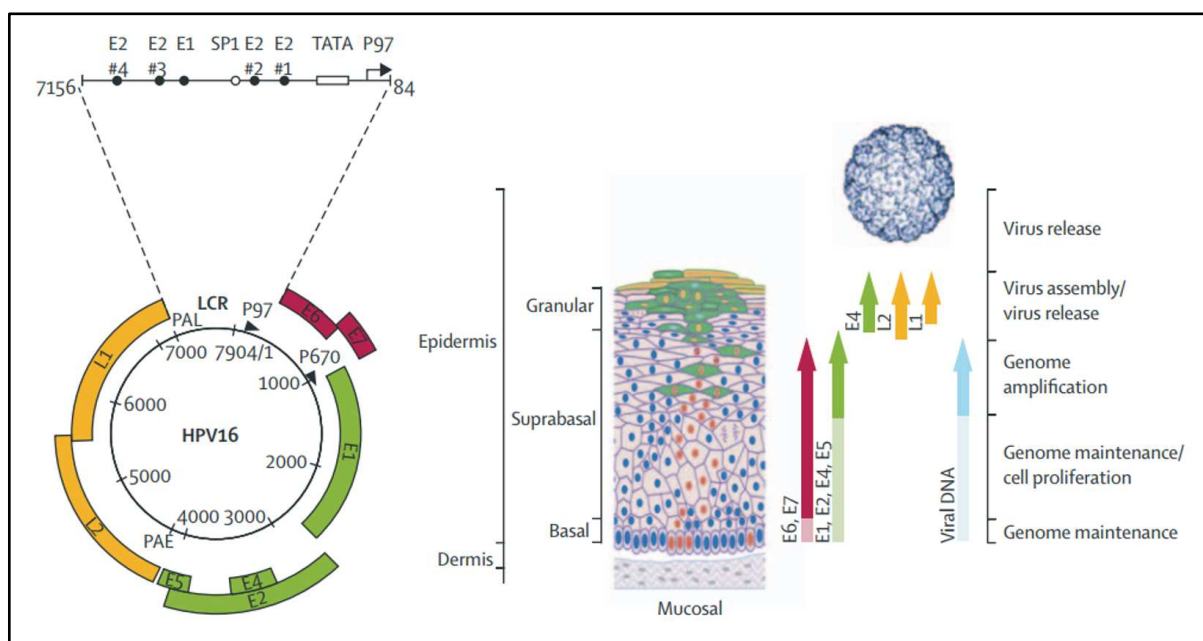


Fonte: elaborado pelo autor adaptado de GLOBOCAN, 2023.

Legenda: gráfico de barras demonstrando os números absolutos de incidência (eixo y) de cânceres causados por agentes infecciosos e o ranque dos principais fatores etiológicos, o diagrama em rosca evidencia a porcentagem dos casos correspondentes aos agentes infecciosos em vermelho a porcentagem correspondente ao papilomavírus humano (64%).

No entanto, apesar do genoma viral ser relativamente pequeno, ele possui uma alta complexidade em sua biologia molecular. A LCR contém elementos regulatórios *cis*-responsivos que promovem a expressão dos mRNAs, posteriormente traduzidos nas proteínas virais. Dentre as proteínas de expressão precoce, as E1 e E2 apresentam como função principal a regulação dos processos de transcrição e tradução virais, sendo a E2 apontada como repressora do promotor viral que regula o mecanismo de replicação; a proteína E4 é responsável pela liberação das partículas virais para o meio extracelular e ainda, as oncoproteínas E5, E6 e E7 que são as responsáveis por modular o processo de transformação das células infectadas, sendo a oncoproteína E6 responsável pela disrupção funcional do ciclo celular através da degradação da proteína p53 humana e a oncoproteína E7 através da ligação de modulação da proteína retinoblastoma (pRb). As proteínas de expressão tardia, denominadas L1 e L2, também conhecidas como proteínas estruturais, compõem o capsídeo e possuem principalmente função estrutural na formação da cepa viral (**Figura 11**) (HEBNER; LAIMINS, 2006; VILLIERS, et al., 2004).

Figura 11 – Genoma do HPV e a expressão de suas proteínas durante o processo de maturação do epitélio infectado



Fonte: adaptado de DOORBAR, 2006.

Legenda: a imagem demonstra a sequência de organização do genoma do HPV, bem como a ordem de expressão das proteínas virais ao longo da maturação dos queratinócitos, identificando também a principal função exercida pela partícula viral ao longo do epitélio.

Além de transcrever a proteína estrutural homônima, o gene *L1* do HPV é utilizado para a classificação viral em seus diversos tipos, subtipos e variantes com base na sua similaridade, correspondendo a diferenças nas sequências em mais de 10%, entre 2 e 10%, e menos que 2%, respectivamente (VILLIERS, et al., 2004; PaVE-NIH, 2023). Deste modo, ao tentar classificar uma cepa viral do HPV, caso as sequências do gene *L1* possuam até 2% de divergência com o tipo viral existente que apresente maior similaridade com a cepa analisada, esta será classificada como uma variante do tipo viral existente; caso a variabilidade entre as sequências genéticas analisadas seja maior que 2% e menor que 10%, esta cepa viral será classificada como um subtipo do tipo viral com que mais se assemelhar geneticamente; e por fim, caso esta divergência genética seja maior que 10% do gene *L1* esta cepa será classificada como um novo tipo viral de HPV (PaVE-NIH, 2023). Vale salientar que esta variabilidade genética apresenta limites, para que duas cepas virais sejam taxonomicamente classificadas como pertencentes ao mesmo gênero viral, faz-se necessário que elas apresentem no mínimo 60% de similaridade nucleotídica. Ainda, para que as cepas sejam classificadas na mesma espécie, os tipos virais devem apresentar entre 71% e 89% de identidade das suas sequências nucleotídicas (BERNARD, et al., 2004; PaVE-NIH, 2023).

Em face do fluxo de classificação viral supracitado, desde a última atualização do *The International Human Papillomavirus Reference Center* foram identificadas e classificados aproximadamente 229 tipos virais de HPV, atualmente, outras 222 sequências de genomas virais estão aguardando o processo de confirmação da classificação pelo centro de referência (PaVE-NIH, 2023). Além disso, os *papilomavirus humano* podem ainda ser classificados de acordo com as diferentes habilidades em causar lesões (**Tabela 1**), sendo as cepas virais de baixo risco (HPV-6, -11, -61 e outros) aquelas que raramente provocam transformação celular, podendo gerar papilomas, condilomas e verrugas cervicais; e as cepas virais de alto risco (HPV-16, -18, -33, -58 e outros) aquelas que favorecem o processo de transformação celular e o desenvolvimento processo oncogênico na célula infectada com maior frequência (LIMBERGER et al., 2012; ZUR HAUSEN, 2002).

Tabela 1 - Tipos mais comuns de HPV em lesões da pele e mucosa anogenital

Tipo de lesões	Tipo mais comum de HPV
Benignas da pele	1, 2, 3, 4, 10
Benignas da mucosa anogenital	6, 11, 40, 42, 43, 44, 53 56, 66, 68
Malignas da mucosa anogenital	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 58, 59, 66

Fonte: adaptado de DOORBAR, J.; STERLING, J.C., 2001.

Legenda: Em negrito, estão os tipos que causam lesões malignas com maior frequência.

1.2.4 HPV, o sistema imune e o escape imunológico

A eliminação imunológica do HPV é lenta, quando comparada a maioria dos outros vírus, e possui peculiaridades que associadas à persistência da infecção viral possibilitam que algumas lesões geradas pelo vírus possam progredir para o câncer (LIMBERGER et al., 2012; VILLIERS, et al., 2004; ZUR HAUSEN, 2002). Sabe-se que a maioria dessas lesões regride espontaneamente, entretanto, em alguns casos a infecção por HPV pode ser responsável pelo desenvolvimento de lesões de alto grau de malignidade, conhecidas como neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC). Apesar da evolução para o câncer cervical depender de um amplo espectro de fatores, como os citados anteriormente (vide **tópico 1.2.2**), este processo tem como principal mediador o sistema imunológico (SANTANA et al., 2008). Ainda, é reconhecido que as características virais inerentes ao tipo da cepa infectante em adição às características genéticas da mulher infectada (polimorfismos e mutações genéticas) podem influenciar de forma diferente o sistema imunológico. Assim, em alguns casos, há a facilitação do escape viral frente à resposta imune, inibindo o completo *clearance* deste vírus e, consequentemente, gerando a persistência da infecção (KLINGELHUTZ; ROMAN, 2012).

Desta maneira, para a melhor compreensão dos mecanismos de escape viral imunológico, faz-se necessário um breve resumo sobre o sistema imunológico com foco no fluxo normal de resposta imune frente a uma infecção viral. De forma geral, o sistema imune apresenta dois tipos de resposta, inicialmente a imune inata e a imune adaptativa, sendo elas realizadas por receptores de reconhecimento de padrões (*Pattern recognition receptors* - PRR) e por receptores de reconhecimento de epítomos antigênicos específicos, respectivamente. A resposta imune inata é realizada por granulócitos, macrófagos e células *natural-killer*, sendo esta última a principal célula efetora no caso de infecções virais e alterações tumorais, as comunicações

neste tipo de resposta são realizadas através de quimiocinas e citocinas, tendo como exemplo o interferon (IFN) tipo I.

A resposta imune adaptativa é adquirida através do contato com antígenos e desenvolvida especificamente contra eles, esta resposta pode ser subdividida em dois tipos, a resposta imune celular e a humoral, em ambos os casos para a iniciação da resposta os antígenos processados precisam ser apresentados através do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) pelas células apresentadoras de antígeno (APC), como as células dendríticas, às suas células efectoras, os linfócitos T e B, respectivamente. Assim, na resposta imune celular os linfócitos T podem ser auxiliares (TCD4^+) ou citotóxicos (TCD8^+), os TCD4^+ podem assumir principalmente duas funções, a de linfócitos T regulatório (Tregs) que direciona e controla a diferenciação dos linfócitos TCD4^+ e a de reforço imunológico com os linfócitos T *helper* que fortalecem as respostas imunes, tendo como exemplo o perfil Th1 relacionado resposta celulares e o perfil Th2 a respostas humorais. Ainda na resposta imune adaptativa celular, os linfócitos TCD8^+ (citotóxicos) possuem função principal de eliminar células comprometidas através de processos apoptóticos por exemplo. Por fim, a resposta imune adaptativa humoral é voltada para corpos estranhos extracelulares e suas células efectoras são os linfócitos B que ao serem ativados pelas células dendríticas se diferenciam em plasmócitos secretores de imunoglobulinas ou em linfócitos B de memória (BHAT, et al. 2011; GUIMARÃES et al., 2011; MACHADO et al., 2004; SAKAGUCHI, 2003).

Dentre vários fatores que favorecem o escape imunológico e a persistência, o ciclo de vida viral se torna um mecanismo passivo importante, pois o HPV infecta as células basais primitivas e se utiliza do processo de diferenciação celular do queratinócito para expandir sua expressão genômica sem gerar lise celular nos queratinócitos o que acarreta uma resposta imunológica fraca pois o vírus não desenvolve uma etapa hematogênica em seu ciclo de vida. Além disso, a infecção acontece longe das células de Langerhans, as APCs epiteliais presentes no colo uterino, dificultando a apresentação de antígenos e a possibilidade da formação de uma resposta imunológica forte. Em paralelo aos mecanismos inerentes ao próprio ciclo de vida viral, o HPV apresenta mecanismos, através das oncoproteínas virais E5, E6 e E7, que combatem ativamente o estabelecimento de uma resposta imunológica antiviral satisfatória (KLINGELHUTZ; ROMAN, 2012; STANLEY; PETT; COLEMAN, 2007; VENUTI et al., 2011).

Existem evidências de que diferentes mecanismos associados à evasão do HPV estejam envolvidos no processo de oncogênese do CCU (KLINGELHUTZ; ROMAN, 2012), com relação aos mecanismos de escape imunológico frente a resposta inata, estudos indicaram que

o vírus induz uma inibição da produção de interferons (IFNs) do tipo I, a proteína E6 é capaz de reprimir a expressão do interferon kappa (IFN- κ), molécula expressa constitutivamente em queratinócitos com função de reforçar a transcrição de genes estimulados pela via de resposta imune dos interferons (RINCON-OROZCO et al., 2009). Além da repressão do IFN- κ , a oncoproteína E6 também é capaz de realizar redução na expressão do interferon alfa (IFN- α) (ESTEVÃO et al., 2019). Ainda, através da ligação com STING pelo domínio LXCXE, a oncoproteína E7, antagoniza a ativação da via cGAS-STING limitando a também produção de IFNs tipo I, e por consequência suprimindo a resposta imune inata (LAU et al., 2015).

Além de realizar ativamente o embate frente ao sistema imune inato, as oncoproteínas E6 e E7 também atuam no escape ao sistema imunológico adaptativo. Apesar de não possuírem atividade enzimática, essas possuem grande capacidade de desregular o sistema imune através de sua atuação como “adaptadores proteicos” interagindo com diversas proteínas do hospedeiro (**Figura 12 e 13**), desta maneira, as oncoproteínas atuam sequestrando suas atividades e deslocando-as para localizações específicas. Assim, estas oncoproteínas são capazes de promover não só a persistência viral, mas também a intensificação da replicação, desregulação e inibição do sistema imune (ESTEVÃO et al., 2019; WESTRICH; WARREN; PYEON, 2017).

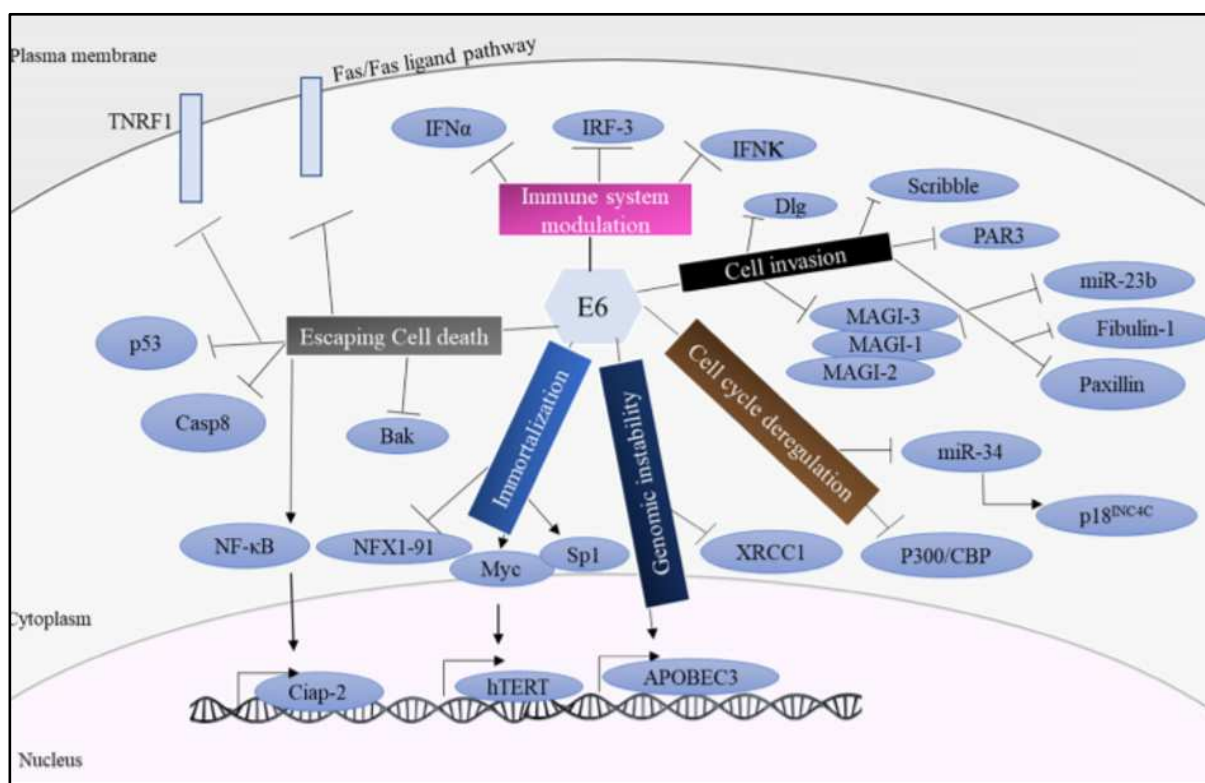
Limberger *et al.*, (2012) descreveram o aumento de linfócitos T CD8⁺ específicos para proteínas E6 e E7 do HPV. Apesar deste fato, estudos indicam que a oncoproteína E5 possui a capacidade de suprimir a expressão de MHC/HLA de classe I na superfície celular, através da alcalinização dos compartimentos do complexo de Golgi, ligação da proteína à cadeia pesada de MHC I e à cadeia invariável do MHC/HLA de classe II com consequente acúmulo nesta organela (ASHRAFI et al., 2005; SCHAPIRO et al., 2000; WESTRICH; WARREN; PYEON, 2017). Ainda, foi demonstrado que a inibição das moléculas MHC/HLA de classe I é seletiva, inibindo somente os HLA A/B sem interferir com a expressão das moléculas C/E (**Figura 14**), desta forma evitando a ativação da lise celular mediada por células (KIM et al., 2009; O'BRIEN; SAVERIA CAMPO, 2002; STANLEY; PETT; COLEMAN, 2007).

Com relação aos perfis de citocinas apresentados frente a infecção, estudos demonstraram que a presença do IFN- γ foi detectada em esfregaços cervicais das mulheres que realizavam o *clearance* viral eficiente, porém não era detectada nos esfregaços de pacientes em que a infecção persistia (GUIMARÃES et al., 2011; KOBAYASHI et al., 2004; MACHADO et al., 2004; STANLEY, 2009). De maneira análoga, estudos como os de De Jong *et al.* (2004) e Lee *et al.* (2004) demonstraram que linfócitos de mulheres assintomáticas, quando comparadas a mulheres com tumor, secretavam mais IFN- γ , TNF, IL-2 em resposta aos antígenos do HPV,

corroborando com os achados de Machado *et al.* (2004) que reportou uma diminuição nessas citocinas de acordo com o agravamento da doença e os de Sharma *et al.* (2007) que além de demonstrem que os níveis de IFN- γ e IL-2 decresciam com a gravidade da lesão, também evidenciaram que os níveis séricos de IL-4 e IL-10 estavam elevados em todas as pacientes com câncer (SENBA *et al.*, 2012; ZHOU *et al.*, 2019).

Paralelamente, diversos estudos têm apontado a concentração de TGF- β mais elevada nos casos de lesão mais grave quando comparadas ao colo normal (DIAZ-CHAVEZ *et al.*, 2008; KIRMA *et al.*, 2007; LUCENA *et al.*, 2011). Sabe-se que o TGF- β é capaz de induzir a diferenciação de células T regulatórias (Tregs), assim como, essas possuem a capacidade de suprimir e favorecer seletivamente os perfis de resposta imune, como as do tipo Th1 e Th2. Portanto, as Tregs desempenham papel na imunopatogênese das infecções virais crônicas de estimulação imune persistente estando presentes em mulheres com lesões cervicais avançadas ou câncer (DE JONG *et al.*, 2004; SAKAGUCHI, 2003; SENBA *et al.*, 2012; ZHOU *et al.*, 2019).

Figura 12 – Vias desreguladas pela expressão das oncoproteína E6

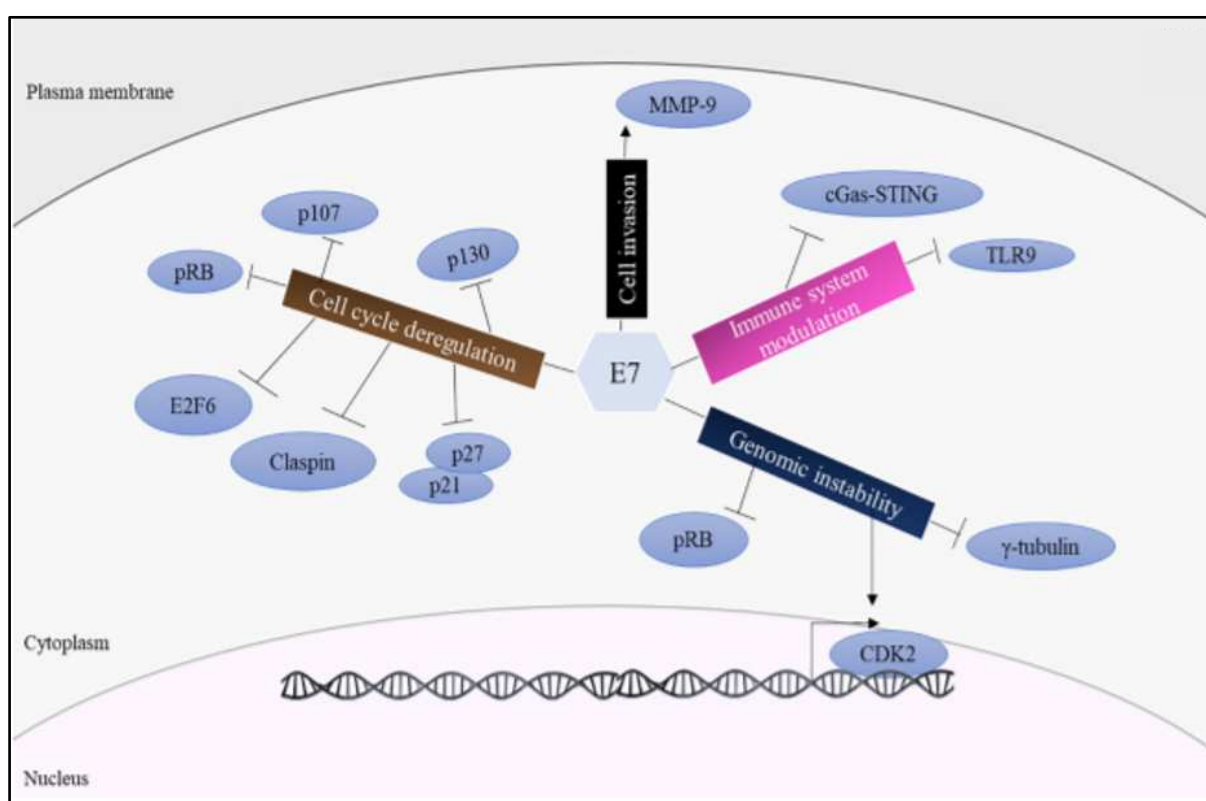


Fonte: Adaptado de Estevão *et al.*, 2019.

Legenda: A – Figura evidencia as vias celulares que são desreguladas pela expressão da oncoproteína E6 entre elas, o sistema imune (rosa), escape da morte celular (cinza), invasão celular (preto), imortalização celular (azul claro), instabilidade genômica (azul escuro) e desregulação do ciclo celular (marrom).

De uma forma geral, a resposta imune eficiente contra o HPV é celular, mediada por linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺ (MACHADO et al., 2004). Embora existam evidências de que a imunidade humoral seja ativada através da secreção de imunoglobulinas (Ig) A e IgG, encontradas em abundância na região cervical (LIMBERGER et al., 2012; MACHADO et al., 2004); estas Ig não participam de forma efetora na resposta contra o HPV, uma vez que o ciclo de vida viral é estritamente intracelular (GUIMARÃES et al., 2011).

Figura 13 – Vias desreguladas pela expressão da oncoproteína E7



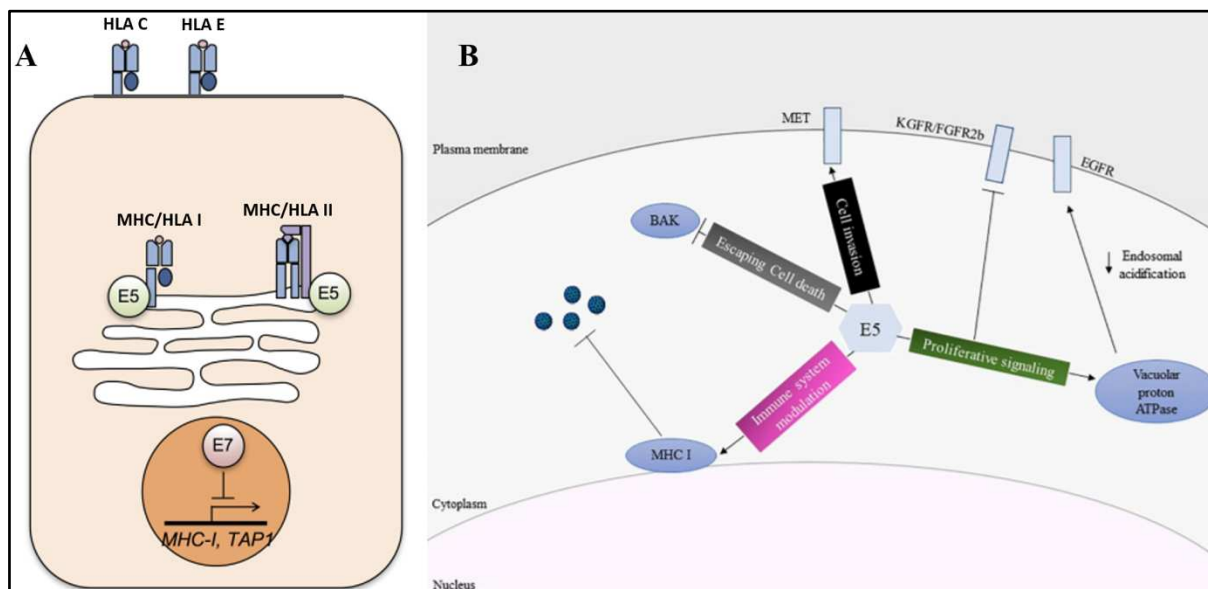
Fonte: Adaptado de Estevão *et al.*, 2019.

