



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

RODRIGO VILAR MARQUES

**INVESTIGAÇÃO DA INTEGRAÇÃO GENÔMICA (MÉTODO IntG) PARA
DETERMINAÇÃO DIRETA DOS PADRÕES DOS STATUS FÍSICO DO GENOMA
DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM RELAÇÃO AO GENOMA DAS CÉLULAS
INFECTADAS.**

João Pessoa
2024

RODRIGO VILAR MARQUES

**INVESTIGAÇÃO DA INTEGRAÇÃO GENÔMICA (MÉTODO IntG) PARA
DETERMINAÇÃO DIRETA DOS PADRÕES DOS STATUS FÍSICO DO GENOMA
DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM RELAÇÃO AO GENOMA DAS CÉLULAS
INFECTADAS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

Orientador: Prof. Dr. Eleonidas de Moura Lima

João Pessoa - PB

2024

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

M357i Marques, Rodrigo Vilar.

Investigação da integração genômica (método IntG) para determinação direta dos padrões dos status físico do genoma do papilomavirus humano em relação ao genoma das células infectadas / Rodrigo Vilar Marques. - João Pessoa, 2024.
46 f. : il.

Orientação: Eleonidas de Moura Lima.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. Biologia molecular. 2. Genoma do HPV. 3. Papilomavirus humano. 4. Câncer de colo do útero. 5. Integração genômica. I. Lima, Eleonidas de Moura. II. Título.

UFPB/BC

CDU 577.2(043)

RODRIGO VILAR MARQUES

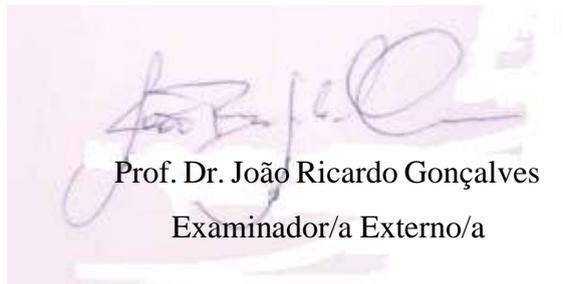
Dissertação de Mestrado avaliada em 29/04/2024

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Eleonidas de Moura Lima

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular– Universidade Federal da
Paraíba
Orientador



Prof. Dr. João Ricardo Gonçalves
Examinador/a Externo/a



Prof. Dr. Leonardo Ferreira Soares
Examinador/a Interno/a

Prof/a. Dr. Augusto Cezar Vasconcelos
Suplente

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a meu amado pai, Cleto de Souza Marques (*in memoriam*) que me incentivou a carreira docente, e cuja presença foi essencial na minha vida, mas que, já não se encontra presente para compartilhar ao meu lado essa conquista. Aqui estão os resultados dos seus esforços. Com muita gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a Nossa Senhora pelo dom da vida, pelos livramentos e por me fornecerem forças para continuar seguindo em frente mesmo em meio a tantas dificuldades.

Agradeço a minha amada mãe, que em inúmeras vezes esqueceu de si para se dedicar a mim, e que hoje é a razão da minha vida.

Agradeço a meu falecido pai, que sempre teve orgulho de mim e sempre zelou pela minha felicidade, que me incentivou a participar da seleção do Mestrado, mas que partiu, antes de poder dividir ao meu lado esse momento.

Agradeço a meu querido orientador e amigo, o professor Dr. Eleonidas Moura pela confiança, pelos ensinamentos, pela companhia, e por ter me encontrado e me resgatado em um momento de desilusão profissional, por ter me dado oportunidades e ter enxergado em mim valores.

Agradeço a Nilson Nunes, pela sua importância na minha trajetória, pela preocupação comigo, por estar a meu lado sempre me aconselhando, me apoiando ao longo dos caminhos que percorro e por me ajudar a me tornar uma pessoa melhor.

Agradeço aos demais colegas discentes, em especial a Milla Nunes, e a equipe do programa pelos ensinamentos e apoio prestados.