Legenda: a figura evidencia as vias celulares que são desreguladas pela expressão da oncoproteína E7 entre elas, o sistema imune (rosa), invasão celular (preto), instabilidade genômica (azul escuro) e desregulação do ciclo celular (marrom).

Por fim, apesar de apresentarem diferenças nos mecanismos de evasão à resposta imune, a maioria dos estudos apontam para o mesmo desfecho, a expressão de um perfil de resposta imune adaptativa predominantemente Th 2, indicando que a progressão para lesões precursoras do câncer do colo do útero pode estar associada à regulação de citocinas gerando uma mudança no padrão de resposta, de celular para humoral, ou seja, uma troca de perfil Th1 para Th2 (DE JONG et al., 2004; GUIMARÃES et al., 2011; SAKAGUCHI, 2003). Ainda, estudos indicam que o entendimento da regulação das moléculas do sistema imune e do HPV gerados por

moléculas como os microRNAs (miRNAs), permite revelar mecanismos envolvidos com o desenvolvimento de câncer (BANNO et al., 2014a; BEN et al., 2015; SHARMA; PRIYADARSHINI; VRATI, 2015; WESTRICH; WARREN; PYEON, 2017).

Figura 14 – Mecanismo da oncoproteína E5 regulando o sistema imune através da regulação do MCH/HLA nas células e vias que a expressão dessa proteína é capaz de desregular



Fonte: adaptado de Westrich, Warren, Pyeon, 2017 e Estevão *et al.*, 2019.

Legenda: **A)** esquema identificando a supressão específica da expressão das moléculas de MCH/HLA A e B, sendo as moléculas C e E expressas normalmente na superfície celular. **B)** Figura evidencia as vias celulares que são desreguladas pela expressão da oncoproteína E5 entre elas, o sistema imune (rosa), escape da morte celular (cinza), invasão celular (preto) e sinalização da proliferação celular (verde).

1.2.5 microRNAs: biogênese, função e regulação

Os miRNAs maduros são pequenos RNAs endógenos bem conservados, de fita simples, não-codificantes que apresentam aproximadamente 22 nucleotídeos de tamanho (18-25 nt) e atuam, principalmente, reprimindo a expressão de proteínas e promovendo a degradação de RNAs mensageiros (mRNAs) específicos pela ligação direta a região 3' não traduzida (3'UTR) destas moléculas (BARTEL, 2004b; O'CONNELL et al., 2010b).

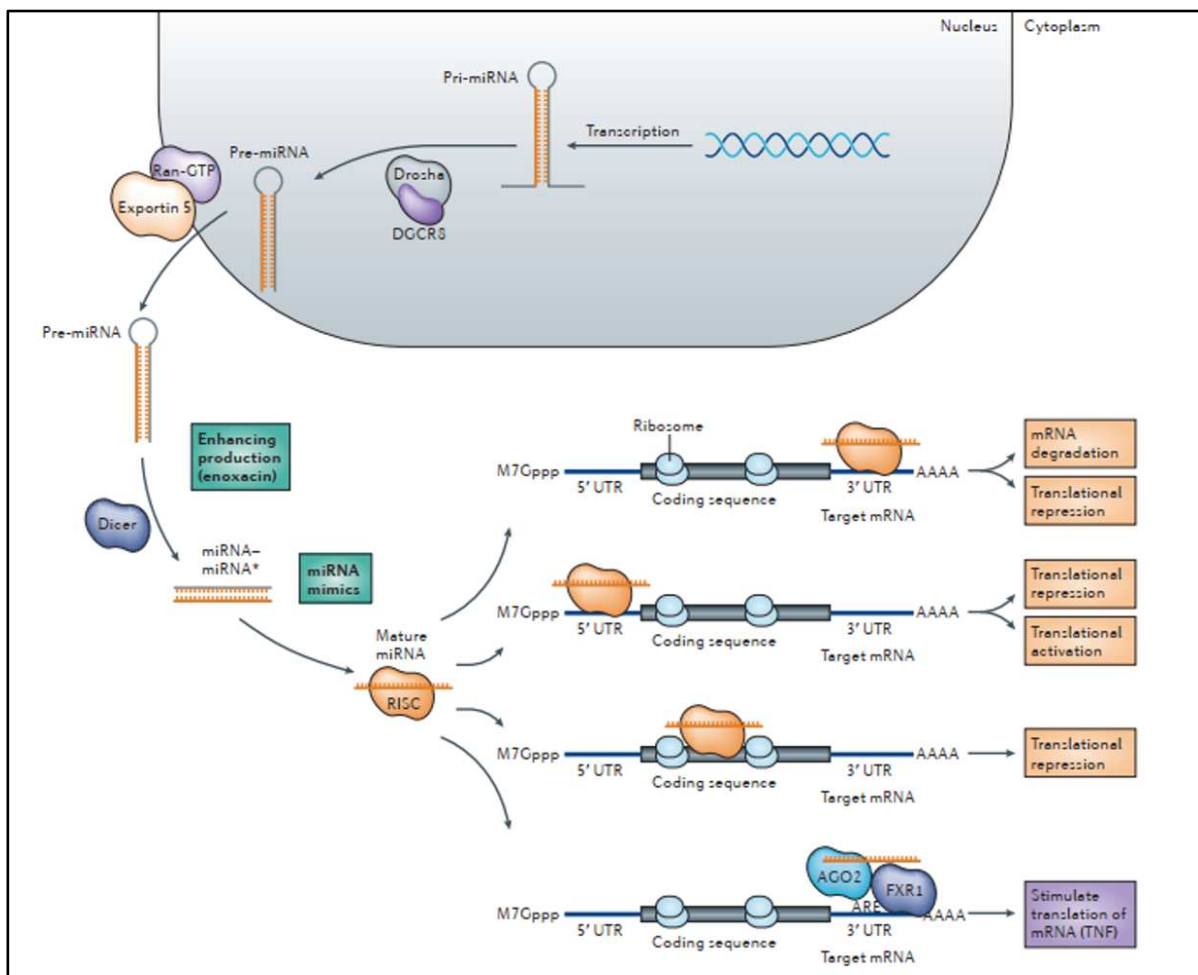
Os miRNAs são inicialmente transcritos pela RNA Polimerase II como transcritos primários longos, com o cap 5' e poliadenilados na terminação 3' (pri-miRNAs). Ainda no núcleo, os pri-miRNAs tem suas extremidades clivadas pela RNase III, denominada *Drosha*, que forma um complexo proteico com a DGCR8 (proteína de ligação a RNA dupla fita - dsRNA) para

produzir precursor com loop de tamanho aproximado 70 nt e com formato de grampo (pre-miRNA). Os pre-miRNAs são translocados para o citoplasma pelo complexo proteico Exportina-5/Ran e posteriormente processados pela enzima citocromo RNase III denominada *Dicer*, produzindo dúpiques de 22 nt. Essas dúpiques de RNA se associam às proteínas, geralmente às argonautas, formando complexos que promoverão as funções do miRNA (miRNA maduro) nos respectivos mRNA alvo (**Figura 15**) (LING; FABBRI; CALIN, 2013; ROVIRA; GÜIDA; CAYOTA, 2010).

Inicialmente descritos por Lee *et al.* (1993) sendo produzidos em *Caenorhabditis elegans*, os miRNAs não tiveram sua função bem estudada até o início do ano 2001, no entanto, atualmente sabe-se que cada miRNA pode ter o potencial de reprimir a expressão de diversos genes alvo e mais de 100 deles são expressos pelas células do sistema imune, apresentando assim a capacidade de influenciar amplamente vias moleculares associadas ao desenvolvimento e função das respostas imunes inata e adaptativa (HUI et al., 2013). Apesar de terem como principal função a regulação negativa dos mRNAs alvo, estudos recentes têm descritos novos mecanismos de ação para os miRNAs (EIRING et al., 2010; LING; FABBRI; CALIN, 2013; ØROM; NIELSEN; LUND, 2008; VASUDEVAN; TONG; STEITZ, 2007). Os miRNAs podem aumentar a tradução de um mRNA alvo recrutando complexos de proteínas para os elementos ricos em AU (Adenina/Uracila) do mesmo (VASUDEVAN; TONG; STEITZ, 2007), podem aumentar a produção de proteína alvo por inibir a repressão da tradução do seu mRNA, reprimindo proteínas que bloqueiam a tradução do gene alvo (EIRING et al., 2010) e podem aumentar a síntese global de proteínas através da potencialização da biogênese do ribossomo (ØROM; NIELSEN; LUND, 2008).

Além de poderem alterar diversas vias celulares de forma autócrina, regulando a tradução de mRNAs alvos na célula em que foram sintetizados, os miRNAs também possuem a capacidade de regular processos e vias de expressão gênica em células vizinhas, de forma parácrina, e em células distantes das que foram produzidos, realizando o seu efeito de regulação de forma endócrina (LING; FABBRI; CALIN, 2013). Essa capacidade de regulação a distância dos miRNAs só é possível devido ao empacotamento e transporte extracelular por via hematogênica (**Figura 16**), dos miRNAs associados à proteínas de ligação ao RNA (argonauta 2 – AGO2 e nucleofosmina 1), em pequenas vesículas ou exossomos; que, posteriormente, são endocitados pelas células em que ocorrerá a função efetora do miRNA (MARTIN et al., 2008; VALADI et al., 2007).

Figura 15 – Biogênese do miRNA e função no RNA mensageiros alvo

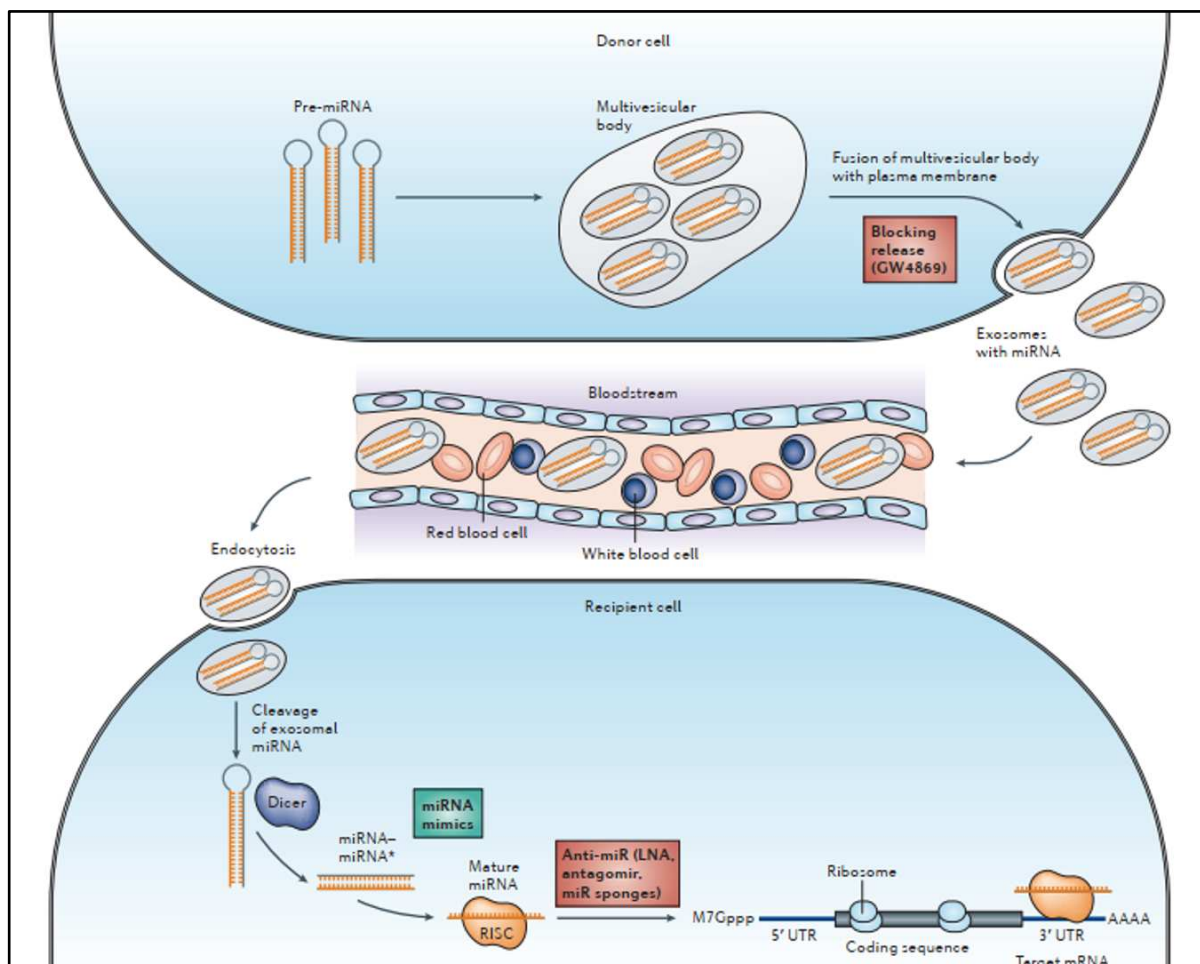


Fonte: Ling; Fabbri; Calin, 2013.

Legenda: Imagem demonstra as etapas do processo de biogênese de um miRNA maduro, desde sua transcrição no núcleo e processamento de suas moléculas precursoras (pri-miRNA e pré-miRNA) até suas possibilidades de função do miRNA no mRNA alvo, podendo promover a estimulação ou a repressão de sua tradução ou sua degradação a depender do local de atuação no mRNA.

Devido às funções regulatórias como o ajuste de expressão de genes de forma transcricional e pós-transcricional, os miRNAs são considerados moléculas chave em diversos processos fisiológicos e patológicos (WANG; CHEN, 2019). Foi observado que miRNAs podem diminuir em quatro vezes a expressão dos genes E6 e E7 do HPV-18 em cultura de células, restabelecendo as funções das proteínas supressoras de tumor p53 e pRB (Proteína do Retinoblastoma) nessas células (DÍAZ-GONZÁLEZ et al., 2015).

Figura 16 – Ação de regulação de forma endócrina dos miRNAs



Fonte: Ling; Fabbri; Calin, 2013.

Legenda: A ilustração demonstra o processo de empacotamento dos miRNAs e proteínas acessórias em exossomos, seu transporte por via hematogênica e a captação por endocitose dessa vesícula na célula em que a função de regulação acontecerá.

Além disso, sabe-se que as oncoproteínas E6 e E7 do HPV provocam desregulação da proliferação celular e inibição do processo de apoptose pela degradação da proteína supressora tumoral p53 e alteração funcional de pRb, além de outras moléculas. A p53 atua em diversos processos celulares regulando a expressão de diversos genes, incluindo genes de miRNAs. Assim, a infecção por HPV acarreta em descontrole de diversas vias biológicas dependentes da ação de miRNAs através da atuação de suas oncoproteínas (DÍAZ-GONZÁLEZ et al., 2015).

Estudos indicam que os miRNAs possuem a capacidade de atuar como reguladores da resposta imune, através de comunicação entre células cancerígenas e células responsáveis por ativar respostas imunes (BOSISIO et al., 2019; CHALLAGUNDLA et al., 2015; SALVI et al., 2018). Existem evidências de que a interação entre o miR-21 e o mRNA do gene *TLR8* age como núcleo do mecanismo entre as células imunes inatas e as células nervosas afetadas pelo

processo cancerígeno, levando ao aumento da resistência à quimioterapia no neuroblastoma (BOSISIO et al., 2019). Assim, estudos demonstraram que a liberação de miR-21 das células cancerígenas via exossomos, é capaz de desencadear a ativação de monócitos através dos TLR8; e em resposta à este estímulo os monócitos liberam miR-155 através de exossomos que são enviados de volta para as células de neuroblastoma e, por fim, os miR-155 podem aumentar a resistência à quimioterapia através da atuação no mRNA do inibidor da telomerase, denominado *TERFI* (BOSISIO et al., 2019; CHALLAGUNDLA et al., 2015).

1.2.6 microRNAs e o câncer

A primeira associação entre os miRNAs e o câncer foi descrita por Calin et al. (2002) que durante uma busca para identificar supressores de tumor na região cromossômica 13q14, previamente associada como uma região frequentemente deletada nos casos de leucemia linfocítica crônica (LLC); descobriram que o gene que transcreve os miR-15a – miR-16-1, estava localizado na região deletada e que os miRNAs encontravam-se suprimidos através do silenciamento epigenético em 69% dos pacientes analisados (CALIN et al., 2002).

Desde esta descoberta tem sido observado que a expressão de miRNAs está desregulada em diversos tipos de câncer, onde podem apresentar atividades de supressão ou promoção tumoral dependendo da natureza de seus mRNAs alvo, sendo considerado uma das alterações que contribuem para o processo de carcinogênese (BANNO et al., 2014; O'CONNELL et al., 2010; SHARMA, et al., 2016). Atualmente, os miRNAs são divididos em dois mecanismos de atuação, com relação ao desenvolvimento da carcinogênese, os *oncomirs* são microRNAs com elevada expressão que atuam em mRNAs de genes supressores tumorais, enquanto os miRNAs supressores tumorais geralmente atuam em oncogenes e podem apresentar expressão diminuída em cânceres (BANNO et al., 2014b).

Com relação ao câncer de colo uterino, sabe-se que a infecção persistente por determinados tipos de HPV é reconhecida como um agente causal importante no seu desenvolvimento. Como citado no tópico anterior, os miRNAs podem diminuir em quatro vezes a expressão dos genes *E6* e *E7* da cepa viral tipo 18 do papilomavírus humano e assim reestabelecer as funções das proteínas supressoras de tumor p53 e pRb (Proteína do Retinoblastoma) em cultura de células. Assim, as oncoproteínas E6 e E7 do HPV podem provocar aumento da proliferação celular e inibição do processo de apoptose através degradação da proteína supressora tumoral p53 e

alteração funcional de pRb, além de outras moléculas (WESTRICH; WARREN; PYEON, 2017).

Ben et al. (2015) investigaram o papel da infecção por HPV e expressão da proteína E6 na regulação da expressão de miRNAs em linhagem de células HeLa, observando alterações em miR-21, miR-218 e miR-27a após transfecção com vetor expressando E6 (48 horas). O miR-21 teve sua expressão aumentada, enquanto o miR-218 e o miR-27a apresentaram um declínio na expressão. Esses dados foram confirmados quando foi introduzido um pequeno RNA de interferência antisenso (siRNA) ao E6, provocando bloqueio na expressão da proteína. A expressão do miR-21 foi diminuída e a do miR-218, aumentada, evidenciando o papel de E6 na desregulação destes miRNAs.

Os autores demonstraram ainda que o aumento na expressão de miR-21 leva à repressão de *PTEN* (do inglês *Phosphatase-Tensin Homolog*), um gene supressor tumoral frequentemente mutado em cânceres, e quando este miRNA foi silenciado, a expressão do gene *PTEN* foi recuperada. O miR-21 foi identificado neste estudo exercendo também um papel importante na habilidade de migração e invasão celular, sendo observada diminuição na capacidade de migração em células co-transfectadas com inibidor de miR-21 e vetor de expressão de E6 (BEN et al., 2015).

A avaliação do perfil global de miRNAs em amostras cervicais pré-cancerosas, cancerosas e normais revelou assinaturas de miRNAs relacionadas à carcinogênese cervical mediada por HPV em mulheres da Índia (SHARMA, et al., 2016). Neste trabalho, a presença e ausência de HPV e os tipos virais foram determinadas nas amostras de pacientes e foram utilizadas linhagens celulares positivas (SiHa e HeLa) e negativas (C33A) para o vírus com o intuito de avaliar a influência do HPV no perfil de miRNAs expressos. Foram observados 182 miRNAs diferencialmente expressos entre as linhagens HPV-positivas e a linhagem HPV-negativa, além de novos miRNAs terem sido identificados (miR-892b, miR-500 e miR-711) nas lesões cervicais pré-cancerosas e no câncer, mostrando o potencial destas moléculas como marcadores de carcinogênese (SHARMA, et al., 2016).

Apesar do HPV estar intimamente ligado ao processo de desenvolvimento do câncer de colo uterino, um estudo com pacientes chinesas portadoras da doença demonstrou a expressão reduzida de miR-145 no tecido canceroso quando comparado ao tecido normal cervical adjacente das pacientes, independente da infecção por HPV. O miR-145 reprime a expressão do gene codificante da quinase dependente de ciclina (CDK6), uma proteína envolvida no controle do ciclo celular, e foi associado a um pior prognóstico. As pacientes com metástase

em linfonodos e estágio avançado de câncer apresentaram níveis significativamente menores do miR-145 em relação àquelas com estágio inicial e ausência de metástase em linfonodos. A análise de sobrevida pela curva de Kaplan-Meier demonstrou o valor prognóstico dos níveis de expressão de miR-145 no câncer cervical, evidenciando uma taxa de sobrevida bastante reduzida nas pacientes com níveis diminuídos da molécula em relação àquelas com níveis superiores a 2.5 de expressão relativa (WANG, et al., 2015).

No entanto, os mecanismos moleculares que utilizam miRNAs e resultam no desenvolvimento de câncer cervical, independente da sua relação com a infecção por HPV ou não, ainda não estão completamente esclarecidos. Desta maneira, o entendimento da regulação das moléculas do sistema imune e do HPV, gerado por moléculas como os miRNAs, permite revelar mecanismos envolvidos com o desenvolvimento de câncer (BANNO et al., 2014b; BEN et al., 2015; SHARMA, et al., 2016; WONG et al., 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar o papel dos microRNAs na regulação pós-transcricional de genes relacionados a resposta imune e controle de ciclo celular no câncer de colo uterino de pacientes infectadas por HPV, determinando o perfil de expressão diferencial de miRNAs na mucosa cervical de pacientes com câncer cérvico-uterino desenvolvido e validar laboratorialmente sua expressão diferencial em células com lesões pré-cancerosas.

2.2 ESPECÍFICOS

- Identificar o perfil de miRNAs diferencialmente expressos em amostras de tecido cervical frente a infecção por diferentes tipos HPV;
- Estudar, *in silico*, possíveis sítios de ligação de miRNAs em genes relacionados com a regulação do ciclo celular;
- Realizar avaliação de impacto em vias associadas ao câncer e ao sistema imune, estudar a associação entre os miRNAs diferencialmente expressos identificados e mecanismos relacionados ao desenvolvimento do CCU;
- Detectar a infecção por HPV e classificar o tipo viral das variantes genéticas nas amostras para realizar a confirmação laboratorial da expressão diferencial de miRNAs em tecido cervical;
- Realizar a validação laboratorial da expressão diferencial dos miRNAs identificados pelo estudo de bioinformática frente as variáveis clínicas de infecção viral e de classificação das lesões pré-cancerosas.

3 MATERIAIS E METODOS

3.1 POPULAÇÃO UTILIZADA NOS ESTUDOS DE BIOINFORMÁTICA

Para a realização do estudo de bioinformática, foram utilizados dados públicos de pacientes provenientes da base TCGA (do inglês *The Cancer Genome Atlas*), disponíveis pelo portal do *Genomic data Commons* (GDC - <https://gdc-portal.nci.nih.gov/>) e contendo, no total para todos os projetos, aproximadamente 11 Terabytes de dados. Neste estudo utilizamos os dados do projeto cervical escamoso, carcinoma celular e adenocarcinoma endocervical (CESC) do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), e através dos resultados das contagens de miRNAs de cada amostra realizamos análises de expressão diferencial utilizando a condição de infecção por HPV como variável independente, sendo colocado no grupo caso as contagens das pacientes que desenvolveram câncer cervical estando infectadas por HPV e no grupo controle as pacientes com câncer cervical não infectadas pelo vírus. O conjunto de dados foi baixado do portal GDC através do TCGABiolinks (COLAPRICO et al., 2016), um pacote R/Biocondutor desenvolvido para facilitar a recuperação de dados de acesso aberto do GDC. Em geral, o projeto de dados do CESC-TCGA compreende o sequenciamento de microRNAs de 307 pacientes, bem como suas informações clínicas previamente caracterizadas (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2017).

3.2 FILTRAGEM E MINERAÇÃO DE DADOS UTILIZANDO O AMBIENTE R

A fim de minimizar as variáveis que afetam a expressão diferencial de miRNAs, realizamos algumas exclusões de pacientes com base em suas informações clínicas. Utilizamos cepas do papilomavírus humano de alto risco para o desenvolvimento do câncer (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, 58, 59, 68, 73) como a principal característica a ser analisada neste trabalho. Além disso, aplicamos filtros de seleção excluindo do estudo os pacientes com *status* indeterminado de infecção por HPV e os pacientes infectados por mais de um tipo de HPV e selecionamos dados de mulheres infectadas pelo papilomavírus humano de alto risco, com pelo menos sete pacientes infectadas pelo mesmo tipo de HPV. Desta maneira, dividimos nossas pacientes em dois grupos: um composto pelos dados de mulheres com câncer e infectadas com cepas específicas de HPV (HPV16 +, HPV18 +, HPV33 +, HPV45 +, HPV52 +, HPV58 + ...) e outro

composto por mulheres com câncer e não infectadas por qualquer cepa de HPV (HPV-). Também foram filtrados os miRNAs que foram submetidos à análise de expressão diferencial (DEA), cada paciente teve 1881 miRNAs mapeados e reportados, pelo TCGA, em arquivos de contagem bruta. Para minimizar as falsas descobertas de miRNAs, excluimos da DEA os miRNAs que não tinham pelo menos 20 contagens de leitura em 20% das pacientes em cada grupo usado na análise (ALMEIDA et al., 2022), o HPV específico e o HPV negativo, respectivamente.

3.3 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL (DEA)

A maioria das análises de bioinformática foi realizada em ambiente R usando o software R Studio (<https://www.rstudio.com>) e foram realizadas por *scripts* desenvolvidos especificamente por nosso grupo para essas análises. O DEA foi realizado usando o programa R especificamente com o pacote do Bioconductor chamado edgeR (<https://cran.r-project.org/>), utilizando como ponto de corte $|1|$ log de *Fold Change* (logFC) e 0,05 para taxa de descoberta falsa (FDR), aplicados após o DEA para restringir o resultado e diminuir a taxa de erro tipo β da análise, assim, excluindo descobertas de miRNAs falso negativos. Todos os conjuntos de miRNAs diferencialmente expressos (DE_miRNAs) foram filtrados pelos pontos de corte descritos anteriormente e identificados para cepas específicas de HPV, comparando-se sempre o grupo HPV negativo contra o grupo HPV positivo infectado por uma cepa específica, após a realização desta etapa para cada tipo específico de HPV os resultados DEA foram concatenados em um arquivo e utilizados para realizar comparações com a finalidade de encontrar interseções entre os resultados específicos de DEA para cada cepa infectante. No ambiente R, identificamos os miRNAs diferencialmente expressos (DE_miRNAs) exclusivamente para uma cepa específica do HPV, para duas ou mais cepas específicas e aqueles encontrados mutuamente para todas as cepas de HPV testadas.

3.4 PREDIÇÃO DE ALVO DE MIRNA

Para melhorar a seleção dos genes alvos dos miRNA associados à patogênese do câncer cervical induzido pela infecção por HPV, rastreamos o miRNA quanto à forte capacidade de ligação com os oncogenes virais (*E6* e *E7*) e dois genes supressores humanos (*RBI* e *TP53*). As

predições de alvo para os DE_miRNAs foram realizadas usando a ferramenta *RNA Hybrid* (<https://bibiserv2.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid>), que nos permitiu estabelecer a energia livre de Gibbs (ΔG) para um miRNAs e sua interação com RNA mensageiro (mRNA), portanto, permitindo estimar se um mRNA específico poderia ser um alvo de miRNA e a localização mais provável de interação entre essas duas moléculas. A fim de identificar apenas as interações moleculares mais prováveis para essas predições, definimos um ponto de corte mais estrigente utilizando neste estudo o valor da $\Delta G \leq -30$ Kcal/mol, quando o recomendado para identificação destas interações é $\Delta G \leq -20$ Kcal/mol (REHMSMEIER, et al. 2004). Primeiro, rastreamos miRNAs com base na semelhança com as sequências *E6* e *E7* específicas para cada tipo de HPV. Usamos as sequências *E6* e *E7* disponíveis no banco de dados NCBI para HPV-16 (NC_001526.4), HPV-18 (GQ180792.1), HPV-33 (M12732.1), HPV-45 (KC470260.1), HPV-52 (LC373207.1) e HPV-58 (KY225967.1). Em seguida, investigamos a interação entre os miRNAs selecionados e a sequência codificante (*CDS_p53*, U94788.1) e a região 3' não traduzida (3'UTR, KT585267.1) do gene supressor de tumor *TP53*, e o gene 3'UTR (NM_000321.3) do gene humano *RB1*. Assim, as sequências de miRNAs semelhantes aos genes virais *E6* e *E7* que também tiveram ligações previstas para os genes supressores de tumor humano foram usadas em uma análise de predição dos genes alvo de miRNA adicional, usando sequências de mRNA presentes no banco de dados miRWalk 2.0 e em 11 outros bancos de dados integrados a ferramenta de programa miRWalk 2.0 (<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/miRretsys-self.html>). Os alvos previstos pelo próprio algoritmo miRWalk em pelo menos três bancos de dados foram submetidos às análises de anotação funcional usando o *Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery* (DAVID) v6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/>). O *Gene Ontology Biological Process* (GO-BP), as vias da Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (KEGG) e os bancos de dados Biocarta foram usados para obter vias enriquecidas com valores de p corrigidos por Benjamini-Hochberg $<0,05$.

3.5 POPULAÇÃO UTILIZADA NA CONFIRMAÇÃO DOS ACHADOS DE BIOINFORMÁTICA

Para a validação laboratorial dos dados encontrados *in silico* durante as etapas de bioinformática foi estruturada uma coorte prospectiva por um período de dois anos em dois centros de referência para atendimento de mulheres, incluindo o Centro Integrado de Saúde

Amaury de Medeiros (CISAM) e o Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP). A população de estudo foi composta por 400 mulheres, recrutadas por demanda espontânea, atendidas nos centros de referência, com idade mínima de 18 anos que aceitaram participar do estudo e tendo assinado o termo de consentimento livre e esclarecido (**Apêndice E**). Assim, as participantes concederam amostras de raspado cervical, para realização do diagnóstico do HPV, tipagem da cepa infectante e quantificação dos níveis de miRNAs nestes tecidos. Os resultados de colposcopia e exame citológico foram coletados a partir dos registros hospitalares/ambulatoriais das pacientes. Para avaliação de associação entre os miRNAs e as lesões pré-cancerosas, os testes foram realizados utilizando o grupo caso sendo composto por amostras de mulheres com lesões cervicais de alto grau, e as amostras de lesões de baixo grau formarão o grupo controle.

3.6 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE INFECÇÃO POR HPV

A extração de DNA genômico foi realizada a partir de células cervicais utilizando o *illustra™ tissue and cells genomicPrep Mini Spin Kit*. Após a purificação o DNA viral na amostra clínica foi detectado pela reação de PCR utilizando os iniciadores degenerados MY9 e MY11 para amplificação de fragmento do gene *L1* do HPV, com tamanho aproximado de 450 pb, seguindo protocolo prévio de nosso grupo (MARTINS et al., 2014a; MARTINS et al., 2014b). Como controle positivo da reação foi utilizado plasmídeo com sequência de DNA viral clonada em laboratório, como controle negativo uma amostra sabidamente negativa para HPV e como controle de contaminação a reação na ausência de amostra. A qualidade do DNA extraído foi avaliada pela capacidade de amplificação do gene humano constitutivo *GAPDH*. O produto amplificado foi visualizado em gel de agarose a 2,0% em tampão TAE corado com 0,1µg/µl de brometo de etídeo, quando visualizada a banda única as amostras foram enviadas ao Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) para serem sequenciadas utilizando o equipamento *Genetic Analysing* ABI 3500 (Applied Biosystem). Amostras apresentando picos definidos e baixo background no cromatograma foram submetidas ao programa BLASTn do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) através de BLAST específico contra o banco de dados PAVE (*P*Apilloma*V*irus *E*pisteme) do NIH (*National Institutes of Health*).

3.7 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA PARA ESTUDO DE MIRNAS

A extração de RNA total das amostras cervicais foi realizada com o reagente Trizol (Invitrogen, Califórnia - EUA), foram utilizadas apenas preparações de RNA com pureza e integridade adequadas. O controle de qualidade de biomoléculas neste projeto foi estabelecido utilizando análises com o fluorômetro Qubit através do *Qubit microRNA Assay Kit* e o sistema de eletroforese de microcanais Bioanalyzer 2100 utilizando o *Bioanalyzer Small RNA Analysis kit*, todos os protocolos utilizados foram seguidos de acordo com as recomendações dos fabricantes.

3.8 VALIDAÇÃO DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DOS MIRNAS IDENTIFICADOS

A quantificação da expressão de miRNAs específicos identificados como diferencialmente expressos na análise de miRNoma foi realizada por PCR em tempo real, a fim de validar os microRNAs diferencialmente expressos e identificados com potencial interesse clínico durante as etapas de mineração de dados realizadas por estudos de bioinformática. Utilizamos uma seleção de 50 amostras da coorte prospectiva desenvolvida para este estudo levando em consideração o *status* de infecção por HPV e a gradação de lesão cervical desenvolvida nessas pacientes como variáveis clínicas para realização de testes de associação com os níveis de expressão dos miRNAs. Ensaios de PCR de transcrição reversa (RT-PCR) e PCR quantitativo (Q-PCR) foram realizados em um termociclador *SimpliAmp* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA) e um sistema *QuantStudio™ 5 Real-Time PCR* (Applied Biosystems). Para avaliar a expressão do miRNA, o *TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit* (Life Technologies, Foster City, Califórnia, EUA), o *TaqMan Advanced miRNA Assays* (referência: miR-191-5p; alvos: miR-150-3p, miR-204 -3p, miR-330-3p; Life Technologies) e o *TaqMan Fast Advanced Master Mix* (Life Technologies) foram usados de acordo com as instruções do fabricante. Os cálculos de quantificação relativa de expressão foram realizados conforme o manual técnico da Applied Biosystems (Disponível em: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/100027897_TaqManAdv_miRNA_Assays_UG.pdf), Através do método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de expressão de miRNAs foram avaliados em relação aos dados clínico-laboratoriais das pacientes, a fim de identificar associações e/ou correlações entre os dados. As amplitudes de variação, médias e desvios padrão de variáveis contínuas foram estimadas utilizando-se os softwares Epi Info 6, GraphPad InStat 3.06 e GraphPad Prism. Quando necessário a comparação de médias entre 2 grupos, foram aplicados os testes t de *student* (paramétrico) ou Mann-Whitney (não paramétrico). A comparação de médias entre 3 ou mais grupos foi realizada por meio das análises de ANOVA (paramétrica) ou Kruskal-Wallis (não-paramétrica), seguidas dos pós testes de Tukey e Dunn, respectivamente. A decisão entre aplicação de testes paramétricos e não paramétricos foi baseada no resultado dos testes D'Agostino-Pearson omnibus, Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov para avaliação da normalidade. Por fim, para todos os testes utilizados, a hipótese de nulidade foi rejeitada, quando possibilidade de ocorrência casual das diferenças observadas não excedeu 5% ($p < 0,05$).

4 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente projeto foi parte do projeto "Contribuição de moléculas imunoregulatórias no câncer de colo uterino: polimorfismo gênico, perfil de expressão de mRNA, regulação por microRNAs, e perfil da resposta imunitária frente a infecção por variantes genéticas de HPV" apresentado ao CEP do CPqAM (CAAE: 51111115.9.0000.5190); sendo um desdobramento do projeto "Biossensor para diagnóstico de infecção cervical por HPV: ferramenta para rastreamento e seguimento de mulheres sob risco de desenvolver o câncer de colo do útero" (CAAE: 23698513.0.0000.5190) aprovado no mesmo comitê de ética em pesquisa com seres humanos (**Anexo A**), no qual construímos uma coorte de mulheres com lesão cervical recrutadas por demanda espontânea, com idade mínima de 18 anos que aceitaram participar do estudo, tendo assinado o termo de consentimento livre e esclarecido (**Apêndice E**).

5 RESULTADOS

5.1 POPULAÇÕES DE ESTUDO

5.1.1 Característica da população do banco de dados TCGA

Apesar de ter 307 pacientes incluídos no projeto CESC, fizemos o download de 312 arquivos de sequenciamento de microRNAs; estes cinco arquivos adicionais se devem à algumas pacientes que tiveram o sequenciamento amostras pareadas realizado, sendo duas pacientes com amostras de tecido tumoral e metastático, além de três pacientes com amostras de tumor e tecido normal sequenciados. Devido aos critérios de exclusão que foram aplicados para estabelecer os grupos usados para análise comparativa, tivemos uma perda expressiva no número de pacientes disponíveis para a DEA, pois além das pacientes com diagnóstico indeterminado e daquelas que possuíam coinfeção, somente grupos com ao menos 7 pacientes foram inclusos na etapa de análise comparativa. Assim, os dados de 248 mulheres infectadas por HPV-16, HPV-18, HPV-45, HPV-33, HPV-52, e o HPV-58 compuseram o grupo HPV-positivo (**Tabela 2**) e os dados de 22 mulheres com câncer colo do útero não infectadas pelo HPV, consideradas como grupo de referência (grupo HPV-negativo). Todos os pacientes incluídos no fluxo de análise estavam com câncer, apesar do status de HPV.

Tabela 2 - Cepas infectantes incluídas na análise de expressão diferencial de miRNA com o respectivo número de pacientes de cada grupo

Cepa de HPV infectante	Número de pacientes incluídas no DEA
HPV16⁺	163
HPV18⁺	38
HPV31 ⁺	5
HPV33⁺	9
HPV35 ⁺	6
HPV39 ⁺	5
HPV45⁺	24
HPV51 ⁺	1
HPV52⁺	7
HPV56 ⁺	1
HPV58⁺	7
HPV59 ⁺	4
HPV68 ⁺	2
HPV73 ⁺	2

Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

5.1.2 Coorte para validação e perfil de infecção por HPV em Pernambuco

O diagnóstico da infecção por HPV foi realizado através da detecção do DNA viral por PCR convencional, utilizando o par de *primers* My09 e My11, seguida do sequenciamento do fragmento amplificado, para realização da tipagem viral através do alinhamento de sequências de bases em bancos de dados específicos, dentre eles, o PAVE (**Figura 17**) e o nt/nr do NCBI. Os processos de amplificação tanto do DNA viral, como o do gene *GAPGH* foram realizados para todas as 400 pacientes incluídas no estudo, destas, aproximadamente 30% (119) das apresentaram positividade para a infecção por HPV e tiveram a tipagem viral realizadas (**Tabela 3**).

Tabela 3 – Perfil de infecção por tipos de cepas de HPV em dois centros de referência, IMIP e CISAM, localizados em Recife-PE no período de 2018-2020

Tipo de cepa infectante	Número de pacientes infectadas	Porcentagem em relação às pacientes infectadas (%)
HPV 6	3	2,52
HPV 11	2	1,68
HPV 16	55	46,22
HPV 18	5	4,20
HPV 31	5	4,20
HPV 33	13	10,92
HPV 35	1	0,84
HPV 51	1	0,84
HPV 52	4	3,36
HPV 53	1	0,84
HPV 58	10	8,40
HPV 59	1	0,84
HPV 61	2	1,68
HPV 62	1	0,84
HPV 66	4	3,36
HPV 68	1	0,84
HPV 70	1	0,84
HPV 71	2	1,68
HPV 72	1	0,84
HPV 81	2	1,68
HPV 83	3	2,52
HPV 85	1	0,84

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Figura 17 – Alinhamento realizado contra o banco de dados específico HVP-PAVE

Papillomavirus Episteme
A resource of the Bioinformatics and Computational Biosciences Branch at the NIAID Office of Cyber Infrastructure and Computational Biology

Home Search Analyze Explore Links Support About

Papillomavirus Episteme > Search > PV Specific BLAST > Results

Blast Results

Display Result: >IMIP0079_MY11 Display Type: Table view

Database and Query Information

[Download Raw BLAST Results](#)

Results
Query : >IMIP0079_MY11

[Download Sequences](#) [Select All](#) [Deselect All](#)

Locus ID	Description	Score	Query Coverage	E Value	Max ident
HPV33REF	Human papillomavirus 33 (HPV33), complete genome	597.0	100.0%	1.0E-171	100.0%
HPV58REF	Human papillomavirus 58 (HPV58), complete genome	228.0	99.3%	1.0E-60	84.6%
HPV67REF	Human papillomavirus 67 (HPV67), complete genome	107.0	94.4%	3.0E-24	80.5%
HPV31REF	Human papillomavirus 31 (HPV31), complete genome	97.6	72.1%	3.0E-21	80.6%
MfPV3REF	Macaca fascicularis Papillomavirus 3 (MfPV3), complete genome	95.6	22.6%	1.0E-20	92.6%
HPV16REF	Human papillomavirus 16 (HPV16), complete genome	89.7	26.9%	7.0E-19	88.9%
MmPV1REF	Macaca mulata Papillomavirus 1 (MmPV1), complete genome	83.8	44.5%	4.0E-17	82.8%
HPV35REF	Human papillomavirus 35 (HPV35), complete genome	81.8	33.6%	2.0E-16	85.1%
HPV66REF	Human papillomavirus 66 (HPV66), complete genome	77.8	24.9%	3.0E-15	88.0%
MfPV5REF	Macaca fascicularis Papillomavirus 5 (MfPV5), complete genome	67.9	24.6%	3.0E-12	86.5%
HPV73REF	Human papillomavirus 73 (HPV73), complete genome	67.9	36.5%	3.0E-12	82.7%
HPV204REF	Human papillomavirus 204 (HPV204), complete genome	67.9	14.0%	3.0E-12	95.2%
HPV13REF	Human papillomavirus 13 (HPV13), complete genome	67.9	31.2%	3.0E-12	84.0%
MfPV10REF	Macaca fascicularis Papillomavirus 10 (MfPV10), complete genome	65.9	24.3%	1.0E-11	86.3%

Home | Accessibility | Privacy Policy | Disclaimer | Website Links & Policies | FOIA | NIAID Employee Emergency Information

NIH National Institute of Allergy and Infectious Diseases USA.gov

Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

Legenda: Resultado do BLAST realizado entre o sequenciamento da amostra e o banco de dados específico para papiloma vírus do PAVE-NIH, evidenciando com os retângulos vermelhos os valores do melhor alinhamento e o código da amostra submetida ao BLAST.

5.2 ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA *MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ*

Desequilíbrios de miRNAs no processo de desenvolvimento do câncer cervical: o papel das expressões diferenciais dos miR-150-3p, miR-204-3p e miR-330-3p associadas à infecção por HPV

Resumo

MicroRNAs (miRNA) são pequenos RNAs não codificantes endógenos que influenciam os processos celulares por meio da regulação de vias. Embora o papilomavírus humano (HPV) seja considerado o principal fator etiológico no desenvolvimento do câncer cervical, os mecanismos de persistência viral e inflamação crônica que desencadeiam o processo oncogênico ainda não são totalmente compreendidos. Este estudo investigou o perfil de miRNA celular associado à infecção por HPV e seu impacto no desenvolvimento do câncer. Nós extraímos miRNAs diferencialmente expressos em células de câncer cervical de mulheres infectadas ou não pelo HPV usando o banco de dados público TGCA. Posteriormente, validamos os resultados com amostras de lesões pré-cancerosas cervicais. A análise de bioinformática sugeriu que a superexpressão de miR-150-3p e miR-330-3p e a subexpressão de miR-204-3p foram associadas ao desenvolvimento de câncer cervical secundário à infecção por HPV. A validação funcional mostrou que miR-150-3p não foi associado a Infecção por HPV ou gravidade da lesão. Além disso, baixos níveis de miR-330-3p e altos níveis de miR-204-3p foram associados à infecção por HPV em lesões pré-cancerosas cervicais, sugerindo uma mudança de padrão que possivelmente desencadeia o processo de tumorigênese.

Palavras-chave: Vírus do papilomavírus humano, patogenicidade do HPV, neoplasias cervicais uterinas, proteína E6, proteína E7, microRNAs.

Contexto

O papilomavírus humano (HPV) de alto risco é o principal fator etiológico associado ao desenvolvimento do câncer cervical, a terceira causa de morte em mulheres no mundo^{1,2}. A infecção cervical assintomática pelo HPV é prevalente, e a resposta imune celular realiza a mediação da depuração viral na maioria dos casos. Ainda assim, a persistência do vírus e a inflamação crônica desencadeiam o processo oncogênico e a progressão da doença^{2,3}.

A relação relatada entre microRNAs específicos (miRNAs) e o desenvolvimento do câncer sugere que a persistência da infecção pelo HPV altera o perfil celular do miRNA, levando à desregulação imunológica e à transformação maligna cervical⁴⁻⁶. Os miRNAs são pequenos RNAs não codificantes endógenos que influenciam amplamente as vias imunológicas regulando a expressão de múltiplos genes na mesma via^{3,4,7-9}. Em células normais, por exemplo, o miR-145 exerce controle negativo sobre o ciclo celular, reprimindo a expressão da quinase dependente de ciclina 6 (*CDK6*), evitando assim a fosforilação da proteína Rb supressora de tumor e a progressão do ciclo celular. No entanto, baixos níveis do miR-145 na lesão cervical foram associados à fosforilação da proteína Rb e à progressão do ciclo celular, portanto, um marcador de mau prognóstico¹⁰. Níveis aumentados de miR-21 foram também associados à repressão da expressão do homólogo da fosfatase-tensina (*PTEN*), outro gene supressor de tumor, em células pré-cancerosas cervicais, aumentando o risco de malignidade¹¹.

Alguns estudos apontaram para a possibilidade de miRNAs codificados por vírus serem responsáveis pela regulação de processos biológicos fundamentais, como diferenciação e sobrevivência celular, reconhecimento de antígenos e resposta imune^{12,13}. Predições realizadas por ferramentas de bioinformática identificaram miRNAs codificados por HPV¹³. A transcrição realizada pelo HPV de fita dupla permite a regulação de transcritos virais específicos, expressando miRNAs localizados no sentido antisenso em fitas de DNA complementares^{12,14,15}. Além disso, esses miRNAs codificados por vírus exibem a capacidade de atuar como um ortólogo para miRNAs celulares¹⁴⁻¹⁷. Assim, hipotetizamos uma ação sincronizada de miRNAs direcionados à infecção por HPV na regulação dos genes virais E6 e E7 e seus alvos gênicos humanos, principalmente a proteína tumoral p53 (TP53) e o co-repressor transcricional Rb 1 (*RBI*), respectivamente, ambos genes supressores de tumor. Mineramos os miRNAs expressos diferencialmente em células cervicais de mulheres infectadas ou não por HPV usando o banco de dados público TCGA. Depois de selecionar os miRNAs cujas sequências compartilhavam

similaridade com as sequências dos genes virais *E6* e *E7* e com os genes humanos *RBI* e *TP53*, também identificamos alvos gênicos de miRNA preditos e realizamos anotação funcional para vias biológicas. Além disso, validamos a expressão de três miRNAs selecionados em amostras cervicais pré-cancerosas.

Métodos

Mineração de dados de miRNA

Usamos os dados do projeto cervical escamoso, carcinoma celular e adenocarcinoma endocervical (CESC) do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), uma iniciativa de consórcio feita entre o *National Cancer Institute* (NCI) e o *National Human Genome Research Institute* (NHGRI). O conjunto de dados foi baixado do portal *Genomic Data Commons* (GDC) por meio do programa TCGABiolinks¹⁸, usando o pacote R/Bioconductor desenvolvido para facilitar a recuperação de dados de acesso aberto no GDC. O projeto CESC-TCGA compreende 307 pacientes com dados de expressão gênica, sequenciamento de microRNA e informações clínicas, incluindo infecção por HPV e tipagem de cepa infectante. Para minimizar as variáveis que afetam a expressão diferencial de miRNA, aplicamos filtros de seleção, excluindo do estudo os pacientes com *status* indeterminado de infecção por HPV e os pacientes infectados por mais de um tipo de HPV. Selecionamos dados de mulheres infectadas pelo papilomavírus humano de alto risco, com pelo menos sete pacientes infectadas pelo mesmo tipo de HPV. Dados de 248 mulheres infectadas por HPV-16 (n=163), HPV-18 (n=38), HPV-45 (n=24), HPV-33 (n=9), HPV-52 (n=7), e o HPV-58 (n=7) compuseram o grupo HPV-positivo. Para realizar a análise de expressão diferencial (DEA), também selecionamos dados de 22 mulheres com câncer colo do útero não infectadas pelo HPV e consideradas como grupo de referência (grupo HPV-negativo). Em seguida, filtramos os miRNAs e os submetemos às análises de expressão diferencial; cada paciente teve 1.881 miRNAs mapeados e relatados como dados brutos de acertos de contagem pelo TCGA¹⁹. Em seguida, usando um critério de contagem de leitura para minimizar descobertas falso-positivas de miRNA expresso diferencialmente, excluimos do DEA aqueles miRNAs com menos de 20 contagens de leitura em 20% dos pacientes avaliados em cada grupo de tipo de HPV ou grupo negativo de HPV.