Agradeço ao meu querido companheiro e cão Atreus, também chamado carinhosamente por “Zé” pela companhia e por se fazer presente nos meus momentos de ausência em casa, dedicados ao meu trabalho e estudos.

RESUMO

A imortalização e o poder de transformação das células neoplásicas se devem aos oncogenes virais E6 e E7, que geram oncoproteínas capazes de mediar estímulos mitogênicos e antiapoptóticos através de sua interação com proteínas reguladoras do ciclo celular. O genoma do HPV é mantido na forma epissomal no estágio inicial das lesões displásicas de baixo grau, porém, nas células pré-cancerosas avançadas e na maioria dos carcinomas, ele está integrado no DNA da célula infectada. Essa integração causa o aumento da expressão dos oncogenes E6 e E7, promovendo vantagens seletiva para o crescimento tumoral. A presente tese de dissertação se refere às áreas de biologia molecular e diagnóstico molecular *in vitro*. Consiste na determinação direta dos status físico do genoma do HPV em relação ao genoma das células infectadas, que podem desenvolver processos neoplásicos, a exemplo do Câncer do Colo do Útero – CCU. A metodologia utilizada no trabalho, denominada IntG-HPV, foi validada em amostras de DNA das linhagens celulares de CCU *SiHa*, *Ca Ski* e das células de descamação do colo uterino com lesões de baixo grau e positivas para HPV-16, por reação de PCR Multiplex. A análise comparativa pelo teste exato de Fisher apresentou diferença estatisticamente significativa valor-p > 0,05. Assim, os resultados sugerem a presença do padrão epissomal nas referidas células de descamação, padrão misto na linhagem celular *Ca Ski* e padrão integrado na linhagem celular *SiHa*. Portanto, o método IntG-HPV inova na análise direta da integração do genoma do HPV ao genoma da célula infectada, sendo teste molecular de diagnóstico e prognóstico para o rastreamento e a prevenção do CCU.

Palavras-chave: HPV, integração, câncer de colo do útero.

ABSTRACT

The immortalization and transformation power of neoplastic cells are due to the viral oncogenes E6 and E7, which generate oncoproteins capable of mediating mitogenic and antiapoptotic stimuli through their interaction with cell cycle regulatory proteins. The HPV genome is maintained in episomal form in the early stage of low-grade dysplastic lesions, however, in advanced precancerous cells and most carcinomas, it is integrated into the DNA of the infected cell. This integration causes increased expression of the E6 and E7 oncogenes, promoting selective advantages for tumor growth. This dissertation thesis refers to the areas of molecular biology and in vitro molecular diagnostics. It consists of directly determining the physical status of the HPV genome in relation to the genome of infected cells, which can develop neoplastic processes, such as Cervical Cancer – CC. The methodology used in the work, called IntG-HPV, was validated on DNA samples from the CCU cell lines SiHa, Ca Ski and uterine cervix desquamation cells with low-grade lesions positive for HPV-16, by PCR reaction. Multiplex. Comparative analysis using Fisher's exact test showed a statistically significant difference $p\text{-value} > 0.05$. Thus, the results suggest the presence of an episomal pattern in the aforementioned desquamation cells, a mixed pattern in the Ca Ski cell line and an integrated pattern in the SiHa cell line. Therefore, the IntG-HPV method innovates in the direct analysis of the integration of the HPV genome into the genome of the infected cell, being a molecular diagnostic and prognostic test for screening and prevention of CC.

Keywords: HPV, integration, cervical cancer.

LISTA DE ABREVIATURAS

ng	Nanograma
μ l	Micro litro
μ M	Micromolar
CCU	Câncer do colo do útero
CDKs	Cinases dependentes de ciclina
CISH	Hibridização in situ cromogênica
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxinucleotídeo trifosfato
E	Genes de expressão precoce do HPV
HPV	Papilomavírus Humano
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INPI	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
ISH	Hibridização in situ
JEC	Junção Escamocolunar
L	Genes de expressão tardia do HPV
LCR	Longa região de controle do HPV
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mM	Milimolar
°C	Graus Celsius
ORF	Região de leitura aberta
PAGE	Eletroforese em gel de Poliacrilamida
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pM	Picomolar
pRb	Proteína do retinoblastoma
qPCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
RTKs	Receptores tirosina-cinase
SUS	Sistema Único de Saúde