Análise de expressão diferencial

Utilizamos o software R Studio (<https://www.rstudio.com>) com *scripts* desenvolvidos por nosso grupo para análises de bioinformática. Para identificar miRNAs diferencialmente expressos (DE_miRNAs), utilizamos o programa *edgeR*, um pacote do R disponível no *Bioconductor* (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/edgeR.html>), com uma abordagem de normalização quantílica e comparamos miRNAs expressos no grupo negativo para HPV aos dados de miRNA obtidos de cada grupo de alto risco para HPV. Para minimizar o erro β , fixamos pontos de limiar em $|1|$ log Fold Change (logFC) e 0,05 para a taxa de descoberta falsa (FDR) após o DEA. Posteriormente, comparamos os DE_miRNAs identificados em cada grupo de HPV de alto risco e selecionamos os miRNAs presentes em pelo menos metade dos grupos de tipos de HPV para estudos posteriores.

Predições de interação entre miRNA-gene alvo e enriquecimento funcional

Para melhorar a seleção dos genes alvos dos miRNA associados à patogênese do câncer cervical induzido pela infecção por HPV, rastreamos o miRNA quanto à forte capacidade de ligação com os oncogenes virais (*E6* e *E7*) e dois genes supressores humanos (*RBI* e *TP53*). Primeiro, rastreamos miRNAs com base na semelhança com as sequências *E6* e *E7* específicas para cada tipo de HPV usando a ferramenta *RNA Hybrid* (<https://bibiserv2.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid>). Usamos as sequências *E6* e *E7* disponíveis no banco de dados NCBI para HPV-16 (NC_001526.4), HPV-18 (GQ180792.1), HPV-33 (M12732.1), HPV-45 (KC470260.1), HPV- 52 (LC373207.1) e HPV-58 (KY225967.1). Em seguida, investigamos a interação entre os miRNAs selecionados e a sequência codificante (*CDS_p53*, U94788.1) e a região 3' não traduzida (3'UTR, KT585267.1) do gene supressor de tumor *TP53*, e o gene 3'UTR (NM_000321.3) do gene humano *RBI*. O limite mínimo da energia livre de Gibbs (ΔG ou mfe) para interação molecular entre miRNAs e RNAs mensageiros (mRNA) foi $\Delta G \leq -30$ Kcal/mol. Optamos por diminuir a energia mfe mais do que normalmente é aplicado no padrão do programa para maximizar o valor preditivo positivo de filtragem²⁰⁻²². As sequências de miRNAs semelhantes aos genes virais *E6* e *E7* que também tiveram ligações previstas para os genes supressores de tumor humano foram usadas em uma análise de predição dos genes alvo

de miRNA adicional, usando sequências de mRNA presentes no banco de dados miRWalk 2.0 e em 11 outros bancos de dados integrados a ferramenta de programa miRWalk 2.0 (<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/miRreys-self.html>). Os alvos previstos pelo próprio algoritmo miRWalk em pelo menos três bancos de dados foram submetidos às análises de anotação funcional usando o *Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery* (DAVID) v6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/>). O *Gene Ontology Biological Process* (GO-BP), as vias da Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto (KEGG) e os bancos de dados Biocarta foram usados para obter vias enriquecidas com valores de p corrigidos por Benjamini-Hochberg $<0,05$.

Validação da expressão de miRNA em tecido cervical

Para validação dos DE-miRNAs, selecionamos 50 amostras diferentes de uma coorte prospectiva de mulheres com vários graus de lesão cervical recrutadas no Centro Integrado de Saúde Amaury de Medeiros (CISAM) e no Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP) ambos localizados em Recife, Nordeste do Brasil. Todas as mulheres da coorte tinham pelo menos 18 anos e assinaram o termo de consentimento. O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz (CAAE: 51111115.9.0000.5190). Treze amostras foram classificadas como sem lesão cervical (três positivas para infecção por HPV) e 37 com diferentes graus de neoplasia intraepitelial cervical (NIC). Três das 12 amostras com CIN1, cinco das 15 com CIN2 e cinco das 10 com CIN3 foram positivas para o teste de HPV. Selecionamos miRNAs com base nas etapas de filtragem anteriores e nos resultados das predições do gene alvo e anotações funcionais. Para avaliar a expressão do miRNA, o *TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit* (Life Technologies, Foster City, Califórnia, EUA), o *TaqMan Advanced miRNA Assays* (referência: miR-191-5p; alvos: miR-150-3p, miR-204 -3p, miR-330-3p; Life Technologies) e o *TaqMan Fast Advanced Master Mix* (Life Technologies) foram usados de acordo com as instruções do fabricante. Além disso, ensaios de PCR de transcrição reversa (RT-PCR) e PCR quantitativo (Q-PCR) foram realizados em um termociclador *SimpliAmp* (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA) e um sistema *QuantStudio™ 5 Real-Time PCR* (Applied Biosystems), respectivamente, de acordo com as instruções do fabricante.

Análise estatística

A distribuição de normalidade da expressão do miRNA foi determinada usando os testes D'Agostino-Pearson omnibus, Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. Os testes qualitativos foram realizados usando o pacote *Epi Info* dos Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), especificamente o *Statcalc* para teste de tendência qui-quadrado e ferramentas de teste de tabela 2x2. O Mann-Whitney U foi usado para comparar dois grupos. O número de amostras pode ter diferido em diferentes experimentos devido à escassez de amostras cervicais. *GraphPad Prism* V.5.01 (GraphPad Software, Inc.) foi usado para realizar as análises, considerando um valor de p significativo $\leq 0,05$. Para a análise da expressão relativa do miRNA, os valores de ΔCt (limiar do ciclo) foram determinados com base na seguinte equação: $\Delta Ct = Ct \text{ (miRNA alvo)} - Ct \text{ (miRNA de referência)}$. Os valores de Ct foram as duplicatas médias com um desvio padrão (DP) $\leq 0,5$.

Resultados

O DEA identificou 230 DE-miRNAs em pacientes infectados pelo HPV em comparação com pacientes não infectados. O número de DE-miRNAs super e subexpressos variou em amostras infectadas por HPV-16 (52 e 132), HPV-18 (19 e 36), HPV-33 (11 e 23), HPV-45 (19 e 71), HPV-52 (20 e 1) e HPV-58 (8 e 19). Dezoito DE_miRNAs se ligaram fortemente às sequências *E6* ou *E7* do respectivo tipo de HPV detectado na amostra. Todos os 18 miRNAs, denominados miR-99a-3p, miR-150-3p, miR-185-3p, miR-204-3p, miR-675-5p, miR-3127-3p, miR-4449, miR-6842-3p, miR-6842-5p, miR-874-3p, miR-1976, miR-99b-3p, let-7a-2-3p, let-7i-3p, miR-221-3p, miR-330-3p, miR-431-3p e miR-431-5p foram testados quanto à capacidade de ligação às sequências dos genes *TP53* e *RBI*, dos quais os 8 primeiros miRNAs também apresentaram fortes interações com a sequência do gene de pelo menos um supressor de tumor com significância estatística (**Tabela 4**). O miR-150-3p foi o único miRNA que apresentou ΔG menor que -30 Kcal/mol para ambos os genes supressores tumorais *TP53* e *RBI* (**Tabelas complementares 1 e 2**).

Múltiplos miRNAs interagiram na sequência de codificação de *TP53* em regiões próximas (**Tabela 5**). A sequência *seed* de miR-150-3p e miR-204-3p se liga aos nucleotídeos nas posições 93 e 94 do CDS *TP53*, respectivamente. A região *seed* de miR-1976, miR-185-3p e miR-6842-3p se liga a nucleotídeos a jusante nas posições 1072, 1073 e 1079 do CDS *TP53*, respectivamente. As sequências iniciais do miR-4449 e miR-675-5p se ligam aos nucleotídeos nas posições 420 e 431 do CDS *TP53*, respectivamente.

Tabela 4 – Predição da interação entre miRNA, oncogenes de HPV e genes supressores de tumor humano. Os miRNAs expressos diferencialmente em células cervicais infectadas por HPV em comparação com as não infectadas foram testados quanto à afinidade de ligação aos genes virais E6 e E7 e aos genes humanos *TP53* e *RB1*, usando a energia livre de Gibbs (ΔG) de -30 Kcal/mol como o corte.

miRNAs	Regulação	Tipos DE_HPVs	Interação com mRNA ($\Delta G < -30$ Kcal/mol)				
			E6	E7	3'UTR <i>P53</i>	<i>P53</i> CDS	3'UTR <i>RB1</i>
hsa-miR-6842-3p	↑	16, 18 e 45	-31,1	-30,6	-31,6	-36,8	---
hsa-miR-4449	↓	16 e 18	-30,2	-30,2	-32	-36,6	---
<i>hsa-miR-6842-5p[#]</i>	↑	16, 18 e 45	-30,3	---	---	-31,9	---
hsa-miR-221-3p	↑	16	-30,3	-30,9	---	---	---
hsa-miR-431-3p	↓	16, 18 e 33	---	-31,7	---	---	---
hsa-miR-204-3p	↓	16, 18, 33 e 45	---	-31,2	---	-33,9	---
hsa-miR-431-5p	↓	16, 18 e 33	---	-32,2	---	-29,3	---
hsa-miR-99a-3p	↑	16	-30,6	---	---	-34,0	---
hsa-miR-99b-3p	↓	16	-32,6	---	---	---	---
hsa-miR-3127-3p	↓	16	---	-30,0	-31,2	---	---
hsa-let-7a-2-3p	↑	16 e 33	-30,4	---	---	---	---
hsa-miR-330-3p	↑	16, 18, 33, 45 e 58	-30,6	---	---	---	---
hsa-miR-185-3p	↑	52	---	-30,3	-30,4	-37,6	---
hsa-miR-675-5p	↓	16 e 58	---	-31,9	-31,7	-36,1	---
hsa-let-7i-3p	↑	16 e 45	-30,5	---	---	---	---
<i>hsa-miR-874-3p[#]</i>	↓	16, 18, 33, 45 e 58	-34,9	---	---	-32,6	---
<i>hsa-miR-1976[#]</i>	↑	16, 45 e 52	-30,0	---	---	-30,3	---
hsa-miR-150-3p	↑	16, 18, 33, 52 e 58	---	-31,0	-30,1	-34,4	-35,3

Legenda: DE_HPVs - tipos de HPV cujos respectivos miRNAs foram encontrados diferencialmente expressos, ΔG - energia livre de Gibbs, regulação relacionada ao grupo HPV+. *Todas as interações miRNA-mRNA apresentadas na tabela apresentaram valores de ΔG superiores a -20 Kcal/mol; o valor de ΔG considerado foi o menor calculado para os tipos de HPV; [#]os miRNAs destacados em itálico não apresentam significância estatística na interação miRNA-mRNA.

Tabela 5 – Características das interações DE_miRNA/mRNA. A energia livre de Gibbs (ΔG) estima a afinidade de ligação presumida. O primeiro nucleotídeo da interação miRNA-sequência alvo indica o sítio de ligação no gene alvo, na sequência codificante (CDS) e na região 3' não traduzida (3'UTR) dos genes supressores de tumor (*TP53* e *RBI*)

DE_miRNA	mRNA sequencia-alvo	ΔG	<i>P</i> -valor	Sítio de ligação (posição)
miR-150-3p	<i>RBI</i> 3'UTR	-35.3	0.03427	311
miR-150-3p	<i>TP53</i> 3'UTR	-30.1	0.04386	155
miR-150-3p	<i>TP53</i> CDS	-34.4	0.02534	93
miR-204-3p	<i>TP53</i> CDS	-33.9	0.01774	94
miR-185-3p	<i>TP53</i> CDS	-37.6	0.00512	1073
miR-1976	<i>TP53</i> CDS	-30.3	0.08232	1072
miR-6842-3p	<i>TP53</i> CDS	-36.8	0.00690	1079
miR-4449	<i>TP53</i> CDS	-36.6	0.01509	420
miR-675-5p	<i>TP53</i> CDS	-36.1	0.01694	431

Legenda: DE_miRNA - miRNA encontrado diferencialmente expresso, mRNA - RNA mensageiro, ΔG - energia livre de Gibbs.

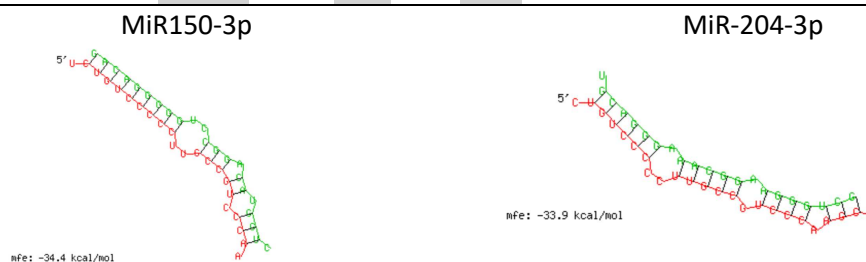
Nas análises estruturais do sítio de ligação da sequência miR-150-3p e miR-204-3p na CDS *TP53*, observamos um motivo (5'GTCCCCCTTGCCGUCCCA) em mRNAs alvo com três zonas quentes de ligação entre 94-98, 103-105, e posições 109-111 reconhecidas pelo miR-150-3p (-34,4kcal/mol) e pelo miR-204-3p (-33,9kcal/mol) apresentando afinidade semelhante (**Figura 18A**).

Comparando as estruturas previstas da interação miR-185-3p, miR-1976 e miR-6842-3p com sítios alvo entre os nucleotídeos 1072 a 1105 do CDS *TP53*, observamos alguns emparelhamentos G:U oscilantes em dois dos três pontos de ligação (**Figura 18B**). O miR-185-3p e o miR-1976 visam o motivo 5'ACGGGGGG entre as posições 1077-1082; o miR-1976 e o miR-6842-3p visam o motivo 5'GCAGGG entre as posições 1084-1089, com alguns emparelhamentos G:U em ambos os casos. A maior afinidade de ligação do miR-185-3p (-37,6 kcal/mol) e do miR-6842-3p (-36,8 kcal/mol) sobre o miR-1976 (-30,3 kcal/mol) pode estar associada à sua ligação a o motivo 5'CAGCC entre as posições 1097-1101 do CDS *TP53* sem emparelhamento oscilante, que cria um grande loop de mRNA e se curva em um ângulo estreito na estrutura mRNA-miRNA *TP53*. Os 18 dos 22 nucleotídeos do miR-4449 se ligam ao CDS *TP53*; porém os quatro nucleotídeos incompatíveis geram três loops distantes um do outro, formando uma estrutura de ligação linear. Ao contrário, a estrutura conformacional prevista para a ligação de miR-675-5p e *TP53* CDS é complexa, composta por dois grandes loops de

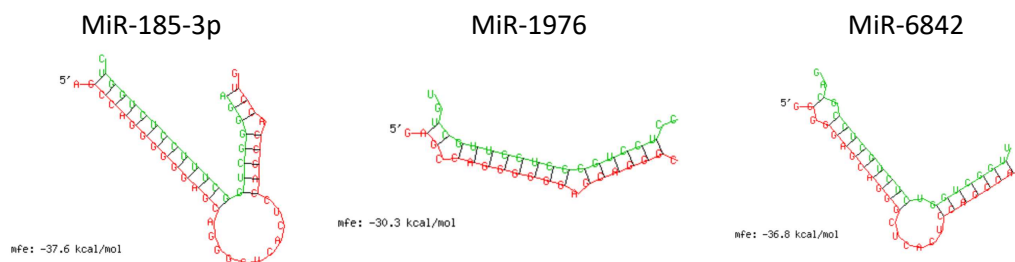
mRNA e duas estruturas lineares formadas por 8-9 nucleotídeos nas bordas da sequência de miRNA com um emparelhamento G:U oscilante cada (**Figura 18C**). Também analisamos a estrutura de ligação do miR-150-3p com a região reguladora 3' não traduzida dos genes supressores *TP53* e *RBI*. A estrutura prevista para a ligação do miR-150-3p e 3'UTR *TP53* tem dois loops formados por seis e 11 nucleotídeos adicionais na extremidade 5' e no meio da sequência *TP53*, e outro pequeno loop formado por um nucleotídeo incompatível no final da região 3'. Um par de bases oscilantes G:U foi observado na extremidade 5' e dois na extremidade 3' da estrutura prevista. Maior afinidade foi prevista para o miR-150-5p e a ligação 3' UTR *RBI*, cuja estrutura mostrou apenas dois loops formados por seis e três nucleotídeos adicionais nas extremidades 5' e 3' e um único par de bases oscilantes G:U na extremidade 3' da sequência *RBI* (**Figura 18D**).

Figura 18– Estrutura das interações entre miR-mRNA**A-** CDS *p53* (zonas de *hotspot* entre os nucleotídeos 94-98, 103-105 e 109-111)

CDS_p53	uCU GUCC C C C t t GC C GU c C C A a
---------	--------------------------------------

**B-** CDS *p53* (zonas de *hotspot* entre os nucleotídeos 1075-1082, 1084-1989, 1096-1101)

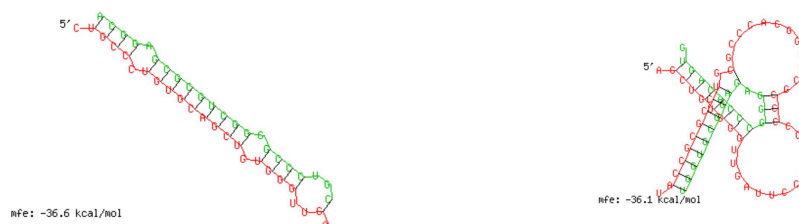
CDS_p53	GGA GC CA GG GGGG A GCAGGG CTCACT CC AG C C A CCT
---------	---

**C-** CDS *p53* (sítio de ligação comum entre os 431 e 439 nucleotídeos)

CUGCCCUGUGCAGCUGUGGGUUGAUUCCACACCCCCGCCCGGCACCCGCGUCCGCGCCAU
--

MIR-4449

MIR-675-5p

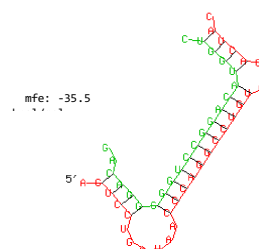
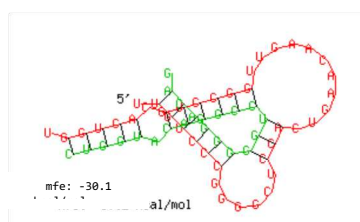
**D-** MIR150-3p (3'UTR *p53* vs *pRB*)

3'UTR_p53	GA C A GGGGG uc CGG a C A u GG U c
-----------	------------------------------------

3'UTR_pRB	a GUC C ugauaa C C CAGGC CUGU cug ACUA c
-----------	--

miR-150-3p/CDS_p53

miR-150-3p/3'UTR_pRB



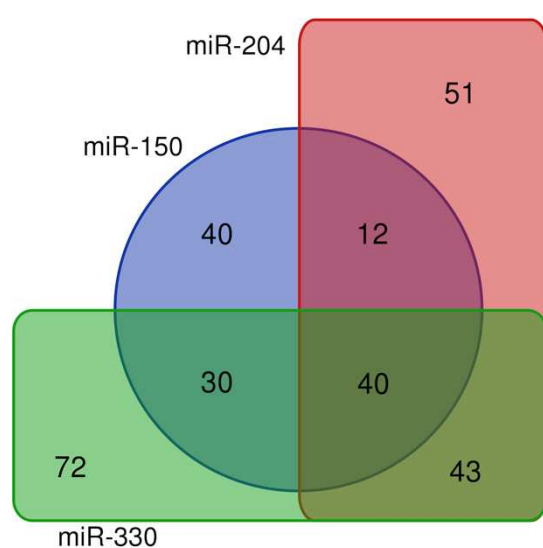
Legenda: para cada esquema de ligação, a sequência nucleotídica vermelha corresponde ao mRNA alvo e a sequência verde ao miRNA testado.

Predição do gene miRNA alvo e anotação funcional

Dos 18 DE-miRNAs, oito miRNAs (miR-150-3p, miR-204-3p, miR-330-3p, miR-1976, miR-431-3p, miR-431-5p, miR-6842-3p, e miR-6842-5p) mostraram expressão diferencial consistente em pelo menos três das seis amostras específicas do tipo de HPV em comparação com amostras não infectadas. Esses miRNAs atingem 29.045 genes alvo, dos quais 20.618 foram alvos para os miRNAs regulados positivamente e 8.427 foram alvos para os miRNAs regulados negativamente na infecção pelo HPV. Apenas três miRNAs foram avaliados para anotação funcional e análises de enriquecimento de vias biológicas. O critério para selecionar o miR-150-3p e o miR-330-3p foi a presença de uma expressão diferencial significativo na maioria das amostras específicas do tipo de HPV. O miR-204-3p foi selecionado pois mostrou um sítio de ligação previsto no motivo CDS *TP53* usado pelo miR-150-3p; enquanto o primeiro regulava negativamente seus genes-alvo, o último regulava positivamente os dele. A predição dos genes alvo mostrou que 4.048 genes foram direcionados pelo miR-150-3p e miR-330-3p regulados positivamente, enquanto 1.913 genes foram direcionados pelo miR-204-3p regulado negativamente e 1.218 genes por miRNAs regulados positiva e negativamente. O banco de dados da via KEGG revelou 70 vias significativamente enriquecidas para esses genes-alvo, 26 exclusivamente relacionadas a miRNAs superexpressos na infecção por HPV, três associadas a miRNAs subexpressos e 41 vias com genes afetados por miRNAs super e subexpressos na infecção por HPV. Vias enriquecidas nas quais os genes foram direcionados exclusivamente por miRNAs superexpressos incluíram sinalização de TGF-beta, fagocitose mediada por Fc gama R, citotoxicidade mediada por células assassinas naturais, sinalização de quimiocina e migração transendotelial de leucócitos, degradação de RNA, sinalização Notch, ciclo celular, e sinalização p53 (**Figura 19**). As vias que englobavam genes regulados exclusivamente por miRNAs subexpressos durante a infecção pelo HPV foram a via do carcinoma basocelular, biossíntese de N-glicanos e lisossomo. Genes relacionados às vias de sinalização de receptores de células T e B, moléculas de adesão celular, junções GAP, endocitose, apoptose e as vias de sinalização para moléculas Hedgehog, Erb6, GnRH, insulina, VEGF, MAPk, Wnt, cálcio e mTOR foram alvos de miRNAs supra e subregulados na infecção por HPV. As vias enriquecidas estatisticamente mais significativas relacionadas aos três miRNAs foram avaliadas usando o nível direto GO-BP e o banco de dados KEEG (**Tabelas 6 e 7**). Posteriormente, identificamos os genes-alvo mais relevantes na via KEEG hsa05200 (*Pathways in cancer*), para identificar os genes envolvidos nos processos de desenvolvimento do câncer cervical e sua modulação em genes relacionados à apoptose, parada do ciclo celular, sistema imunológico, tumorigênese, metástase e mecanismos de escape viral à imunidade entre outros (**Figura 3**). Em seguida, mapeamos esses genes-chave com processos enriquecidos em nível direto de GO-BP

(Figura 20 A-F) e fomos capazes de avaliar como cada miRNA expresso diferencialmente encontrado em nosso estudo poderia impactar e desregular esses processos biológicos, levando ao desenvolvimento de câncer.

Figura 19 – Principais genes alvo relacionados a via do câncer enriquecidos pela base de dados de vias KEGG para miR-150-3p, miR-204-3p e miR-330-3p, classificados por interação e modulação dirigidas por miRNA



Principais genes superexpressos (↑): *JAK1, ELK1, AKT2, PIK3CD, RB1, NRAS, RALGDS, MAPK8, CAMK2D, KEAP1, E2F2, MTOR, RASGRP4, STAT2, TCF7L1, RARA, HHIP, BAK1, MAX, JAK3, WNT5A, WNT4, CUL2(MHCI), IL12RB2, WNT9A, FRAT2, FLT3, WNT4, DAPK2, FOS, IL15RA, ARAF, LPAR5, BDKRB2, TRAF3, WNT7B, WNT3, FLT4, PMAIP1, TRAF1, PIM2, FZD8, EGLN2, FGF23, IL5RA, CEBPA, FN1, GADD45B, HSP90AA1, BIRC3, RXRB*

Principais genes subexpressos (↓): *IL7R, ADCY7, CDK6, LRP6, CREBBP, RPS6KA5, STAT3, XIAP, RASGRP1, IFNAR1, MAP2K1, SKP1, BCR, KITLG, SMAD4, STK4, IL6ST, FOXO1, STAT1, TGFA, RUNX1, CDK2, PIK3R3, MECOM, FAS, ROCK1, MMP2, CKS1B, COL4A1, NCOA3, RAC1, FZD7, KIF7, RAF1, EGF, GADD45G, CRK, TCF7L2, FGFR2, GNAI2, PRKCB, PIK3R1, CHUK, PRKACA, IL13RA1, CALML4, CTNNB1, AXIN2, CDC42,*

NKX3-1, WNT2, FADD, CDKN1B, PDGFA, RALA, SKP2, TRAF4, VEGFA, GNG10, SOS2, GSTM4, GLI3, PTCH1, WNT11, FZD10, BIRC2, FRAT1, TXNRD1, MAPK10, CRKL, RALB, RALBP1, JAG1, RASGRP3, HIF1A, DLL1, CCND3, COL4A3, ADCY6, CAMK2G, STAT5A, VHL, RPS6KB1, MMP9

Tabela 6 – Processos biológicos em nível direto do *Gene Ontology* regulados por miRNA mais relevantes estatisticamente

Processos biológicos em nível direto	miR-150-3p (↑)		miR-204-3p (↓)		miR-330-3p (↑)	
	Taxa enriquecida	p-valor	Taxa enriquecida	p-valor	Taxa enriquecida	p-valor
GO:0006468~ <i>protein phosphorylation</i>	1,62	5,96E-04	1,54	1,26E-04	1,55	7,70E-07
GO:0000122~ <i>negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter</i>	1,51	1,13E-05	1,41	9,10E-06	1,49	1,84E-11
GO:0006357~ <i>regulation of transcription from RNA polymerase II promoter</i>	1,32	2,27E-04	1,34	8,51E-08	1,33	7,19E-10
GO:0007399~ <i>nervous system development</i>	1,79	2,95E-05	1,51	4,28E-03	1,53	5,46E-05
GO:0035556~ <i>intracellular signal transduction</i>	1,90	1,23E-07	1,47	7,46E-03	1,57	1,40E-06
GO:0045893~ <i>positive regulation of transcription, DNA-templated</i>	1,78	5,41E-10	1,36	8,87E-03	1,73	6,45E-19
GO:0045944~ <i>positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter</i>	1,67	1,75E-13	1,38	4,39E-06	1,48	1,45E-14
GO:0007165~ <i>signal transduction</i>	1,37	6,87E-04	1,27	7,28E-03	---	---
GO:0046777~ <i>protein autophosphorylation</i>	2,11	5,96E-04	---	---	---	---
GO:0048511~ <i>rhythmic process</i>	2,79	7,75E-04	---	---	---	---
GO:0007565~ <i>female pregnancy</i>	---	---	2,02	2,70E-02	---	---
GO:0006355~ <i>regulation of transcription, DNA-templated</i>	---	---	1,31	5,32E-03	---	---
GO:0000209~ <i>protein polyubiquitination</i>	---	---	---	---	1,84	7,60E-05
GO:0006511~ <i>ubiquitin-dependent protein catabolic process</i>	---	---	---	---	1,67	2,78E-05
GO:0045892~ <i>negative regulation of transcription, DNA-templated</i>	---	---	--	---	1,51	7,70E-07

Legenda: Taxa enriquecida - Indica o número de genes que estão super-representados em uma determinada lista

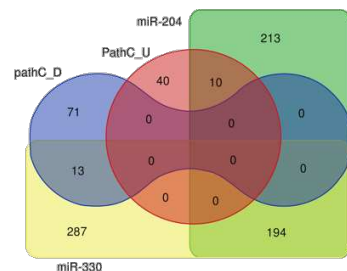
Tabela 7 – Vias do Kegg reguladas por miRNA estatisticamente mais relevantes

Vias Kegg	miR-150-3p (↑)		miR-204-3p (↓)		miR-330-3p (↑)	
	Taxa Enr.	P-valor	Taxa Enr.	P-valor	Taxa Enr.	P-valor
hsa05200: <i>Pathways in cancer</i>	1,62	8,62E-06	1,42	3,28E-04	1,47	4,55E-07
hsa05210: <i>Colorectal cancer</i>	2,37	5,51E-04	2,11	6,93E-04	---	---
hsa04360: <i>Axon guidance</i>	---	---	1,65	2,72E-03	1,87	3,54E-07
hsa05212: <i>Pancreatic cancer</i>	2,41	9,10E-04	---	---	---	---
hsa04072: <i>Phospholipase D signalling pathway</i>	1,95	9,10E-04	---	---	---	---
hsa04152: <i>AMPK signalling pathway</i>	2,11	6,44E-04	---	---	---	---
hsa05161: <i>Hepatitis B</i>	1,95	5,51E-04	---	---	---	---
hsa04218: <i>Cellular senescence</i>	1,98	5,51E-04	---	---	---	---
hsa04520: <i>Adherens junction</i>	2,67	1,69E-04	---	---	---	---
hsa04068: <i>FoxO signalling pathway</i>	2,25	4,22E-05	---	---	---	---
hsa05215: <i>Prostate cancer</i>	2,54	3,17E-05	---	---	---	---
hsa05225: <i>Hepatocellular carcinoma</i>	---	---	1,66	2,72E-03	---	---
hsa05213: <i>Endometrial cancer</i>	---	---	2,23	2,72E-03	---	---
hsa04550: <i>Signalling pathways regulating pluripotency of stem cells</i>	---	---	1,74	2,72E-03	---	---
hsa04934: <i>Cushing syndrome</i>	---	---	1,74	2,02E-03	---	---
hsa05224: <i>Breast cancer</i>	---	---	1,83	5,76E-04	---	---
hsa05205: <i>Proteoglycans in cancer</i>	---	---	1,72	3,28E-04	---	---
hsa05226: <i>Gastric cancer</i>	---	---	1,98	4,07E-05	---	---
hsa05220: <i>Chronic myeloid leukemia</i>	---	---	---	---	2,11	5,44E-05
hsa04010: <i>MAPK signalling pathway</i>	---	---	---	---	1,52	5,44E-05
hsa05163: <i>Human cytomegalovirus infection</i>	---	---	---	---	1,63	2,98E-05
hsa04371: <i>Apelin signalling pathway</i>	---	---	---	---	1,82	2,98E-05
hsa04310: <i>Wnt signalling pathway</i>	---	---	---	---	1,73	2,98E-05
hsa04722: <i>Neurotrophin signalling pathway</i>	---	---	---	---	1,91	2,84E-05
hsa04012: <i>ErbB signalling pathway</i>	---	---	---	---	2,13	1,76E-05
hsa04211: <i>Longevity regulating pathway</i>	---	---	---	---	2,13	1,18E-05

Legenda: Taxa enr. - Indica o número de genes que estão super-representados em uma determinada lista.

Figura 20 – Mapeamento cruzado para os miR-204-3p e miR-330-3p dos genes destacados na via de câncer (KEEG) e seus processos biológicos (GO)

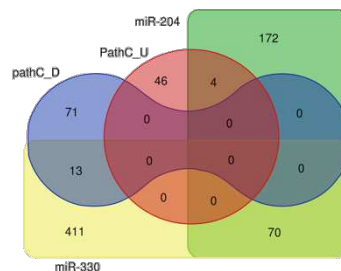
(A) Regulation of transcription from RNA polymerase II promoter



(↑): *TCF7L1, MAX, ELK1, FOS, CAMK2D, RB1, CEBPA, E2F2, STAT2, RXRB*

(↓): *PRKCB, NKX3-1, HIF1A, RUNX1, STAT5A, MECOM, CRK, TCF7L2, STAT3, SMAD4, VEGFA, GLI3, FOXO1*

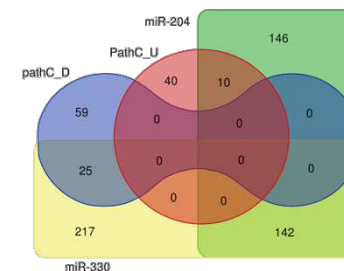
(B) Negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter



(↑): *RARA, MAX, RB1, CEBPA*

(↓): *PRKCB, NKX3-1, HIF1A, RUNX1, STAT5A, MECOM, CRK, TCF7L2, STAT3, SMAD4, VEGFA, GLI3, FOXO1*

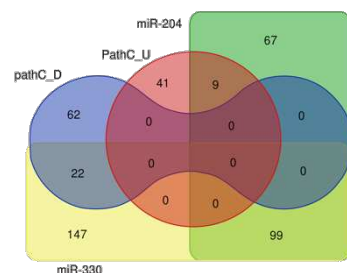
(C) Positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter



(↑): *RARA, MAX, ELK1, FOS, RB1, CEBPA, E2F2, STAT2, WNT5A, RXRB*

(↓): *LRP6, RPS6KA5, NKX3-1, WNT2, FADD, JAG1, HIF1A, DLL1, RUNX1, STAT5A, MECOM, NCOA3, RAF1, CREBBP, TCF7L2, FGFR2, PIK3R1, CHUK, STAT3, CTNBN1, SMAD4, VEGFA, GLI3, FOXO1, STAT1*

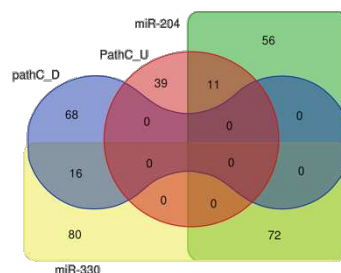
(D) Positive regulation of transcription, DNA-templated



(↑): *RARA, MAX, ELK1, WNT5A, WNT4, FOS, PIM2, FGF23, RXRB*

(↓): *FZD7, HIF1A, PRKCB, CHUK, STAT3, CTNBN1, EGF, LRP6, MAP2K1, NKX3-1, SMAD4, GLI3, PTCH1, VHL, WNT11, BIRC2, FOXO1, STAT1, RUNX1, CDK2, MECOM, CREBBP*

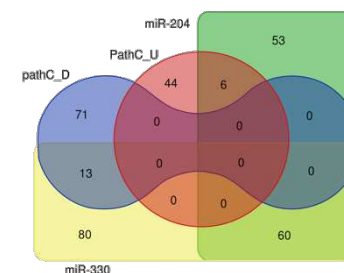
(E) Protein phosphorylation



(↑): *MTOR, RARA, JAK3, JAK1, WNT5A, DAPK2, ARAF, PIK3CD, MAPK8, CAMK2D, PIM2*

(↓): *OCK1, CDK6, RAF1, RPS6KA5, PRKCB, PIK3R1, CHUK, PRKACA, MAP2K1, CDC42, BCR, WNT11, STK4, MAPK10, CAMK2G, CDK2*

(F) Intracellular signal transduction



(↑): *AK3, JAK1, AKT2, DAPK2, ARAF, MAPK8*

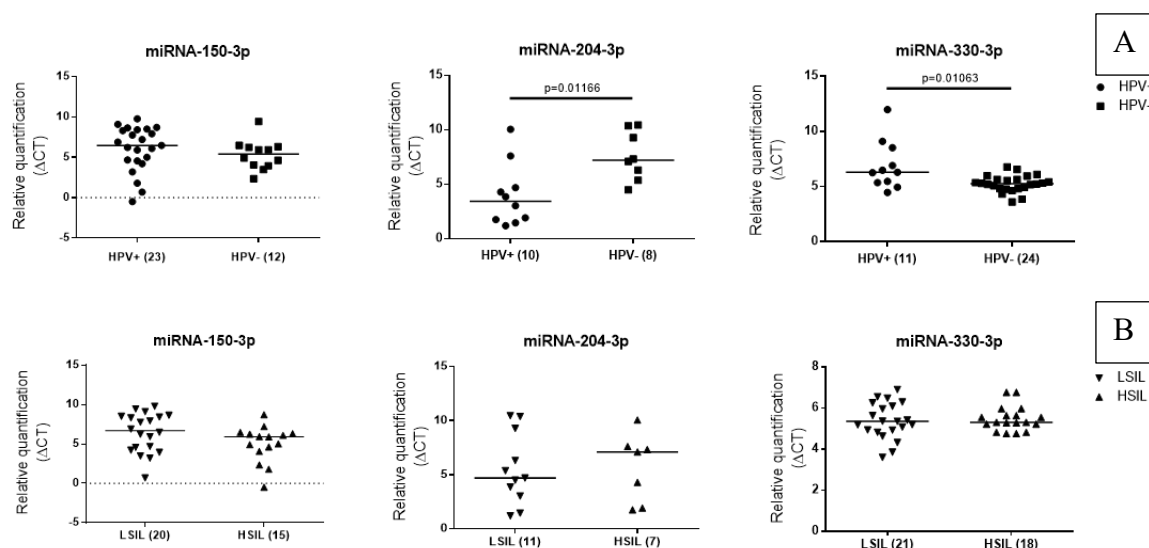
(↓): *ROCK1, RAC1, ADCY7, RAF1, RPS6KA5, PRKCB, BCR, SMAD4, STK4, MAPK10, CRKL, ADCY6, TGFA*

Legenda: pathC_D – vias em genes regulados negativamente pelo câncer, pathC_U – vias em genes regulados positivamente pelo câncer.

Validação funcional de miRNA em tecido cervical pré-canceroso

Para o experimento de validação, selecionamos o miR-150-3p, miR-204-3p e miR-330-3p com base em sua capacidade de ligação a sequências codificadoras das oncoproteínas de HPV E6 e E7 e dos genes supressores de tumor humano *TP53* e *RB1*. Observamos que menos mulheres infectadas pelo HPV expressaram miR-150-3p (50%) e miR-330-3p (40%) em comparação com mulheres não infectadas (90% e 95%, respectivamente). Em contraste, 35% das mulheres infectadas pelo HPV e 28% das mulheres não infectadas expressaram níveis detectáveis do miR-204-3p. Além disso, a expressão do miR-330-3p por mulheres infectadas pelo HPV foi significativamente menor (alto delta CT) em comparação com mulheres não infectadas ($P = 0,010$) (**Figura 21a**). Além disso, uma associação entre altos níveis de miR-204-3p (baixo delta CT) com infecção por HPV ($P = 0,011$). No entanto, nenhum miRNA testado previu lesões cervicais pré-cancerosas graves (HSIL - lesão intraepitelial de alto grau) (**Figura 21b**).

Figura 21– Níveis de expressão de miRNAs por infecção por HPV e status de lesão intraepitelial escamosa (SIL), respectivamente, quantificação relativa para hsa-miR-150-3p, hsa-miR-204-3p e hsa-miR-330-3p



Legenda: p - Valor de P, ΔCT – quantificação relativa de miRNA, HPV+ - pacientes infectados por HPV, HPV- - pacientes não infectados. LSIL - lesão intraepitelial escamosa de baixo grau, HSIL - lesão intraepitelial escamosa de alto grau.

Discussão

Neste estudo, relatamos que oito miRNAs foram expressos exclusivamente em células de câncer cervical infectadas por HPV de alto risco, apresentaram similaridade de sequência com os transcritos virais dos genes *E6* e *E7* e uma forte afinidade de ligação aos mRNAs dos supressores tumorais *TP53* e *RBI* humanos. Os miRNAs superexpressos miR-185-3p e miR-99a-3p foram previamente associados à progressão intraepitelial e ao desenvolvimento de câncer^{23–26}.

Selecionamos o miR-150-3p, o miR-204-3p e o miR-330-3p para estudo pois, estes foram diferencialmente expressos em células cervicais de mulheres infectadas pela maioria dos tipos de HPV de alto risco testados. Além disso, o miR-150-3p foi relatado como associado ao carcinoma de nasofaringe²⁷, ao câncer de mama^{28,29}, ao câncer de ovário³⁰, ao carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço³¹ e ao câncer de bexiga³²; o miR-204-3p com melanoma³³ e com glioma³⁴, e o efeito pró-tumorigênese de miR-330-3p em vários tipos de câncer, incluindo câncer cervical³⁵. Apesar de ser amplamente relatado no desenvolvimento do câncer, esses três miRNAs expressos diferencialmente não foram previamente correlacionados com a infecção por HPV em humanos, o miR-150-3p foi o único já correlacionado com a infecção por HPV, no entanto, em um modelo murino onde esse miRNA foi superexpresso em lesões induzidas por HPV e teve sua expressão aumentada associada à progressão da lesão³⁶. Assim, nosso estudo é o primeiro a relacionar a desregulação desses três miRNAs com a infecção pelo HPV em humanos.

A análise de bioinformática sugeriu que a superexpressão de miR-150-3p e miR-330-3p e a subexpressão de miR-204-3p foram associadas ao desenvolvimento de câncer cervical secundário à infecção por HPV. Mostramos que baixos níveis de miR-330-3p e altos níveis de miR-204-3p foram associados à infecção por HPV em lesões pré-cancerosas cervicais, mas não à gravidade da lesão, sugerindo que a mudança no padrão de expressão desses miRNAs pode desencadear a tumorigênese³⁶.

Nossos resultados indicam que é possível que uma pequena molécula de RNA não codificante do HPV gerada por seus processos de síntese de oncoproteínas possa causar um desequilíbrio no microambiente com uma diferenciação de assinatura de miRNA que aumenta a produção de miR-150-3p, miR-204-3p, e miR-330-3p como detectado em nosso estudo. Corroborando com isso, estudos têm demonstrado que vírus persistentes são capazes de otimizar a expressão gênica a seu favor, utilizando miRNAs do hospedeiro ou de origem viral³⁷.

Esses miRNAs virais podem funcionar como chaves para a integração e ativação do vírus latente; agindo como ortólogos dos miRNAs celulares, por não demonstram imunogenicidade, estas moléculas facilitam a fuga do sistema imunológico e a persistência viral^{17,38}.

Realizamos a avaliação de regiões *seed* de miRNAs em suas interações lineares e conformacionais, para esclarecer a força de ligação a posições fisicamente próximas nos genes mediados por diferentes miRNAs; e as diferenças nos valores da força de ligação Gibbs (mfe) do miR-150-3p à região 3' não traduzida (UTR) dos genes codificados pelas proteínas pRb e p53. Como os resultados mostraram, o motivo GGGGGxxxGG, compartilhado por miR-150-3p e miR-204-3p, foi importante para estabilizar a interação entre o miR e seus genes-alvo (**Figura 18**). Assim, supomos que uma alteração neste motivo de ligação nucleotídica desestabilizou a ligação entre miR-204-3p com o 3'UTR dos genes supressores de tumor *RBI* e *TP53*, pois a quantidade de energia necessária para estabelecer a interação entre miR-204-3p e estes RNAs mensageiros foi sempre maior, -29,6 e -27,3 Kcal/mol respectivamente (tabela complementar 1), quando comparada com a energia demandada pelo motivo de ligação do miR-150-3p e a interação com as mesmas moléculas. Esses achados corroboram o recente relato de Pulati et al., o qual demonstrou que uma simples mudança de nucleotídeo no mRNA do *THSB4* poderia inibir a função do miR-5701 como supressor do mRNA³⁹. Em outro estudo, a expressão de miR-25, miR-96 e miR-106 induzida pela perda de peso em obesos correlacionou-se com variantes genéticas de genes de loci de suscetibilidade à obesidade conhecidos⁴⁰.

Além disso, o par de bases G:U oscilante (G:U) é essencial para a estrutura secundária do RNA e desempenha um papel importante na estabilização energética do complexo mRNA-miRNA⁴¹. Assim, a maioria dos pares G:U são altamente conservados e sua substituição por outros pares de bases geralmente demonstra um efeito prejudicial na função do RNA⁴². Os pares G:U exibem propriedades estruturais, químicas e termodinâmicas distintas. Essas habilidades, como a geometria que os pares de G:U fornecem com grupos químicos únicos nos sulcos principais e secundários do RNA, proveem a eles papéis distintos em alguns processos biológicos. Assim, os pares G:U podem especificar sinais de reconhecimento na autorregulação da síntese de proteínas. Além disso, essa estrutura de ligação está associada à catálise do RNA⁴²⁻⁴⁴. A capacidade do miRNA de reprimir a tradução de um alvo de mRNA é controlada pela quantidade de energia livre de sua sequência de ligação⁴⁵. Portanto, é reconhecido que o par G:U é capaz de interferir na interação miRNA-mRNA além do previsto pela estabilidade termodinâmica^{45,46}. Apesar de sua contribuição termodinamicamente favorável em duplexes de RNA, alguns pares G:U em regiões *seed* de ligação mostraram ser altamente prejudiciais para funções de repressão de miRNAs⁴⁵.

Uma limitação de nosso estudo foi o número de amostras cervicais utilizadas para validação da expressão diferencial de miRNA revelada pela análise bioinformática. A divergência observada entre estudos *in silico* e funcionais pode ser explicada porque trabalhamos com amostras histologicamente pré-cancerosas. Albuquerque e colaboradores (2019) relataram resultados semelhantes em lesões intraepiteliais escamosas anais, onde apesar de testar um número maior de amostras (105 biópsias), o miR-150-3p não foi estatisticamente significativo⁴⁷.

Assim, a alteração na expressão do miR-150-3p pode ocorrer em estágio avançado de cancerização. As análises de enriquecimento da via revelaram 10 vias direcionadas exclusivamente pelo miR-150-3p. A subexpressão da via *hsa04115:p53 signalling* corrobora inúmeros estudos sobre o miR-150-3p promovendo crescimento celular, sobrevivência e metástase^{48,49}. As vias *hsa04630: Jak-STAT signalling* e *hsa04650: Natural killer cell-mediated cytotoxicity* foram associadas à regulação do sistema imunológico nos estágios iniciais da infecção⁵⁰. Estudos demonstraram que as células Natural Killer (NK) têm receptores relacionados à função regulados negativamente após a infecção por HPV⁵¹, além disso, sabe-se que a transcrição viral regula a expressão de citocinas, e algumas proteínas do HPV podem regular negativamente as vias de transdução relacionadas ao sistema imunológico⁵² e controlar a diferenciação de células B e T⁵³. O miR-150-3p pode ser uma das moléculas-chave no mecanismo que desencadeia essas mudanças na resposta imune. Nesse caso, a redução do número de mulheres infectadas expressando miR-150-3p poderia ser um mecanismo de proteção contra a malignização.

Mostramos que o miR-204-3p foi regulado positivamente na lesão cervical pré-cancerosa na presença de HPV. No entanto, foi relatado que o miR-204-3p estava 2,7 vezes diminuído no carcinoma cervical em comparação com os tecidos normais⁵⁴, e a regulação negativa nos tecidos do câncer cervical foi associada à proliferação celular e à repressão da apoptose ao direcionar o gene *ATF2*⁵⁵. O MiR-204-3p teve como alvo exclusivo as vias *hsa04142: lysosome*, *hsa00510: N-glycan biosynthesis*, e *hsa05217: basal cell carcinoma*. Classificado como um miRNA supressor de tumor, a subexpressão do miR-204-3p tem sido relatada como um mau prognóstico para vários tipos de câncer, incluindo o câncer cervical^{47,56}.

Ainda, o miR-330-3p foi relatado superexpresso em várias células cancerígenas⁵⁷. O miR-330-3p tem como alvo o supressor tumoral *SH3GL2* em células-tronco de glioblastoma⁵⁸, e o gene *NMT* que codifica uma proteína envolvida em vias de processos de desenvolvimento celular que, quando desreguladas, levam ao câncer e disfunções imunológicas⁵⁹. Três das nove vias exclusivas alvo do miR-330-3p estavam relacionadas ao sistema imunológico, a *hsa04062:*

Chemokine signalling pathway, a *hsa04670: Leukocyte trans-endothelial migration*, e a *hsa04666: Fc gamma R-mediated phagocytosis* prevista para causar supressão através do gene *PFKFB3*⁵². As vias *hsa04110: Cell cycle* e *hsa04330: Notch signalling* afetam o crescimento celular, a proliferação e o desenvolvimento do câncer. Além disso, a via do Notch poderia estimular a diferenciação das células infectadas e desencadear a indiferenciação das células adjacentes, facilitando assim a persistência da infecção ao promover a reinfecção pelo HPV das células adjacentes após a liberação do vírus recém-montado^{60,61}. Entre as vias duplamente suprimidas, aquelas afetadas pelos miR-150-3p e miR-330-3p foram a *hsa04510: Focal adhesion* e a *hsa04520: adherent junction* anteriormente correlacionadas com metástase e gravidade do câncer⁶². Os três miRNAs expressos diferencialmente tiveram como alvo as vias *hsa05200: pathways in cancer*, *hsa04210: apoptosis*, e *hsa04150: mTOR signalling pathway*. Assim, uma vez que os miRNAs afetam essas vias regulando positivamente e regulando negativamente, a extração de informações confiáveis em estudos baseados em mineração de dados sem validação pode ser comprometida.

Concluimos que em lesões pré-cancerosas do colo do útero, o HPV foi associado à expressão negativa do miR-330-3p e a expressão positiva do miR-204-3p, que, de acordo com a função relatada desse miRNA, este seria um mecanismo de defesa imune contra infecção viral. O miR-150-3p pode ser uma das moléculas-chave no mecanismo que desencadeia alterações na resposta imune em favor da fuga do vírus do sistema imunológico e no processo de malignidade do câncer cervical. Diante disso, estudos experimentais com foco nos mecanismos dessas vias fazem-se necessários para permitir mais conclusões; no entanto, essas questões podem ser abordadas em investigações futuras de nosso grupo.

Contribuições dos autores

Conceituação: Oliveira, S.A.V.; Lucena-Silva, N.

Investigação e Metodologia: Oliveira, S.A.V.; Araújo, F.S; Almeida, R. S.; Lucena-Silva, N.; Medeiros, F. S.

Validação: Oliveira, S.A.V.; Almeida, R. S.

Análise Formal: Oliveira, S.A.V.; Araújo, F.S; Almeida, R. S.; Lorena, V.M.B; Lucena-Silva, N.