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração da representação dos tipos celulares presentes no colo uterino e suas respectivas topografias.....	15
Figura 2: As quatro camadas bem definidas do epitélio escamoso estratificado da ectocérvice, pela histologia, coloração HE, 100x.....	16
Figura 3: Células basais: As imagens (a) e (b) representam células basais, que correspondem as menores células epiteliais.....	16
Figura 4: Células parabasais.....	17
Figura 5: Células intermediárias: As imagens (a) e (b) representam células intermediárias.....	18
Figura 6: Células superficiais: As imagens (a) e (b) representam células superficiais.....	18
Figura 7: Ilustração da representação das diferentes etapas de metaplasia escamosa que ocorrem na área de ectopia.....	19
Figura 8: Ilustração da representação da sinalização celular mediado por receptor tirosina-cinase via proteína Ras.....	21
Figura 9: Ativação do complexo MAP-Cinase.....	22
Figura 10: Genoma do HPV.....	25
Figura 11: Ciclo de vida do HPV.....	27
Figura 12: Ilustração representativa da evolução das lesões pré-cancerosas.....	28
Figura 13: Ilustração representativa do estado físico do HPV correlacionando com a evolução das lesões pré-cancerosas e o Câncer.....	29
Figura 14: Ilustração representativa da integração do DNA do HPV.....	30
Figura 15: O papel da p53 e da pRb.....	31
Figura 16: Os dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, excetuando o câncer de pele não melanoma.....	32
Figura 17: Representação do genoma do HPV demonstrando as regiões de pontos de quebra possíveis (PPQ1 e PPQ2) nas quais os primers foram desenhados.....	35
Figura 18: Análise em gel de agarose dos amplicons gerados pelo método IntG-HPV.....	38
Figura 19: Análise em gel de agarose dos amplicons gerados pelo método IntG-HPV.....	40
Figura 20: Análise em gel de agarose dos amplicons gerados pelo método IntG-HPV.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Iniciadores específicos para subtipos de HPV para amplificação pelo método HPV-IntG	35
----------	---	----

SUMÁRIO

FICHA CATALOGRÁFICA	4
DEDICATÓRIA	5
AGRADECIMENTOS	6
RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE ABREVIATURAS	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3. REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO COLO UTERINO	15
3.2 SINALIZAÇÃO CELULAR	19
3.3 CÂNCER.....	23
3.3.1 Câncer do colo do útero	23
3.4 EPIDEMIOLOGIA.....	31
4. METODOLOGIA	32
4.1 AMOSTRAGEM.....	32
4.2 EXTRAÇÃO DO DNA	33
4.3 AMPLIFICAÇÃO POR PCR - MULTIPLEX	34
4.3.1 PCR - MULTIPLEX E SUAS CONDIÇÕES.....	35
4.4 ANÁLISE	36
4.5 VALIDAÇÃO	36
5. RESULTADOS	36
6. DISCUSSÃO	41
7. CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS	46

1. INTRODUÇÃO

Os resultados preliminares do primeiro teste nacional do Censo Demográfico 2022 realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) confirma que há mais mulheres (51,5%) que homens (48,5%) na população brasileira. Pesquisa realizada pelo Ministério da Saúde em parceria com o IBGE referente ao ano de 2019, constatou que mais de 71% da população brasileira, ou seja, mais de 150 milhões de pessoas dependem do Sistema Único de Saúde (SUS).

As neoplasias que afetam a população feminina, representadas principalmente pelo câncer de mama e pelo câncer do colo do útero geram grande impacto na saúde da mulher, estando relacionado a fatores sociais e econômicos. A maioria dos casos de câncer do colo uterino ocorrem em países subdesenvolvidos, possuindo como principal fator de risco a presença persistente do vírus HPV de alto risco, adquirido por meio do contato sexual. De acordo com a capacidade de induzir o processo carcinogênico, os HPVs são divididos em dois grupos: baixo risco oncogênico, representados principalmente pelos tipos 6 e 11, e em alto risco oncogênico, representados principalmente pelos tipos 16 e 18.

Estudos demonstram que a integração do DNA do HPV no genoma do hospedeiro é um processo importante para o desenvolvimento do câncer do colo do útero, para tanto é necessário uma quebra pontual em uma região do DNA viral responsável pelo controle dos oncogenes E6 e E7. Estes se tornar superexpressos e com isso, interferem nas proteínas reguladoras do ciclo celular conduzindo à transformação, imortalização celular e posteriormente, ao câncer.

Os gastos que envolvem o diagnóstico de câncer no Brasil e a demanda de tratamento aumentaram exponencialmente, no entanto, são inferiores ao que seria necessário para o atendimento das necessidades, fato este demonstrado pelo aumento dos gastos apenas com tratamento de R\$ 470 milhões para R\$ 3,3 bilhões, representando principalmente gastos relacionados a quimioterapia. Esse fato dá-se principalmente pelo câncer ser detectado tardiamente e necessitarem de medicamentos e tecnologias caras. Segundo pesquisa financiada pelo Tribunal de Contas da União em 2010, 60,5% dos casos de câncer são diagnosticados nos estágios mais avançados (estágios 3 e 4), acarretando em custos de tratamento 60% e 80% maiores que nos estágios iniciais (MEDICI, 2018).

O HPV é um problema de saúde pública que precisa ser enfrentado utilizando técnicas que visem detectar precocemente a presença do DNA viral, afastando o índice de resultados falso-negativos provenientes da limitação do exame citológico de rastreamento, com isso,

reduzindo as taxas de mortalidade e proporcionando melhor qualidade de vida a população feminina que depende do SUS como única forma de acesso a saúde.

O exame de Colpocitologia oncótica (Papanicolau) é utilizado no Brasil como método de triagem para o rastreamento do câncer do colo uterino e de suas lesões precursoras, sendo ofertado em toda a rede pública de forma gratuita pelo SUS. Apesar da sua alta especificidade, o exame citológico apresenta limitações em sua sensibilidade, o que nos leva a questionar sobre a utilização dessa técnica como única forma de triagem na detecção das lesões causadas pelo HPV, visto que, o câncer do colo uterino se enquadra entre as principais causas de morte por câncer em mulheres de países em desenvolvimento. Diante desse exposto surgiu a necessidade de se desenvolver uma nova ferramenta diagnóstica que possibilitasse a avaliação direta do status físico do genoma do HPV em relação a célula infectada através de uma tecnologia nacional que contribuirá na rotina diagnóstica e na pesquisa clínica.

Atendendo à resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares, que trata das normas para pesquisa envolvendo seres humanos e armazenamento de material biológico, esta pesquisa foi apreciada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Saúde do Estado da Paraíba sob o CAAE: 71772723.8.0000.5186. Essa dissertação de mestrado faz parte do projeto “Análise Comparativa entre o Método Papanicolau e a plataforma molecular DGI-gHPV (Detecção, Genotipagem e análise de integração do genoma do HPV) para rastreamento, prevenção do Câncer do colo do útero no Estado da Paraíba.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Utilizar técnica direta para confirmação do processo de integração viral ao DNA da célula hospedeira

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

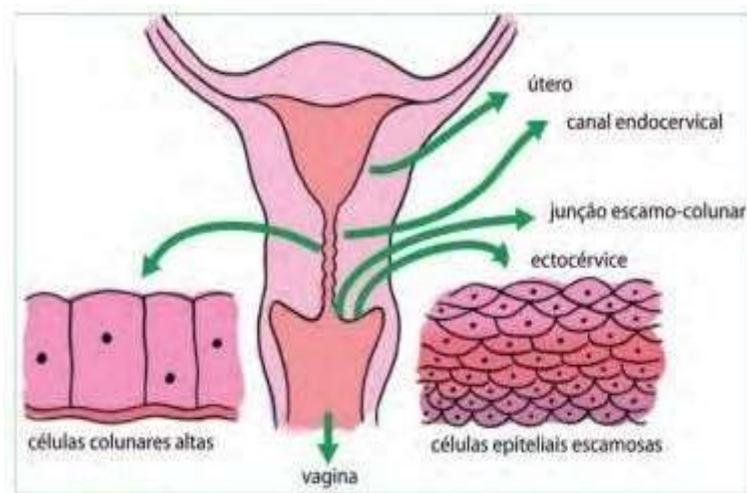
- Realizar genotipagem do HPV;
- Analisar a integração genômica;
- Utilizar de diagnóstico molecular como método preventivo e de prognóstico;