Preparação do manuscrito: Oliveira, S.A.V.; Lorena, V.M.B; Lucena-Silva, N.; Donadi, E. A.

Orientação: Almeida, R. S.; Lorena, V.M.B; Lucena-Silva, N.

Aquisição de Financiamento: Lucena-Silva, N.; Donadi, E. A.

Administração do Projeto: Lucena-Silva, N.; Donadi, E. A.

Reconhecimento

Os autores agradecem o apoio financeiro das agências brasileiras: Fundação de Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE, APQ-PROEP1680-4.01/15), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, nº 310364/ 2015-9; nº 310892/2019-8), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES 88882.379521/2019-01 e CAPES PROCAD nº 88881-068436/2014-09 Código Financeiro 001), Ministério da Saúde Secretaria de Ciência e Tecnologia Financiamento de Estudos e Projetos (MS-DECIT-FINEP nº 1299/13), e o Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Instrumentos para a Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (PDTIS-FIOCRUZ).

Divulgação de conflito de interesses: Os autores declaram não haver interesses financeiros concorrentes.

Referências

- 1 Lorenzi Adriana T, Syrjänen Kari J, Longatto-Filho Adhemar. Human papillomavirus (HPV) screening and cervical cancer burden. A Brazilian perspective. *Virol J* 2015;**12**(1):112. Doi: 10.1186/s12985-015-0342-0.
- 2 zur Hausen Harald. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002;**2**(5):342–50. Doi: 10.1038/nrc798.
- 3 Klingelhutz, A. J., Roman A. Cellular transformation by human papillomaviruses: Lessons learned by comparing high- and low-risk viruses. *Virology* 2012;**76**(October 2009):211–20. Doi: 10.1016/j.virol.2011.12.018.
- 4 O’Connell Ryan M., Rao Dinesh S., Chaudhuri Aadel A., Baltimore David. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2010;**10**(2):111–22. Doi: 10.1038/nri2708.
- 5 Sharma Shweta, Hussain Showket, Soni Kartik, Singhal Pallavi, Tripathi Richa, Ramachandran V. G., et al. Novel MicroRNA signatures in HPV-mediated cervical carcinogenesis in Indian women. *Tumor Biology* 2016;**37**(4):4585–95. Doi: 10.1007/s13277-015-4248-7.
- 6 Shen Hui, Zeng Bijun, Wang Chang, Tang Xueyong, Wang Haizhen, Liu Wen, et al. MiR-330 inhibits IL-22-induced keratinocyte proliferation through targeting CTNNB1. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 2017; **91**:803–11. Doi: 10.1016/j.biopha.2017.05.005.
- 7 Calin, Dumitru C. D., Shimizu M., Bichi R., Zupo S., Noch E., et al. Nonlinear partial differential equations and applications: Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2002;**99**(24):15524–9. Doi: 10.1073/pnas.242606799.
- 8 Lin Shuibin, Gregory Richard I. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature Review Cancer* 2015;**15**(6):321–33. Doi: 10.1038/nrc3932.
- 9 Banno Kouji, Iida Miho, Yanokura Megumi, Kisu Iori, Iwata Takashi, Tominaga Eiichiro, et al. MicroRNA in Cervical Cancer: OncomiRs and Tumor Suppressor miRs in Diagnosis and Treatment. *The Scientific World Journal* 2014; **2014**:1–8. Doi: 10.1155/2014/178075.
- 10 Wang Qingying, Qin Jinlong, Chen Aozhen, Zhou Jianhong, Liu Jie, Cheng Jiajing, et al. Downregulation of microRNA-145 is associated with aggressive progression and poor prognosis in human cervical cancer. *Tumor Biology* 2015;**36**(5):3703–8. Doi: 10.1007/s13277-014-3009-3.

- 11 Ben Wei, Yang Yang, Yuan Jing, Sun Jingxia, Huang Mingli, Zhang Dandan, et al. Human papillomavirus 16 E6 modulates the expression of host microRNAs in cervical cancer. *Taiwan J Obstet Gynecol* 2015;**54**(4):364–70. Doi: 10.1016/j.tjog.2014.06.007.
- 12 Skalsky Rebecca L., Cullen Bryan R. Viruses, microRNAs, and Host Interactions. *Annu Rev Microbiol* 2010;**64**(1):123–41. Doi: 10.1146/annurev.micro.112408.134243.
- 13 Plaisance-Bonstaff Karlie, Renne Rolf. Viral miRNAs. 2011. pp. 43–66.
- 14 Mishra Richa, Kumar Ashish, Ingle Harshad, Kumar Himanshu. The Interplay Between Viral-Derived miRNAs and Host Immunity During Infection. *Front Immunol* 2020;**10**. Doi: 10.3389/fimmu.2019.03079.
- 15 Qian Kui, Pietilä Tuuli, Rönty Mikko, Michon Frederic, Frilander Mikko J., Ritari Jarmo, et al. Identification and Validation of Human Papillomavirus Encoded microRNAs. *PLoS One* 2013;**8**(7):e70202. Doi: 10.1371/journal.pone.0070202.
- 16 Gu Wenyi, An Jiyuan, Ye Ping, Zhao Kong-Nan, Antonsson Annika. Prediction of conserved microRNAs from skin and mucosal human papillomaviruses. *Arch Virol* 2011;**156**(7):1161–71. Doi: 10.1007/s00705-011-0974-3.
- 17 Gallo Alessia, Miceli Vitale, Bulati Matteo, Iannolo Gioacchin, Contino Flavia, Conaldi Pier Giulio. Viral miRNAs as Active Players and Participants in Tumorigenesis. *Cancers (Basel)* 2020;**12**(2):358. Doi: 10.3390/cancers12020358.
- 18 Colaprico Antonio, Silva Tiago C., Olsen Catharina, Garofano Luciano, Cava Claudia, Garolini Davide, et al. TCGAbiolinks: An R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data. *Nucleic Acids Res* 2016. Doi: 10.1093/nar/gkv1507.
- 19 Burk Robert D., Chen Zigui, Saller Charles, Tarvin Katherine, Carvalho Andre L., Scapulatempo-Neto Cristovam, et al. Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer. *Nature* 2017;**228**. Doi: 10.1038/nature21386.
- 20 Zuker Michael, Stiegler Patrick. Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. *Nucleic Acids Res* 1981;**9**(1):133–48. Doi: 10.1093/nar/9.1.133.
- 21 Kruger J., Rehmsmeier M. RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible. *Nucleic Acids Res* 2006;**34**(Web Server):W451–4. Doi: 10.1093/nar/gkl243.
- 22 Golyshev V. M., Pyshnyi D. V., Lomzov A. A. Calculation of Energy for RNA/RNA and DNA/RNA Duplex Formation by Molecular Dynamics Simulation. *Mol Biol* 2021;**55**(6):927–40. Doi: 10.1134/S002689332105006X.

- 23 Pereira Patrícia M., Marques João Paulo, Soares Ana R., Carreto Laura, Santos Manuel A.S. MicroRNA expression variability in human cervical tissues. *PLoS One* 2010. Doi: 10.1371/journal.pone.0011780.
- 24 Li Yang, Wang Fenfen, Xu Junfen, Ye Feng, Shen Yuanming, Zhou Jiansong, et al. Progressive miRNA expression profiles in cervical carcinogenesis and identification of HPV-related target genes for miR-29. *J Pathol* 2011;**224**(4):484–95. Doi: 10.1002/path.2873.
- 25 Wilting S. M., Snijders P J F, Verlaet W., Jaspers A., van de Wiel M A, van Wieringen W N, et al. Altered microRNA expression associated with chromosomal changes contributes to cervical carcinogenesis. *Oncogene* 2013;**32**(1):106–16. Doi: 10.1038/onc.2012.20.
- 26 Pardini Barbara, De Maria Daniela, Francavilla Antonio, Di Gaetano Cornelia, Ronco Guglielmo, Naccarati Alessio. MicroRNAs as markers of progression in cervical cancer: a systematic review. *BMC Cancer* 2018;**18**(1):696. Doi: 10.1186/s12885-018-4590-4.
- 27 Yue Patrick Ying Kit, Ha Wai Yan, Lau Chi Chiu, Cheung Florence Man Fung, Lee Anne Wing Mui, Ng Wai Tong, et al. MicroRNA profiling study reveals MIR-150 in association with metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Sci Rep* 2017;**7**(1):1–11. Doi: 10.1038/s41598-017-10695-2.
- 28 Enerly Espen, Steinfeld Israel, Kleivi Kristine, Leivonen Suvi Katri, Aure Miriam R., Russnes Hege G., et al. miRNA-mRNA integrated analysis reveals roles for mirnas in primary breast tumors. *PLoS One* 2011;**6**(2). Doi: 10.1371/journal.pone.0016915.
- 29 Huang Songyin, Chen Yongsong, Wu Wei, Ouyang Nengyong, Chen Jianing, Li Hongyu, et al. MiR-150 promotes human breast cancer growth and malignant behavior by targeting the pro-apoptotic purinergic P2X7 receptor. *PLoS One* 2013;**8**(12). Doi: 10.1371/journal.pone.0080707.
- 30 Jin Minfei, Yang Zujing, Ye Weiping, Xu Hongling, Hua Xiaolin. MicroRNA-150 predicts a favorable prognosis in patients with epithelial ovarian cancer, and inhibits cell invasion and metastasis by suppressing transcriptional repressor ZEB1. *PLoS One* 2014;**9**(8). Doi: 10.1371/journal.pone.0103965.
- 31 Martinez Berta Victoria, Dhahbi Joseph M., Nunez Lopez Yury O., Lamperska Katarzyna, Golusinski Paweł, Luczewski Lukasz, et al. Circulating small non coding RNA signature in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 2015;**6**(22):19246–63. Doi: 10.18632/oncotarget.4266.

- 32 Wang Bei, Xu Wen, Hu Chengyu, Liu Kai, Chen Jinlan, Guo Chong, et al. Critical roles of the lncRNA CASC11 in tumor progression and cancer metastasis: The biomarker and therapeutic target potential. *Genes Dis* 2022;325–33. Doi: 10.1016/j.gendis.2020.11.016.
- 33 Greenberg Eyal, HersHKovitz Liat, Itzhaki Orit, Hajdu Steven, Nemlich Yael, Ortenberg Rona, et al. Regulation of cancer aggressive features in melanoma cells by microRNAs. *PLoS One* 2011;6(4). Doi: 10.1371/journal.pone.0018936.
- 34 Li Mengfeng, Li Jun, Liu Lei, Li Wei, Yang Yi, Yuan Jie. MicroRNA in Human Glioma. *Cancers (Basel)* 2013;5(4):1306–31. Doi: 10.3390/cancers5041306.
- 35 Jafarzadeh Abdollah, Paknahad Mohammad Hossein, Nemati Maryam, Jafarzadeh Sara, Mahjoubin-Tehran Maryam, Rajabi Ali, et al. Dysregulated expression and functions of microRNA-330 in cancers: A potential therapeutic target. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2022;146:112600. Doi: 10.1016/j.biopha.2021.112600.
- 36 Casaca Fátima, Bastos Margarida M.S.M., Sousa Hugo, Teixeira Ana L., Medeiros Rui, Oliveira Paula A., et al. Dysregulated expression of microRNA-150 in human papillomavirus-induced lesions of K14-HPV16 transgenic mice. *Life Sci* 2017;175:31–6. Doi: 10.1016/j.lfs.2017.03.008.
- 37 Chirayil Rachel, Kincaid Rodney P., Dahlke Christine, Kuny Chad V., Dälken Nicole, Spohn Michael, et al. Identification of virus-encoded microRNAs in divergent Papillomaviruses. *PLoS Pathog* 2018;14(7):e1007156. Doi: 10.1371/journal.ppat.1007156.
- 38 Mishra Richa, Kumar Ashish, Ingle Harshad, Kumar Himanshu. The Interplay Between Viral-Derived miRNAs and Host Immunity During Infection. *Front Immunol* 2020;10. Doi: 10.3389/fimmu.2019.03079.
- 39 Pulati Nuerbieke, Zhang Zegao, Gulimilamu Aireti, Qi Xiaoli, Yang Jie. HPV16 + -miRNAs in cervical cancer and the anti-tumor role played by miR-5701. *J Gene Med* 2019;21(11):1–10. Doi: 10.1002/jgm.3126.
- 40 Müller Stephanie, Wallner Stefan, Schmitz Gerd, Loew Thomas, Stempffl Thomas, Möhle Christoph, et al. SNP dependent modulation of circulating miRNAs from the miR25/93/106 cluster in patients undergoing weight loss. *Gene* 2020;753:144787. Doi: 10.1016/j.gene.2020.144787.
- 41 Varani Gabriele, McClain William H. The G·U wobble base pair. *EMBO Rep* 2000;1(1):18–23. Doi: 10.1093/embo-reports/kvd001.

- 42 Xu Darui, Landon Theresa, Greenbaum Nancy L., Fenley Marcia O. The electrostatic characteristics of G{middle dot}U wobble base pairs. *Nucleic Acids Res* 2007;**35**(11):3836–47. Doi: 10.1093/nar/gkm274.
- 43 Doudna J. A., Cormack B. P., Szostak J. W. RNA structure, not sequence, determines the 5' splice-site specificity of a group I intron. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1989;**86**(19):7402–6. Doi: 10.1073/pnas.86.19.7402.
- 44 Hur Moonkyung, Waring Richard B. Two group I introns with a OG basepair at the 5'splice-site instead of the very highly conserved LUG basepair: is selection post-translational? *Nucleic Acids Res* 1995;**23**(21):4466–70. Doi: 10.1093/nar/23.21.4466.
- 45 Doench John G., Sharp Phillip A. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev* 2004;**18**(5):504–11. Doi: 10.1101/gad.1184404.
- 46 Saxena Sandeep, Jónsson Zophonías O., Dutta Anindya. Small RNAs with Imperfect Match to Endogenous mRNA Repress Translation. *Journal of Biological Chemistry* 2003;**278**(45):44312–9. Doi: 10.1074/jbc.M307089200.
- 47 Albuquerque Andreia, Fernandes Mara, Stirrup Oliver, Teixeira Ana Luísa, Santos Joana, Rodrigues Marta, et al. Expression of microRNAs 16, 20a, 150 and 155 in anal squamous intraepithelial lesions from high-risk groups. *Sci Rep* 2019;**9**(1). Doi: 10.1038/s41598-018-38378-6.
- 48 Li Jun, Hu Lina, Tian Chao, Lu Feng, Wu Jia, Liu Li. microRNA-150 promotes cervical cancer cell growth and survival by targeting FOXO4. *BMC Mol Biol* 2015;**16**(1):1–9. Doi: 10.1186/s12867-015-0052-6.
- 49 Zhang Zhan, Wang Jinming, Li Jing, Wang Xiaofang, Song Wanyu. MicroRNA-150 promotes cell proliferation, migration, and invasion of cervical cancer through targeting PDCD4. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 2018;**97**(7):511–7. Doi: 10.1016/j.biopha.2017.09.143.
- 50 Zhao Hong, Zhang Jie-Xin. Natural killer cells: the first defense against human papilloma virus early infection. *J Public Health Emerg* 2017. Doi: 10.21037/jphe.2016.12.06.
- 51 Tarassishin Leonid, Casper Diana, Lee Sunhee C. Aberrant Expression of Interleukin-1 β and Inflammasome Activation in Human Malignant Gliomas. *PLoS One* 2014;**9**(7):e103432. Doi: 10.1371/journal.pone.0103432.
- 52 Shi Linlin, Pan Hongming, Liu Zhen, Xie Jiansheng, Han Weidong. Roles of PFKFB3 in cancer. *Signal Transduct Target Ther* 2017;**2**(April):1–10. Doi: 10.1038/sigtrans.2017.44.

- 53 Zhang Wensheng, Edwards Andrea, Fang Zhide, Flemington Erik K, Zhang Kun. Integrative Genomics and Transcriptomics Analysis Reveals Potential Mechanisms for Favorable Prognosis of Patients with HPV-Positive Head and Neck Carcinomas. *Sci Rep* 2016;**6**(October 2015):24927. Doi: 10.1038/srep24927.
- 54 Li Lianqin, Zuo Huancong, Chen Chunling, Cao Zeyi, Kee Kehkooi, Lin Jianfei, et al. HPV16 early gene E5 specifically reduces miRNA-196a in cervical cancer cells. *Sci Rep* 2015;**5**(1):21–5. Doi: 10.1038/srep07653.
- 55 Li Nan, Guo Xiao Rong, Liu Lei, Wang Lu, Cheng Rongjie. Molecular mechanism of miR-204 regulates proliferation, apoptosis and autophagy of cervical cancer cells by targeting ATF2. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2019;**47**(1):2529–35. Doi: 10.1080/21691401.2019.1628038.
- 56 Li Tianqi, Pan Hongjie, Li Runsheng. The dual regulatory role of miR-204 in cancer. *Tumor Biology* 2016. Doi: 10.1007/s13277-016-5144-5.
- 57 López Angelica Judith Granados, López Jesús Adrián. Multistep model of cervical cancer: Participation of miRNAs and coding genes. *Int J Mol Sci* 2014;**15**(9):15700–33. Doi: 10.3390/ijms150915700.
- 58 Yao Yilong, Xue Yixue, Ma Jun, Shang Chao, Wang Ping, Liu Libo, et al. MIR-330-Mediated regulation of SH3GL2 expression enhances malignant behaviors of glioblastoma stem cells by activating ERK and PI3K/AKT signalling pathways. *PLoS One* 2014;**9**(4). Doi: 10.1371/journal.pone.0095060.
- 59 Chauhan Ranjit, Datzkiw David, Shrivastav Shailly Varma, Shrivastav Anuraag. In silico identification of microRNAs predicted to regulate N-myristoyltransferase and Methionine Aminopeptidase 2 functions in cancer and infectious diseases. *PLoS One* 2018;**13**(3). Doi: 10.1371/journal.pone.0194612.
- 60 Nyman Patrick E., Buehler Darya, Lambert Paul F. Loss of function of canonical Notch signalling drives head and neck carcinogenesis. *Clinical Cancer Research* 2018;**24**(24):6308–18. Doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-3535.
- 61 Kranjec Christian, Holleywood Christina, Libert Diane, Griffin Heather, Mahmood Radma, Isaacson Erin, et al. Modulation of basal cell fate during productive and transforming HPV-16 infection is mediated by progressive E6-driven depletion of Notch. *J Pathol* 2017;**242**(4):448–62. Doi: 10.1002/path.4917.
- 62 Yi Yuexiong, Fang Yan, Wu Kejia, Liu Yanyan, Zhang Wei. Comprehensive gene and pathway analysis of cervical cancer progression. *Oncol Lett* 2020. Doi: 10.3892/ol.2020.11439.

Tabela suplementar 1 – Predição da interação entre miRNA, oncogenes de HPV e genes supressores de tumor humano. Os miRNAs expressos diferencialmente em células cervicais infectadas por HPV em comparação com as não infectadas foram testados quanto à afinidade de ligação aos genes virais E6 e E7, e aos genes humanos TP53 e RB1, utilizando o valor de energia livre de Gibbs (ΔG) -30 Kcal/mol como ponto de corte

microRNA	hpv16	hpv18	hpv33	hpv45	hpv52	hpv58	3'UTR_P53	P53_CDS	3'UTR_RB1
<i>hsa-miR-6842-3p</i>		E6/-31,1	E7/-30,6		E7/-30,6		-31,6	-36,8	-24,8
<i>hsa-miR-4449</i>		E6/-30,1		E6/-30,2	E7/-30,2		-32,0	-36,6	-26,6
<i>hsa-miR-6842-5p*</i>		E6/-30,3					-25,9	-31,9	-27,7
<i>hsa-miR-221-3p</i>		E7/-30,9		E6/-30,3			-23,1	-25,6	-23,6
<i>hsa-miR-431-3p</i>		E7/-31,7		E7/-30,4			-27,6	-27,6	-29,5
<i>hsa-miR-204-3p</i>		E7/-31,2					-27,3	-33,9	-29,6
<i>hsa-miR-431-5p</i>		E7/-32,2					-23,8	-29,3	-23,9
<i>hsa-miR-99a-3p</i>	E6/-30,5						-25,5	-34,0	-24,3
<i>hsa-miR-99b-3p</i>	E6/-32,6						-25,5	-29,0	-26,6
<i>hsa-miR-3127-3p</i>	E7/-30,0						-31,2	-27,3	-25,5
<i>hsa-let-7a-2-3p</i>			E6/-30,4				-22,8	-26,2	-20,6
<i>hsa-miR-330-3p</i>			E6/-30,6				-25,2	-24,9	-26,0
<i>hsa-miR-185-3p</i>			E7/-30,3		E7/-30,0		-30,4	-37,6	-27,2
<i>hsa-miR-675-5p</i>			E7/-31,9			E7/-31,7	-31,7	-36,1	-24,8
<i>hsa-let-7i-3p</i>				E6/-30,5			-21,5	-24,5	-22,0
<i>hsa-miR-874-3p*</i>		E6/-31,2	E6/-31,5	E6/-31,2		E6/-34,9	-26,1	-32,6	-27,3
<i>hsa-miR-1976*</i>				E6/-30,0			-26,5	-30,3	-22,2
<i>hsa-miR-150-3p</i>					E7/-31,0		-30,1	-34,4	-35,3

Legenda: *E6/ ΔG* - Interação com a oncoproteína E6/energia livre de Gibbs, *E7/ ΔG* - Interação com a oncoproteína E7/energia livre de Gibbs, ΔG - energia livre de Gibbs.

*miRNAs sem significância estatística

Tabela suplementar 2 – Predição da interação entre miRNA, genes do HPV sem o limite de energia livre de Gibbs (ΔG) -30 Kcal/mol

	Gene	Interação por miRNAs (ΔG)																	
		6842-3p	4449	6842-5p	221-3p	431-3p	204-3p	431-5p	99a-3p	99b-3p	3127-3p	let-7a-2-3p	330-3p	185-3p	675-5p	let-7i-3p	874-5p	1976	150-3p
HPV45	E1	-31,7	-24,4	-25,6	-28,1	-24,5	-21,1	-24,7	-25,5	-26,9	-30	-26,4	-22,1	-24,3	-22,1	-30,5	-25,6	-28,7	-28
	E2	-26,4	-28	-25,4	-29	-25,6	-24,3	-26,4	-23,5	-32,3	-24,6	-25,1	-26,1	-24,1	-27	-26,9	-20,9	-23,5	-29
	E6	-28,5	-30,2	-25,6	-30,3	-22,8	-27,2	-24,9	-21,1	-25,5	-27,5	-22,1	-20,7	-24,6	-25,3	-30,5	-24,9	-30	-26,2
	E7	-25	-24,3	-22,6	-25,5	-30,4	-24,1	-29,6	-22,1	-29,5	-25,3	-21,4	-24,2	-24,2	-24,4	-24,6	-23,9	-23,2	-26,7
	L1	-26,2	-32	-27,9	-26	-28,9	-26,3	-29,4	-24,9	-25,5	-27,5	-22,5	-25,7	-25,7	-28,5	-25,5	-28,9	-25,1	-29,1
	L2	-28,3	-31,2	-30,1	-24,9	-28,9	-27,6	-26	-22,4	-29,2	-30,7	-28,4	-32,8	-30,9	-29,3	-25,4	-28,8	-25,7	-30,4
HPV33	E1	-26,9	-27,2	-26,3	-29,5	-24,8	-21,5	-22,7	-24,5	-25,5	-34,3	-28,6	-23,6	-28,2	-25,2	-24,1	-28,6	-25,7	-24,1
	E2	-24,8	-35,5	-24,2	-29,6	-29,7	-24	-27,3	-22,5	-28,4	-25,4	-23,1	-26,2	-28,3	-34,2	-24,7	-21,2	-22,9	-28,3
	E4	-24,8	-35,5	-23,5	-29,6	-29,7	-23,6	-27,3	-22,5	-28,4	-25,3	-22,2	-26,2	-28,3	-28	-21,9	-19,5	-16,1	-22,2
	E5	-20,4	-27	-23,9	-18	-18,2	-26,1	-20,1	-17,2	-18,1	-21,1	-19	-24,6	-18,4	-25,3	-19,2	-26,2	-19,3	-21,6
	E6	-25,3	-28,4	-20,9	-20,2	-28,4	-21,5	-27,4	-19,8	-23,4	-25,2	-30,4	-30,6	-22,5	-27,1	-29,4	-24,4	-27,4	-24,2
	E7	-30,6	-26,6	-24,9	-21,1	-23,1	-19,5	-25,3	-23,6	-26,3	-23,6	-23,5	-22	-30,3	-31,9	-21,8	-20,6	-23,6	-28,9
	L1	-30,1	-30	-29,8	-24,5	-28,6	-26,2	-34,9	-23,2	-24,3	-30,2	-25,1	-25	-26,3	-28,6	-25,6	-27,2	-25,8	-30,4
	L2	-26,6	-33,1	-30,1	-23,8	-28	-25,9	-28	-22,8	-26,3	-35,1	-22,2	-24,1	-32,7	-26,7	-24,6	-28,4	-22,7	-29,8
HPV58	E1	-33,5	-28,3	-24,5	-30,1	-25,8	-24,6	-25,8	-28,5	-26,8	-28,6	-28,2	-25,4	-27,2	-29,8	-27,1	-30,1	-26	-26,6
	E2	-25,7	-27,8	-25,5	-23,8	-24,5	-24	-24,1	-23,2	-25,2	-27,9	-23	-24	-25,7	-32	-21,8	-27,6	-26,3	-31
	E4	-25,7	-26,1	-25,3	-21,3	-24,5	-21,4	-21,7	-23,2	-25,2	-27,9	-22,2	-21,7	-25,7	-22,7	-21,8	-18,7	-26,3	-26,1
	E5	-23,3	-29,3	-22,5	-17,9	-22,6	-24,4	-21,6	-22,2	-21,2	-21,7	-20,2	-30,7	-22,1	-23,8	-19,8	-35,1	-19,5	-29
	E6	-26	-27,2	-26	-26	-26,5	-20,2	-26,5	-20	-27,9	-22	-29,5	-26,6	-23,3	-22,1	-25,7	-21,8	-21,3	-24,2
	E7	-25,9	-27	-22,1	-23,9	-22,4	-22,3	-25,3	-22,4	-26,4	-24,8	-21,3	-25,8	-29,3	-31,7	-23,6	-21,9	-24,3	-29,3
	L1	-27,9	-29,9	-30	-24,9	-28	-26,6	-34,9	-22,6	-25,2	-32,8	-27,2	-29	-29,4	-31,7	-24,5	-28,4	-22,3	-30,9
	L2	-27,4	-30,6	-27,8	-24,9	-28	-27,8	-27,2	-21,6	-26,3	-29,6	-30,1	-29	-30,1	-31,9	-25,2	-28,4	-28,5	-33,9

Tabela suplementar 2 – Continuação.