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DO COLO UTERINO

O colo do útero é formado por uma região chamada de ectocérvice e uma outra região chamada de endocérvice. A ectocérvice é dividida em 4 camadas: A camada basal, a camada parabasal, a camada intermediária e a camada superficial. A endocérvice é constituída por um epitélio simples e colunar constituída por células denominadas glandulares endocervicais. Existe uma região de encontro entre esses dois epitélios, chamada de JEC, Junção Escamocolunar (**Figura 1**) (NETO, 2012; BRASIL, 2012).

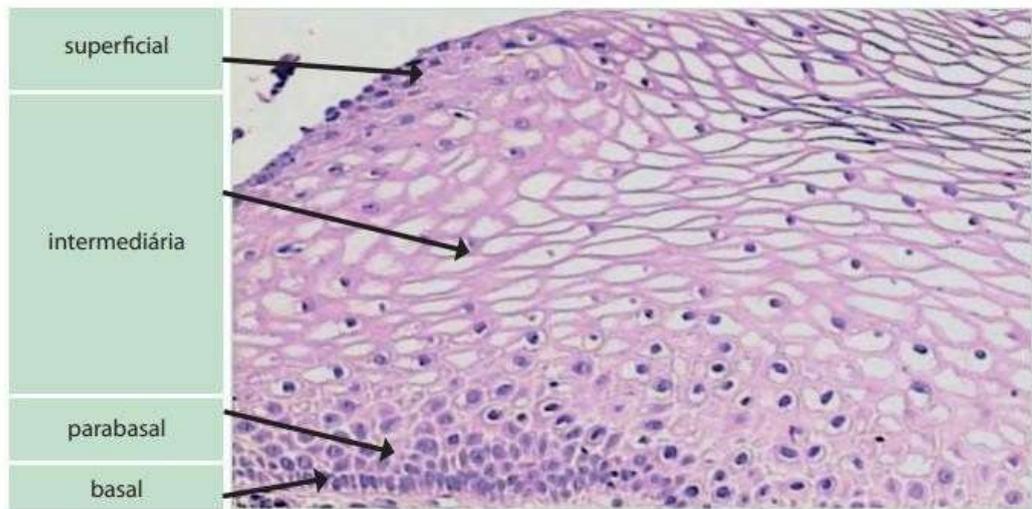
Figura 1: Ilustração da representação dos tipos celulares presentes no colo uterino e suas respectivas topografias.



Fonte: Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/atlas_citopatologia_ginecologica

A camada basal, ou germinativa, é responsável em condições fisiológicas pela regeneração (replicação celular). As outras camadas representam apenas diferentes estágios na maturação das células basais (**Figura 2**). Esse epitélio é influenciado pelos hormônios ovarianos, atingindo a sua máxima maturação sob a ação dos estrógenos. Por outro lado, a deficiência estrogênica, como ocorre na menopausa, leva a sua atrofia (NETO, 2012; BRASIL, 2012).

Figura 2: As quatro camadas bem definidas do epitélio escamoso estratificado da ectocérvice, pela histologia, coloração HE, 100x