Gene	Interação por miRNAs (ΔG)																		
	6842-3p	4449	6842-5p	221-3p	431-3p	204-3p	431-5p	99a-3p	99b-3p	3127-3p	let-7a-2-3p	330-3p	185-3p	675-5p	let-7i-3p	874-5p	1976	150-3p	
HPV52	E1	-33,4	-27	-26,5	-26,8	-27,8	-20,1	-26,2	-26,4	-27,6	-34,6	-32,6	-28,3	-26,7	-22	-27,6	-26,8	-30	-26,6
	E2	-28,8	-28,8	-24,4	-23,7	-23,8	-22,7	-24,7	-23,3	-26,1	-25,7	-23,1	-23,2	-25,2	-27,4	-24	-26,7	-21,8	-27,8
	E4	-25,1	-28,8	-23,1	-20,5	-21,4	-20,7	-24,4	-19,7	-26,1	-24,1	-18,4	-22,8	-25,2	-26,2	-18,6	-26,7	-20	-26,8
	E5	-24,1	-28,9	-24,3	-21,8	-18,1	-20,1	-19,5	-19	-24,4	-22,3	-19,7	-28,1	-25,6	-24,9	-25,6	-27,9	-19,2	-23,2
	E6	-25,9	-24,3	-27,8	-25,1	-27,8	-20,5	-27,7	-22,9	-27,5	-26	-25,1	-29,9	-24,1	-24,1	-27,8	-30,6	-21,8	-25,7
	E7	-30,6	-30,2	-24	-25,2	-23,8	-21,7	-25,8	-20,3	-29,1	-25,3	-24,8	-24,4	-30	-29,5	-22,9	-28,2	-24,1	-31
	L1	-27,9	-28,3	-29,6	-27,2	-30,1	-26,6	-34,9	-24,7	-25,4	-32,9	-27,8	-23,8	-29,7	-32,7	-26,6	-29,6	-25,4	-33,5
	L2	-25,4	-30,5	-32	-23,8	-28	-25,6	-27,5	-29,4	-27,2	-32,8	-26,1	-31,7	-24,9	-25,5	-28,7	-32,6	-28,3	-29,4
HPV18	E1	-29,7	-25,5	-25,4	-26,6	-27,3	-20,1	-27,8	-27	-26,5	-31,1	-31,5	-23,2	-26,7	-22,4	-30,5	-25,2	-33,9	-24,8
	E2	-32,6	-29,1	-27	-24,8	-31,2	-24,1	-28,4	-26,6	-28,6	-28,5	-20,2	-26,1	-33,1	-29,1	-23,9	-24,7	-28,6	-29,9
	E4	-32,6	-28	-27	-24	-31,2	-24,1	-25,3	-26,6	-28,6	-21,5	-19,3	-21	-27,1	-29,1	-19,4	-24,7	-20	-24,1
	E5	-22,1	-24	-21	-19,7	-18,2	-29,5	-20,6	-16	-19,5	-18	-18,5	-28,1	-22,3	-26,2	-24,6	-25,2	-16,6	-28,1
	E6	-31,1	-30,1	-30,3	-24,6	-27,8	-24,7	-27,2	-27,1	-26,4	-22,8	-22,7	-22,8	-26,6	-25,3	-23,9	-26,1	-22,8	-26,7
	E7	-25,4	-23,7	-25,5	-30,9	-31,7	-31,2	-32,2	-19,9	-25,6	-21	-20,4	-24,2	-26,9	-23,5	-23,7	-25,7	-17,2	-26,9
	L1	-30,5	-32	-27,8	-24,9	-28,9	-25,8	-30,5	-23,9	-27,8	-31,3	-21,1	-30,1	-29,5	-30,9	-28,6	-28,5	-22,7	-30,3
	L2	-29	-31,2	-25,7	-25,3	-28,9	-27,9	-24,9	-22	-29,1	-29,9	-28,2	-25,7	-28,7	-31,7	-25,3	-28,5	-24,5	-34,8
HPV16	E1	-27,1	-25,5	-25,2	-29,8	-25,8	-20,3	-23,8	-25,4	-29,2	-32,1	-27,6	-28,3	-23,1	-22,7	-25,3	-29	-27,5	-26,5
	E1^E4	-25,5	-28,5	-31,2	-30,5	-26,3	-23,4	-22,1	-24	-23,6	-21,4	-17,8	-18,7	-31,5	-24,8	-20,4	-20,9	-18,3	-24,7
	E2	-25,5	-29,2	-31,2	-30,5	-27,2	-23,4	-24,7	-26,2	-25,6	-24,2	-22,7	-24,8	-31,5	-28,3	-21,9	-25	-21,4	-28,3
	E5	-22,4	-22,9	-20,2	-17,3	-21,7	-24,9	-20	-18,8	-20,5	-25,1	-15,5	-28	-24,8	-26,8	-19	-22,5	-16,9	-23
	E6	-20,6	-22,5	-19,4	-21,3	-25	-18,3	-22	-30,5	-32,6	-19,5	-16,6	-20,4	-21,3	-18,2	-21,2	-18,1	-21	-22,9
	E7	-26,1	-26,1	-25,4	-23,4	-24,3	-20,9	-24,8	-23,4	-25,2	-30	-22,4	-22,9	-29,7	-28,9	-20,6	-22,3	-28,2	-27,4
	L1	-25,6	-27	-32,5	-23,2	-23,7	-31,4	-24,6	-25,5	-26,2	-26,9	-23,6	-25,3	-26,4	-30,9	-26,4	-27,1	-26,3	-29,7
	L2	-23,8	-30,3	-27,4	-24,3	-27,2	-28,8	-22,2	-26,6	-26,6	-28,3	-27,3	-22	-25	-33,8	-23,1	-24,1	-26,4	-32,6

Legenda: ΔG – Energia livre de Gibbs.

6 CONCLUSÃO

Este estudo investigou o perfil de miRNAs celulares associados à infecção por HPV e seu impacto no desenvolvimento do câncer cérvico-uterino. Os resultados obtidos em análises de bioinformática sugeriram que a superexpressão dos miR-150-3p e miR-330-3p e a subexpressão de miR-204-3p estavam associadas ao desenvolvimento de câncer cervical secundário à infecção pelo papilomavírus humano, sendo nosso estudo o primeiro a relacionar a desregulação desses três miRNAs com a infecção pelo HPV em humanos.

A confirmação funcional dos achados *in silico* demonstrou que apesar do miR-150-3p não ter sido associado à infecção por HPV ou à gravidade da lesão, baixos níveis de miR-330-3p e altos níveis de miR-204-3p foram associados à infecção por HPV em células com lesões pré-cancerosas. Portanto, estes achados indicam que a mudança no padrão de expressão destes miRNAs possivelmente desencadeia o processo de tumorigênese. Desta forma, concluímos que em lesões pré-cancerosas do colo do útero, o HPV foi associado à expressão negativa do miR-330-3p e a expressão positiva do miR-204-3p, e que, de acordo com a função relatada desse miRNA, este seria um mecanismo de defesa imune contra infecção viral. Além disso, defendemos que o miR-150-3p pode ser uma das moléculas-chave no mecanismo que desencadeia alterações na resposta imune em favor da fuga do vírus frente ao sistema imunológico, gerando o processo de malignidade do câncer cervical.

Diante disso, fazem-se necessárias para permitir mais conclusões, análises de confirmação do impacto regulatório destes miRNAs na expressão dos genes-alvo das vias identificadas neste estudo, principalmente aquelas duplamente reguladas. Salientamos que validações experimentais mais aprofundadas com foco nos mecanismos de interação miRNA-mRNA dos genes-alvo impactados, no aumento do número amostral utilizado para as etapas de confirmação e na determinação da biodisponibilidade dessas moléculas em diferentes tipos amostrais constituem perspectivas que devem ser bordadas em investigações de nosso grupo. Assim, além de contribuir para o entendimento das bases biológicas associadas à evasão do HPV frente a resposta imunológica e aos impactos regulatórios que favorecem a progressão tumoral, a confirmação mais robusta da desregulação celular gerada pelas moléculas identificadas neste estudo poderá viabilizar o uso potencial destas biomoléculas como ferramentas diagnósticas no sistema único de saúde, sendo utilizadas como marcadores de infecção, de prognóstico e de estadiamento do CCU.

REFERÊNCIAS

- ASHRAFI, G. H. et al. E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I. **International Journal of Cancer**, 2005.
- ALMEIDA RS, et al. Differentially Expressed Bone Marrow microRNAs Are Associated With Soluble HLA-G Bone Marrow Levels in Childhood Leukemia. **Front. Genet.**, 2022 13:871972.
- BANNO, K. et al. MicroRNA in Cervical Cancer: OncomiRs and Tumor Suppressor miRs in Diagnosis and Treatment. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1–8, 2014a.
- BANNO, K. et al. Application of MicroRNA in Diagnosis and Treatment of Ovarian Cancer. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–6, 2014b.
- BARTEL, D. MicroRNAs Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. **Cell**, v. 116, n. 2, p. 281–297, 2004a.
- BEN, W. et al. Human papillomavirus 16 E6 modulates the expression of host microRNAs in cervical cancer. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, 2015.
- BERNARD, H.U. et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**. 401(1), 70-9, 2010.
- BHAT, P. et al. Regulation of immune responses to HPV infection and during HPV-directed immunotherapy. **Immunological Reviews**, 239: 85-98, 2011.
- BOSCH, F. X. et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: A worldwide perspective. **Journal of the National Cancer Institute**, 1995.
- BOSISIO, D. et al. Extracellular miRNAs as activators of innate immune receptors. **Cancer Letters**, v. 452, p. 59–65, jun. 2019.
- BRUNI, L. et al. Human Papillomavirus and Related Diseases Report. **HPV Information Centre**, n. December, 2018.
- CALIN, G. A. et al. Nonlinear partial differential equations and applications: Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 24, p. 15524–15529, 2002.
- CHALLAGUNDLA, K. B. et al. Exosome-Mediated Transfer of microRNAs Within the Tumor Microenvironment and Neuroblastoma Resistance to Chemotherapy. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, n. 7, jul. 2015.
- COLAPRICO, A. et al. TCGA bioinformatics : an R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 8, p. e71–e71, 5 maio 2016.
- DE JONG, A. et al. Human papillomavirus type 16-positive cervical cancer is associated with impaired CD4+ T-cell immunity against early antigens E2 and E6. **Cancer Research**, 2004.
- DE VILLIERS, E.-M. et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17–27, jun. 2004.
- DIAZ-CHAVEZ, J. et al. Down-regulation of transforming growth factor- β type II receptor (TGF- β RII) protein and mRNA expression in cervical cancer. **Molecular Cancer**, 2008.
- DÍAZ-GONZÁLEZ, S. D. M. et al. Utility of MicroRNAs and siRNAs in cervical carcinogenesis. **BioMed Research International**, 2015.
- DIZ, M. D. P. E.; MEDEIROS, R. B. DE. Câncer de colo uterino – fatores de risco, prevenção, diagnóstico e tratamento. **Revista de Medicina**, v. 88, n. 1, p. 7–15, 6 mar. 2009.

- EIRING, A. M. et al. miR-328 Functions as an RNA Decoy to Modulate hnRNP E2 Regulation of mRNA Translation in Leukemic Blasts. **Cell**, v. 140, p. 652–665, 2010.
- ESTEVIÃO, D., et. al. Hallmarks of HPV carcinogenesis: The role of E6, E7 and E5 oncoproteins in cellular malignancy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, V. 1862, p. 153-162, 2019.
- FRIEDLÄNDER, M. R. et al. MiRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. **Nucleic Acids Research**, 2012.
- GRIFFITHS-JONES, S. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. **Nucleic Acids Research**, 2005.
- GUIMARÃES, M. V. M. B. et al. Resposta imune ao HPV e as neoplasias intra-epiteliais cervicais em mulheres infectadas e não infectadas pelo HIV: perfil de citocinas. **Femina**, v. 39 (5), n. 275–280, 2011.
- HEBNER, C. M.; LAIMINS, L. A. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. **Reviews in Medical Virology**, v. 16, n. 2, p. 83–97, mar. 2006.
- HSU, S. DA et al. MiRTarBase: A database curates experimentally validated microRNA-target interactions. **Nucleic Acids Research**, 2011.
- HUANG, D. W.; SHERMAN, B. T.; LEMPICKI, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. **Nature protocols**, 2009.
- HUI, A. B. Y. et al. Potentially prognostic miRNAs in HPV-associated oropharyngeal carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 8, p. 2154–2162, 2013.
- INCA. **ESTIMATIVA | 2023 Incidência de Câncer no Brasil**. [s.l: s.n.].
- JUNG, H. S. et al. Human papillomavirus E6/E7-specific siRNA potentiates the effect of radiotherapy for cervical cancer in vitro and in vivo. **International Journal of Molecular Sciences**, 2015.
- KIM, S.-H. et al. Involvement of NF- κ B and AP-1 in COX-2 upregulation by human papillomavirus 16 E5 oncoprotein. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 5, p. 753–757, 1 maio 2009.
- KIRMA, N. et al. Elevated expression of the oncogene c-fms and its ligand, the macrophage colony-stimulating factor-1, in cervical cancer and the role of transforming growth factor- β 1 in inducing c-fms expression. **Cancer Research**, 2007.
- KLINGELHUTZ, A. J.; ROMAN, A. Cellular transformation by human papillomaviruses: Lessons learned by comparing high- and low-risk viruses. **Virology**, v. 424, n. 2, p. 77–98, mar. 2012.
- KOBAYASHI, A. et al. Functional attributes of mucosal immunity in cervical intraepithelial neoplasia and effects of HIV infection. **Cancer Research**, 2004.
- KONG, Q.; WANG, W.; LI, P. Regulator role of HPV E7 protein on miR-21 expression in cervical carcinoma cells and its functional implication. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 12, p. 15808–15813, 2015.
- LAU, A. et al. DNA tumor virus oncogenes antagonize the cGAS-STING DNA-sensing pathway. **Science**, 2015.
- LEWIS, B. P.; BURGE, C. B.; BARTEL, D. P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. **Cell**, v.120, n.1, p15-20, 2005.
- LIMBERGER, A. et al. Aspectos imunológicos da infecção pelo vírus do papiloma humano (HPV). **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 33, n. 1, p. 111–122, 2012.

- LING, H.; FABBRI, M.; CALIN, G. A. MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 11, p. 847–865, 2013.
- LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**. 2001 Dec;25(4):402-8.
- LUCENA, A. A. DE S. et al. Resposta imune celular ao papilomavírus humano em mulheres infectadas e não infectadas pelovírus da imunodeficiência humana. **Femina (Rio de Janeiro)**, v. 39, p. 149–155, 2011.
- MACHADO, P. R. L. et al. Immune response mechanisms to infections. **Continuing Medical Education**, v. 79, n. 6, p. 647–664, 2004.
- MARIA DUTILH NOVAES, H. et al. Annual national direct and indirect cost estimates of the prevention and treatment of cervical cancer in Brazil. **Clinics**, v. 70, n. 4, p. 289–295, 2015.
- MARTIN, D. B. et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2008.
- MARTINS, A. E. S. et al. Prognostic Evaluation of DNA Index in HIV-HPV Co-Infected Women Cervical Samples Attending in Reference Centers for HIV-AIDS in Recife. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e104801, 21 ago. 2014a.
- MARTINS, A. E. S. et al. Prevalence of human papillomavirus infection, distribution of viral types and risk factors in cervical samples from human immunodeficiency virus-positive women attending three human immunodeficiency virus-acquired immune deficiency syndrome reference cent. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 6, p. 738–747, set. 2014b.
- NAHAND, J. S. et al. microRNAs: New prognostic, diagnostic, and therapeutic biomarkers in cervical cancer. **Journal of cellular physiology**, n. January, p. jcp.28457, 2019.
- NIN, D. S. et al. Targeted Silencing of MLL5 Inhibits Tumor Growth and Promotes Gamma-Irradiation Sensitization in HPV16/18-Associated Cervical Cancers. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 13, n. 11, p. 2572–2582, 2014.
- O'BRIEN, P. M.; SAVERIA CAMPO, M. **Evasion of host immunity directed by papillomavirus-encoded proteins** *Virus Research*, 2002.
- O'CONNELL, R. M. et al. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 2, p. 111–122, 2010.
- ØROM, U. A.; NIELSEN, F. C.; LUND, A. H. MicroRNA-10a Binds the 5'UTR of Ribosomal Protein mRNAs and Enhances Their Translation. **Molecular Cell**, v. 30, p. 460–471, 2008.
- The Papillomavirus Episteme (PaVE) [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988] – [citado em 27 de junho de 2023]. Disponível em: <https://pave.niaid.nih.gov/index>
- RINCON-OROZCO, B. et al. Epigenetic silencing of interferon-κ in human papillomavirus type 16-positive cells. **Cancer Research**, 2009.
- ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, 2009.
- ROSENBLOOM, K. R. et al. The UCSC Genome Browser database: 2015 update. **Nucleic Acids Research**, 2015.
- ROVIRA, C.; GÜIDA, M. C.; CAYOTA, A. MicroRNAs and other small silencing RNAs in cancer. **IUBMB Life**, v. 62, n. 12, p. 859–868, 2010.
- SAKAGUCHI, S. Regulatory T cells: Mediating compromises between host and parasite. **Nature Immunology**, 2003.

- SALVI, V. et al. Exosome-delivered microRNAs promote IFN- α secretion by human plasmacytoid DCs via TLR7. **JCI Insight**, v. 3, n. 10, 17 maio 2018.
- SANTANA, E. A. et al. Câncer cervical : etiologia , diagnóstico e prevenção. v. 15, n. 4, p. 199–204, 2008.
- SCHAPIRO, F. et al. Golgi alkalization by the papillomavirus E5 oncoprotein. **Journal of Cell Biology**, 2000.
- SCHIFFMAN, M. et al. Human papillomavirus and cervical cancer. **The Lancet**, v. 370, n. 9590, p. 890–907, set. 2007.
- SENBA M, MORI N. Mechanisms of virus immune evasion lead to development from chronic inflammation to cancer formation associated with human papillomavirus infection. *Oncol Rev.* 2012 Oct 5;6(2):e17.
- SHARMA, D.; PRIYADARSHINI, P.; VRATI, S. Unraveling the web of viroinformatics: computational tools and databases in virus research. **Journal of virology**, v. 89, n. 3, p. 1489–1501, 2015.
- SHARMA, S. et al. Novel MicroRNA signatures in HPV-mediated cervical carcinogenesis in Indian women. **Tumor Biology**, v. 37, n. 4, p. 4585–4595, 2016.
- SHIRDEL, E. A. et al. NAViGaTing the micronome - using multiple microRNA prediction databases to identify signalling pathway-associated microRNAs. **PLoS ONE**, 2011.
- STANLEY, M. A. Immune responses to human papilloma viruses. **Indian Journal of Medical Research**, 2009.
- STANLEY, M. A.; PETT, M. R.; COLEMAN, N. HPV: from infection to cancer. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, n. 6, p. 1456–1460, 1 dez. 2007.
- The Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer. **Nature** 543, 378–384 (2017).
- VALADI, H. et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Nature cell biology**, 2007.
- VASUDEVAN, S.; TONG, Y.; STEITZ, J. A. Switching from repression to activation: MicroRNAs can up-regulate translation. **Science**, v. 318, p. 1931–1934, 2007.
- VENUTI, A. et al. Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. **Molecular Cancer**, v. 10, n. 1, p. 140, 2011.
- WALBOOMERS, J. M. M. et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **Journal of Pathology**, 1999.
- WANG, J.; CHEN, L. The role of miRNAs in the invasion and metastasis of cervical cancer. **Bioscience Reports**, v. 39, n. 3, p. BSR20181377, 29 mar. 2019.
- WANG, Q. et al. Downregulation of microRNA-145 is associated with aggressive progression and poor prognosis in human cervical cancer. **Tumor Biology**, 2015.
- WEINSTEIN, S. et al. Harnessing RNAi-based nanomedicines for therapeutic gene silencing in B-cell malignancies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2015.
- WESTRICH, J. A.; WARREN, C. J.; PYEON, D. Evasion of host immune defenses by human papillomavirus **Virus Research**, 2017.
- WONG, N. et al. Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. **Oncology Reports**, v. 8, n. 2, p. 3–12, 2014.
- YAO, T; LIN, Z. MiR-21 is involved in cervical squamous cell tumorigenesis and regulates CCL20. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, Volume 1822,

Issue 2, Pages 248-260, 2012.

ZHOU C, TUONG ZK, FRAZER IH. Papillomavirus Immune Evasion Strategies Target the Infected Cell and the Local Immune System. **Front Oncol.** 2019 Aug 2;9:682.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 5, p. 342–350, 2002.

APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO DURANTE O DOUTORADO (2018)

Journal: Cytokine, impact factor (JCR): 3.926, [10.1016/j.cyto.2018.04.001](https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.04.001)

ARTICLE IN PRESS

Cytokine xxx (xxxx) xxx–xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Cytokine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cytokine



Acute coronary syndrome: Relationship between genetic variants and TIMI risk

Viviane do Carmo Vasconcelos de Carvalho^a, Lílian Caroliny Amorim Silva^a, Romário Martins Araújo^a, Fábila Carla da Silva Soares^a, Maria José Ribeiro Bezerra^a, Sávio Augusto Vieira de Oliveira^a, Alex José de Melo Silva^a, Sérgio Tavares Montenegro^b, Roberto Pereira Werkhauser^a, Carlos Gustavo Régis da Silva^c, Adriana Vieira Gomes^d, Clarice Neuenschwander Lins de Moraes^e, Silvia Maria Lucena Montenegro^{a,*}

^a Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Departamento de Imunologia, Instituto Aggeu Magalhães, Fiocruz – PE, Av. Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Zip Code: 50.740-465, Recife, PE, Brazil

^b Real Hospital do Coração, Real Hospital Português (RHP), Av. Gov. Agamenon Magalhães, 4760, Paissandu, Zip Code: 52010-902, Recife, PE, Brazil

^c Laboratório de Biologia Parasitária, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fiocruz – BA, R. Waldemar Falcão, 121, Candeal, Zip Code: 40296-710, Salvador, BA, Brazil

^d Faculdade de Ciências Médicas – FCM, Universidade de Pernambuco – UPE, Rua Arnóbio Marques, 310, Santo Amaro, Zip Code: 50100-130, Recife, PE, Brazil

^e Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LaVITE), Departamento de Virologia, Instituto Aggeu Magalhães, Fiocruz – PE, Av. Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Zip Code: 50.740-465, Recife, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Acute coronary syndrome
Genetic variants
Cytokines
Risk factors

ABSTRACT

Acute Coronary Syndrome (ACS) is a multifactorial disease, including the genetic factor, caused by coronary artery obstruction by atheroma. Some genetic variants have been described as risk factors for this disease. Its early diagnosis and stratification of risk of death by Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) are important. Therefore, we evaluated variants in the *IL6R* (c950-1722C > T), *TNFA* (c-488G > A), *LEPR* (c.2673+1118C > T) and *IL1b* (c.-598T > C) genes in relation to TIMI risk, cytokine serum levels, and risk factors for ACS. We selected 200 patients with ACS, 50 without ACS from the Real Hospital Português, Recife - PE, and 295 blood donors at the Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco (Hemope). Variants were determined by DNA sequencing or enzymatic cleavage. Cytokine levels were measured by ELISA. The most frequent risk factors found in the patients were dyslipidemia and hypertension, this latter associated with high TIMI risk ($p = 0.003$). Genotype frequencies of *IL6R* and *TNFA* differed between patients with ACS and the blood donors ($p = 0.0002$ and $p = 0.01$, respectively), and $TNF-\alpha$ levels differed between genotypes. The TT genotype of the *IL6R* gene is as a possible protective factor for ACS because it was significantly more present in blood donors (32.2%) than in patients with ACS (18.0%), and was more frequent in low TIMI risk (22.9%) than in the intermediate (20.2%) or high (4.9%). In patients with ACS, the TT genotype in *IL6R* was related to a lower concentration of c-reactive protein ($p = 0.03$) and troponin ($p = 0.02$), showing a less inflammatory reaction and tissue damage. The differences in the frequencies of variants in genes of medical interest among the groups show the importance of studies in specific populations groups to establish the relationship between genes and diseases.

1. Introduction

Cardiovascular diseases (DCs) are currently the leading causes of death in the world (WHO, 2016). Among them, Acute Coronary

Syndrome (ACS), which includes Acute Myocardial Infarction (AMI) and Unstable Angina (IA), is a cardiovascular disease caused by obstruction of the coronary arteries by atheromatous plaque and involves clinical symptoms compatible with acute myocardial ischemia [1,2].

* Corresponding author at: Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Departamento de Imunologia, Instituto Aggeu Magalhães, Fiocruz – PE, Av. Professor Moraes Rego, s/n, Zip Code: 50.740-465, Recife, PE, Brazil.

E-mail addresses: vivicarvalho@gmail.com (V.d.C.V. de Carvalho), liliancaroli.ny@hotmail.com (L.C.A. Silva), araujo.rmartins@gmail.com (R.M. Araújo), fabiasoares@hotmail.com (F.C. da Silva Soares), maria.ribezeira@gmail.com (M.J.R. Bezerra), saviooliveira@gmail.com (S.A.V. de Oliveira), leck04@gmail.com (A.J. de Melo Silva), s.montenegro@globo.com (S.T. Montenegro), robwerk@cpqam.fiocruz.br (R.P. Werkhauser), carlos.fiocruz@gmail.com (C.G.R. da Silva), adrianavieiragomes@gmail.com (A.V. Gomes), clarice@cpqam.fiocruz.br (C.N.L. de Moraes), silvia@cpqam.fiocruz.br (S.M.L. Montenegro).

<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.04.001>

Received 11 October 2017; Received in revised form 22 January 2018; Accepted 3 April 2018
1043-4666/ © 2018 Published by Elsevier Ltd.

Please cite this article as: Do Carmo Vasconcelos de Carvalho, V., Cytokine (2018), <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.04.001>

APÊNDICE B – ARTIGO PUBLICADO DURANTE O DOUTORADO (2018)

Journal: PLOS One, impact factor (JCR): 3.752, [10.1371/journal.pone.0204679](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204679)



RESEARCH ARTICLE

Variation sites at the *HLA-G* 3' untranslated region confer differential susceptibility to HIV/HPV co-infection and aneuploidy in cervical cell

Fernanda Silva Medeiros¹, Albert Eduardo Silva Martins¹, Renan Garcia Gomes¹, Sávio Augusto Vieira de Oliveira¹, Stefan Welkovic², Magda Maruza³, Maria Luiza Bezerra Menezes⁴, Ricardo Arraes de Alencar Ximenes⁵, George Tadeu Nunes Diniz⁶, Eduardo Antônio Donadi⁷, Norma Lucena-Silva^{1,8*}

1 Department of Immunology, Laboratory of Immunogenetics, Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, Brazil, **2** Integrated Health Centre Amaury de Medeiros (CISAM), University of Pernambuco, Recife, Brazil, **3** Hospital Correia Picanço, Health Secretariat of Pernambuco, Recife, Brazil, **4** Maternal and Child Department of the Faculty of Medical Sciences—University of Pernambuco (UPE), Recife, Brazil, **5** Department of Tropical Medicine, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, Brazil, **6** Department of Public Health, Laboratory Computational Methods, Aggeu Magalhães Institute, Recife, Brazil, **7** Department of Medicine, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, Brazil, **8** Pediatric Oncology Service, IMIP Hospital, Recife, Brazil

* norma.lucena@hotmail.com



OPEN ACCESS

Citation: Medeiros FS, Martins AES, Gomes RG, de Oliveira SAV, Welkovic S, Maruza M, et al. (2018) Variation sites at the *HLA-G* 3' untranslated region confer differential susceptibility to HIV/HPV co-infection and aneuploidy in cervical cell. *PLoS ONE* 13(10): e0204679. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204679>

Editor: Maria Lina Tornesello, Istituto Nazionale Tumori IRCCS Fondazione Pascale, ITALY

Received: March 9, 2018

Accepted: September 12, 2018

Published: October 2, 2018

Copyright: © 2018 Medeiros et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: Data are available from the Laboratory of Immunogenetics, Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, Brazil for researchers who meet the criteria for access to confidential data. For more information, contact the head of The Aggeu Magalhães Institutional Ethics Committee, Dr. Janaina Campos de Miranda (e-mail: janaina@cpqam.fiocruz.br).

Abstract

Post-transcriptional regulatory elements associated with transcript degradation or transcript instability have been described at the 3' untranslated region (3'UTR) of the *HLA-G* gene. Considering that HPV infection and aneuploidy, which causes gene instability, are associated with cervical cell malignancy, as well as the fact that HIV infection and *HLA-G* may modulate the immune response, the present study aimed to compare the frequencies of *HLA-G* 3'UTR polymorphic sites (14-base pair *insertion/deletion*, +3142C/G, and +3187A/G) between 226 HIV⁺ women co-infected (n = 82) or not with HPV (n = 144) and 138 healthy women. We also evaluated the relationship between those *HLA-G* 3'UTR variants and aneuploidy in cervical cells. HPV types and *HLA-G* polymorphisms were determined by PCR and sequencing of cervical samples DNA. Aneuploidy in cervical cell was measured by flow cytometry. The *HLA-G* 3'UTR 14-bp *ins/del* was not associated with either HIV nor HIV/HPV co-infection. The +3142G allele ($p = 0.049$) and +3142GG genotype ($p = 0.047$) were overrepresented in all HIV-infected women. On the other hand, the +3187G allele ($p = 0.028$) and the +3187GG genotype ($p = 0.026$) predominated among healthy women. The +3142G ($p = 0.023$) and +3187A ($p = 0.003$) alleles were associated with predisposition to HIV infection, irrespective of the presence or not of HIV/HPV co-infection. The diplotype formed by the combination of the +3142CX (CC or CG) and +3187AA genotype conferred the highest risk for aneuploidy in cervical cell induced by HPV. The *HLA-G* 3'UTR +3142 and +3187 variants conferred distinct susceptibility to HIV infection and aneuploidy.

APÊNDICE C – ARTIGO PUBLICADO DURANTE O DOUTORADO (2019)

Journal: World journal of hepatology, impact factor (JCR): 0.69, [10.4254/wjh.v11.i1.109](https://doi.org/10.4254/wjh.v11.i1.109)



Submit a Manuscript: <https://www.f6publishing.com>

World J Hepatol 2019 January 27; 11(1): 109-118

DOI: [10.4254/wjh.v11.i1.109](https://doi.org/10.4254/wjh.v11.i1.109)

ISSN 1948-5182 (online)

ORIGINAL ARTICLE

Observational Study

High prevalence of occult hepatitis C infection in predialysis patients

Luís Henrique Bezerra Cavalcanti Sette, Edmundo Pessoa de Almeida Lopes,
Nathália Campello Guedes dos Anjos, Lucila Maria Valente, Sávio Augusto Vieira de Oliveira,
Norma Lucena-Silva

ORCID number: Luis Henrique Bezerra Cavalcanti Sette (0000-0002-1137-6412); Edmundo Pessoa de Almeida Lopes (0000-0002-3470-1564); Nathalia Campello Guedes dos Anjos (0000-0003-1574-5059); Lucila Maria Valente (0000-0003-2908-4212); Sávio Augusto Vieira de Oliveira (0000-0002-4320-4789); Norma Lucena-Silva (0000-0002-6140-1794).

Author contributions: Sette LHBC conceived of the presented idea, designed the report, collected and analyzed the clinical data, and wrote the paper; Lopes EPA conceived of the presented idea, designed the report, analyzed the data and wrote the paper; Guedes dos Anjos NC designed the report and collected the clinical data; Valente LM conceived of the presented idea, and analyzed the data; Vieira de Oliveira SA performed the biochemical and PCR testing; Lucena-Silva N conceived of the presented idea, performed the biochemical and PCR testing, analyzed the data, and wrote the paper.

Supported by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), No. 429736-2016/9.

Institutional review board statement: The Federal University of Pernambuco Institutional Review Board provided approval for this study (IRB No. 50121315.3.0000.5208).

Informed consent statement: Written informed consent was given by each study participant.

Luís Henrique Bezerra Cavalcanti Sette, Nathália Campello Guedes dos Anjos, Lucila Maria Valente, Nephrology-Department of Clinical Medicine, Federal University of Pernambuco, Pernambuco 50670-901, Brazil

Edmundo Pessoa de Almeida Lopes, Gastroenterology-Department of Clinical Medicine, Federal University of Pernambuco, Pernambuco 50670-900, Brazil

Sávio Augusto Vieira de Oliveira, Norma Lucena-Silva, Laboratory of Immunogenetics of the Aggeu Magalhães Institute - Fiocruz Pernambuco, Pernambuco 50670-420, Brazil

Corresponding author: Luis Henrique Bezerra Cavalcanti Sette, MD, PhD, Research Assistant Professor, Nephrology-Department of Clinical Medicine, Federal University of Pernambuco, 1235 Moraes Rego avenue, Recife, Pernambuco 50670-901, Brazil. luis.sette@ufpe.br
Telephone: +55-819-9747777
Fax: +55-812-1263733

Abstract

BACKGROUND

Occult hepatitis C virus (HCV) infection (OCI) may be associated with extrahepatic diseases and it is known that the patients with chronic kidney disease (CKD) who are on hemodialysis (HD) present a higher prevalence of this type of infection than the general population, with a worse clinical outcome. However, there are no data in the literature to assess the presence of OCI in patients prior to the initiation of renal replacement therapy (RRT). Therefore, this study aimed to evaluate the occurrence and epidemiological aspects of OCI in patients with Predialysis CKD. We hypothesize that this infection could occur before RRT initiation.

AIM

To research the status in predialysis patients when HD patients have high prevalence of OCI.

METHODS

A cross-sectional study was conducted between 2015 and 2017. Adults with creatinine clearance < 60 mL/min 1.73 m² (predialysis patients) were recruited to the study. Pregnant and postpartum women, patients with glomerulopathies, and patients showing positivity for serological markers of hepatitis B virus (HBV), HCV or human immunodeficiency virus infection were excluded. Patients were diagnosed with OCI according to test results of anti-HCV antibody negativity and HCV RNA positivity in either ultracentrifuged serum or, if serum-

APÊNDICE D – ARTIGO PUBLICADO DURANTE O DOUTORADO (2022)

Journal: Frontiers in Genetics, impact factor (JCR): 4.77, doi:10.3389/fgene.2022.871972



Differentially Expressed Bone Marrow microRNAs Are Associated With Soluble HLA-G Bone Marrow Levels in Childhood Leukemia

Renata Santos Almeida^{1†}, Thailany Thays Gomes^{1†}, Felipe Souza Araújo¹, Sávio Augusto Vieira de Oliveira¹, Jair Figueredo Santos¹, Eduardo Antônio Donadi² and Norma Lucena-Silva^{1,3*}

¹Laboratory of Immunogenetics, Department of Immunology, Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Recife, Brazil, ²Clinical Immunology Division, Department of Medicine, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, Brazil, ³Laboratory of Molecular Biology, Pediatric Oncology Service, IMIP Hospital, Recife, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Ticiane DJ Farias,
University of Colorado, United States

Reviewed by:

Vera Rebmann,
University of Duisburg-Essen,
Germany
Sara Alves,
Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno
Príncipe, Brazil
Francesco Puppo,
University of Genoa, Italy

*Correspondence:

Norma Lucena-Silva
norma.silva@fiocruz.br

[†]These authors have contributed
equally to this work and share first
authorship

Specialty section:

This article was submitted to
RNA,
a section of the journal
Frontiers in Genetics

Received: 08 February 2022

Accepted: 15 April 2022

Published: 14 June 2022

Citation:

Almeida RS, Gomes TT, Araújo FS,
Oliveira SAVd, Santos JF, Donadi EA
and Lucena-Silva N (2022) Differentially
Expressed Bone Marrow microRNAs
Are Associated With Soluble HLA-G
Bone Marrow Levels in
Childhood Leukemia.
Front. Genet. 13:871972.
doi: 10.3389/fgene.2022.871972

HLA-G is a nonclassical histocompatibility class I molecule that plays a role in immune vigilance in cancer and infectious diseases. We previously reported that highly soluble HLA-G (sHLA-G) levels in the bone marrow were associated with a high blood cell count in T-acute lymphoblastic leukemia, a marker associated with a poor prognosis. To understand the posttranscriptional HLA-G gene regulation in leukemia, we evaluated the bone marrow microRNA profile associated with the HLA-G bone marrow mRNA expression and sHLA-G bone marrow levels in children exhibiting acute leukemia (B-ALL, T-ALL, and AML) using massively parallel sequencing. Ten differentially expressed miRNAs were associated with high sHLA-G bone marrow levels, and four of them (hsa-miR-4516, hsa-miR-486-5p, hsa-miR-4488, and hsa-miR-5096) targeted HLA-G, acting at distinct HLA-G gene segments. For qPCR validation, these miRNA expression levels (ΔCt) were correlated with HLA-G5 and RREB1 mRNA expressions and sHLA-G bone marrow levels according to the leukemia subtype. The hsa-miR-4488 and hsa-miR-5096 expression levels were lower in B-ALL than in AML, while that of hsa-miR-486-5p was lower in T-ALL than in AML. In T-ALL, hsa-miR-5096 correlated positively with HLA-G5 and negatively with sHLA-G. In addition, hsa-miR-4516 correlated negatively with sHLA-G levels. In AML, hsa-miR-4516 and hsa-miR-4488 correlated positively with HLA-G5 mRNA, but the HLA-G5 negatively correlated with sHLA-G. Our findings highlight the need to validate the findings of massively parallel sequencing since the experiment generally uses few individuals, and the same type of leukemia can be molecularly quite variable. We

Abbreviations: 3'UTR, 3' untranslated region; 5' UTR, 5' untranslated region; ALL, acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myeloid leukemia; B-ALL, acute lymphoblastic leukemia of B cells; cDNA, complementary DNA; CRE, cAMP response element-binding protein; Ct, cycle threshold; DE-miRNA, differentially expressed microRNA; FDR, false discovery rate; HLA-G, human leukocyte antigen G; HRE, hypoxia responsive element; ILT2, Ig-like transcript 2; ILT4, Ig-like transcript 4; ISRE, interferon-stimulated response element; KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; KIR2DL4, killer cell immunoglobulin-like receptor, two Ig domains and long cytoplasmic tail 4; LILRB1, leukocyte immunoglobulin-like receptor B1; LILRB2, leukocyte immunoglobulin-like receptor B2; MHC, major histocompatibility complex; miRNA/miR, microRNA; mRNA, messenger RNA; NK, natural killer cells; PCR, polymerase chain reaction; RREB-1, Ras-responsive element-binding protein 1; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; sHLA-G, soluble human leukocyte antigen G; T CD8, leukocyte T cluster differentiation 8; T-ALL, acute lymphoblastic leukemia of T cells.

APÊNDICE E – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO:

Este termo de consentimento livre e esclarecido é documento integrante dos seguintes projetos:

- 1- **Nome da Pesquisa:** *Contribuição de moléculas imunoregulatórias no câncer de colo uterino: polimorfismo gênico, perfil de expressão de RNAm, regulação por microRNAs, e perfil da resposta imunitária frente a infecção por variantes genéticas de HPV.*
Registro no comitê de ética: CAAE - 51111115.9.0000.5190.
- 2- **Nome da Pesquisa:** *Biossensor para diagnóstico de infecção cervical por HPV: ferramenta para rastreamento e seguimento de mulheres sob risco de desenvolver câncer de colo,*
Registro no comitê de ética: CAAE – 23698513.0.0000.5190.

Estes projetos são desdobramentos de uma pesquisa previamente realizada e intitulada *Evolução clínico-epidemiológica da infecção cervical pelo HPV em mulheres co-infectadas com o HIV atendidas em centros de referência para HIV/AIDS em Recife-PE*, com aprovação em comitê de ética sob registro CAAE – 0011.0.250.000-05.

Pesquisador responsável: Profa. Dra. Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva
Contato pesquisador responsável: (81) 2101-2618

A Sra está sendo convidada para participar de estudo que envolverá mulheres a partir de 18 anos com o objetivo de estudar as alterações que ocorrem na mulher com lesão no colo uterino em relação a um grupo de mulheres que não apresentam lesão de colo uterino. É importante que você leia e compreenda totalmente as informações fornecidas. Caso você não entenda alguma parte deste consentimento, pergunte ao seu médico antes de assiná-lo.

Algumas lesões de colo uterino podem evoluir para o câncer, essa evolução é lenta e envolve várias etapas que dependem de fatores diversos que podem acelerar ou retardar essa evolução para o câncer. Alguns fatores são ambientais como hábito de vida e infecções. No caso, de infecção há maior possibilidade de evolução da doença caso ocorra infecção por alguns tipos de vírus papiloma humano. Ainda há fatores relacionados a forma que o corpo reage e combate essa infecção. Esses fatores humanos são determinados pelo nosso organismo, que define o que nosso corpo irá produzir, como e quando. Conhecer como o corpo controla a produção de fatores é importante para que possamos tentar intervir nessas etapas do processo ao câncer, tentando evitá-lo, mas também de contribuir no desenvolvimento de métodos para diagnóstico rápido do câncer e melhorar o tratamento. Nessa pesquisa, inicialmente nós iremos estudar o HPV, faremos o diagnóstico de infecção e, se for positivo, procuraremos identificar fragmentos do vírus que determinem as diferenças na agressividade de alguns tipos do vírus. Nós vamos buscar identificar o que pode contribuir para que algumas pessoas tenham uma maior possibilidade de desenvolver tumor do que outras, para isso vamos comparar o material genético de quem tem lesão e não tem lesão para estudar as diferenças, vamos escolher alguns fatores que agem em etapas diferentes para a produção da resposta de defesa contra o câncer e estudar como e quando a produção desses fatores ocorrem no nosso corpo, e identificar qual a alteração pode estar determinando o desenvolvimento do câncer.

O conhecimento a ser produzido neste estudo pode não lhe trazer benefícios diretos, mas os resultados desta pesquisa podem trazer contribuição para diagnosticar e tratar precocemente a lesão. Entretanto, deixamos claro que nos casos de lesão de colo uterino, nós faremos o diagnóstico de infecção por HPV e identificaremos o tipo viral, e a senhora participante da pesquisa terá acesso ao resultado do exame por meio do seu médico.

Para a realização desta pesquisa, caso concorde em participar, precisamos colher seu sangue (10 mL ou duas colheres de chá). No procedimento de coleta de sangue, os riscos são considerados mínimos, havendo o desconforto da picada da agulha durante a coleta de sangue. Precisamos também de raspado cervical, que será colhido quando a Sra. for fazer seu preventivo com o seu médico e, no caso seja identificado uma lesão no exame preventivo e seja agendado pelo seu médico uma biópsia, precisamos de uma fração do material da lesão e da área sem lesão adjacente obtido durante procedimento cirúrgico realizado pela equipe médica indicada pelo seu médico acompanhante. A necessidade da realização da biópsia para a confirmação do diagnóstico de câncer, e da cirurgia para tratamento foram explicados pelo seu médico, assim como o desconforto do procedimento e possíveis complicações, assim como as precauções que ele tomará para minimizar o desconforto do procedimento.

Os seguintes aspectos lhe são esclarecidos para que você decida sobre sua participação voluntária:

- a.) Esta pesquisa não lhe trará qualquer custo;

- b.) Não haverá nenhuma forma de reembolso em dinheiro, uma vez que sua participação na pesquisa não proporcionará nenhum gasto;
- c.) Você terá a garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados com a pesquisa. Isso poderá ser feito a qualquer momento. Nós temos o compromisso de proporcionar informações atualizadas durante o estudo, ainda que esta possa influenciar a sua vontade de continuar autorizando a sua participação;
- d.) Você terá a liberdade de retirar o seu consentimento (ou seja, se recusar a participar do estudo) a qualquer momento sem que isso lhe traga prejuízo algum ou qualquer tipo de constrangimento;
- e.) Você terá garantida a segurança de que não será identificado e que será mantida a sua privacidade e o caráter confidencial das informações concedidas;
- f.) O sangue será colhido com total responsabilidade e custo dos pesquisadores. A coleta de seu sangue será feita com material descartável, sendo necessário apenas um pequeno furo com agulha em veia do seu braço, por ocasião da coleta de seus exames de rotina; da mesma forma a pesquisa fornecerá frasco com conservante para colocação do raspado cervical e da fração do tumor retirado durante procedimento médico, garantindo a preservação e qualidade do material genético da amostra para a análise.
- g.) O seu sangue e amostra do tumor doado para esta pesquisa poderá:
 - ☐ Ser utilizado na realização de pesquisas de outra natureza **sem** sua autorização;
 - ☐ Ser utilizado na realização de pesquisas de outra natureza **somente com** a sua autorização;
- h.) Os resultados da pesquisa serão apresentados em reuniões científicas (simpósios e congressos) e serão publicados em revistas científicas especializadas, no entanto, seu nome será rigorosamente mantido em sigilo.
- i.) Você terá direito a indenização conforme as leis vigentes no país, caso ocorra dano decorrente de participação na pesquisa;
- j.) Uma via deste documento, devidamente assinada será entregue à senhora.

Abaixo também seguem os dados de contato do pesquisador responsável, caso a senhora tenha alguma dúvida posteriormente. Para esclarecimentos de questões éticas, a senhora também pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do CPqAM-FIOCRUZ pelo telefone (81) 2101-2639 e com os pesquisadores Norma Lucena (81 2101-2618) do CPqAM/FIOCRUZ-PE e do IMIP (81 9 9962-3975), e Maria Luiza Bezerra Menezes (81 3427-3911) do CISAM-UPE. Caso necessite entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do IMIP, o CEP-IMIP está situado à Rua dos Coelho, nº 300, Boa Vista. Diretoria de Pesquisa do IMIP, Prédio Administrativo Orlando Onofre, 1º Andar tel: 2122-4756 – Email: comitedeetica@imip.org.br. O CEP/IMIP funciona de 2ª a 6ª feira, nos seguintes horários: 07:00 às 11:30 h (manhã) e 13:30 às 16:00h (tarde).

Dados do pesquisador responsável:

Nome legível: Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva

Assinatura: _____

Data: _____

Dados do participante (Indivíduos voluntários):

Nome legível: _____

Assinatura: _____

Data: _____

Dados do responsável legal pelo participante ou testemunha (caso aplicável):

Nome legível: _____

Assinatura: _____

Data: _____

ENDEREÇO DAS INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES

CPqAM/FIOCRUZ-PE

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Av. Professor Moraes Rego, s/n – Cidade Universitária, Recife – PE. CEP 50.740-465.

CISAM

Centro Integrado de Saúde Amaury de Medeiros

R. Visconde de Mamanguape, s/n – Encruzilhada, Recife – PE. CEP 52030-010.

IMIP

Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira

R. dos Coelhos, 300 – Boa Vista – Recife – PE. CEP 50070-550.

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



CENTRO DE PESQUISAS
AGGEU MAGALHÃES/



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Contribuição de moléculas imunoregulatórias no câncer de colo uterino: polimorfismo gênico, perfil de expressão de RNAm, regulação por microRNAs, e perfil da resposta imunitária frente a infecção por variantes genéticas de HPV.

Pesquisador: Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 51111115.9.0000.5190

Instituição Proponente: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.504.864

Apresentação do Projeto:

Título do Projeto:

Contribuição de moléculas imunoregulatórias no câncer de colo uterino: polimorfismo gênico, perfil de expressão de RNAm, regulação por microRNAs, e perfil da resposta imunitária frente a infecção por variantes genéticas de HPV.

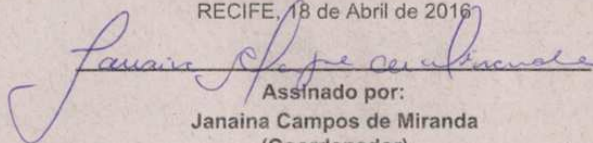
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 18 de Abril de 2016



Assinado por:
Janaina Campos de Miranda
(Coordenador)

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº

Bairro: Cidade Universitária

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2101-2639

Fax: (81)2101-2639

CEP: 50.670-420

E-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br