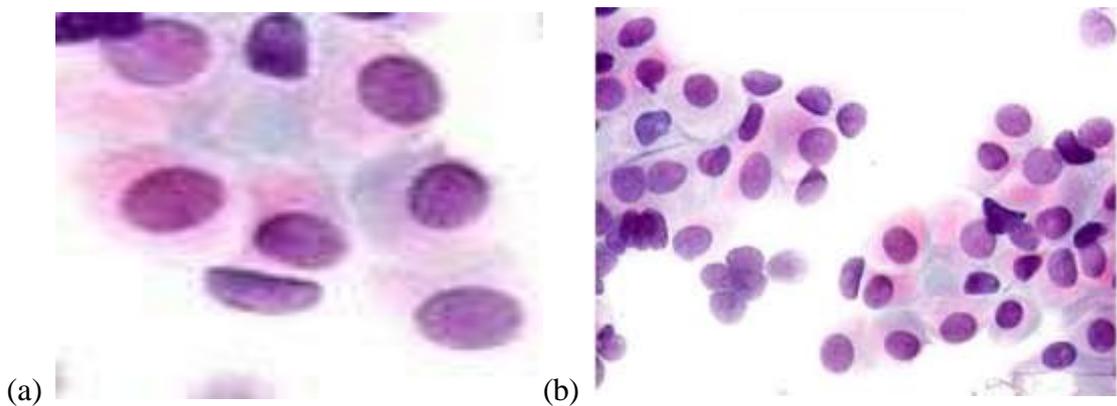


Fonte: Disponível em:

https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/tecnico_citopatologia_caderno_referencia_1.pdf

As células basais (**Figura 3**) são as responsáveis pela renovação da camada epitelial e são as mais profundas células desta camada, apresentando alta atividade mitótica. Na análise citológica observamos essas células morfologicamente por terem forma redondas ou oval, com pouco citoplasma, núcleo redondo e central e se coram de verde ou azul pela coloração de Papanicolau (ARAÚJO, 1999; NETO, 2012; BRASIL, 2012).

Figura 3: As imagens (a) e (b) representam células basais.

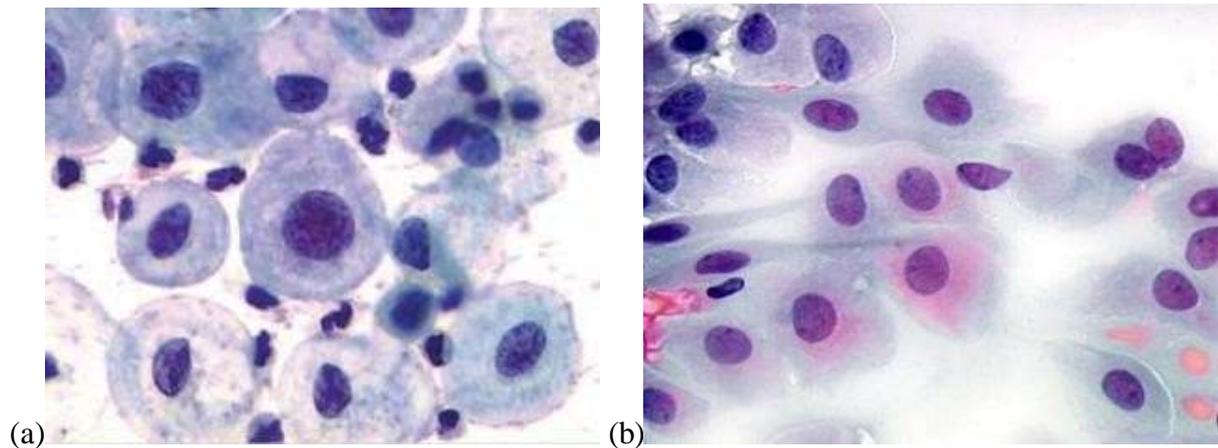


Fonte: Disponível em: <https://screening.iarc.fr/atlascyto.php?lang=4>

Acima da camada basal temos a camada Parabasal (**Figura 4**), que são células maiores que as células basais e com pouca atividade mitótica, sendo um tipo celular muito frequente em lâminas coletadas de pacientes pós-menopausadas ou em pacientes jovens com deficiência

estrogênica, assim como também em crianças e no pós-tratamento com radiação. As características citológicas são semelhantes as células basais, com citoplasma biofílico (ou seja, corado em azul ou verde), núcleo redondo ou oval e ligeiramente menor que o núcleo das células basais (ARAUJO, 1999; NETO, 2012; BRASIL, 2012).

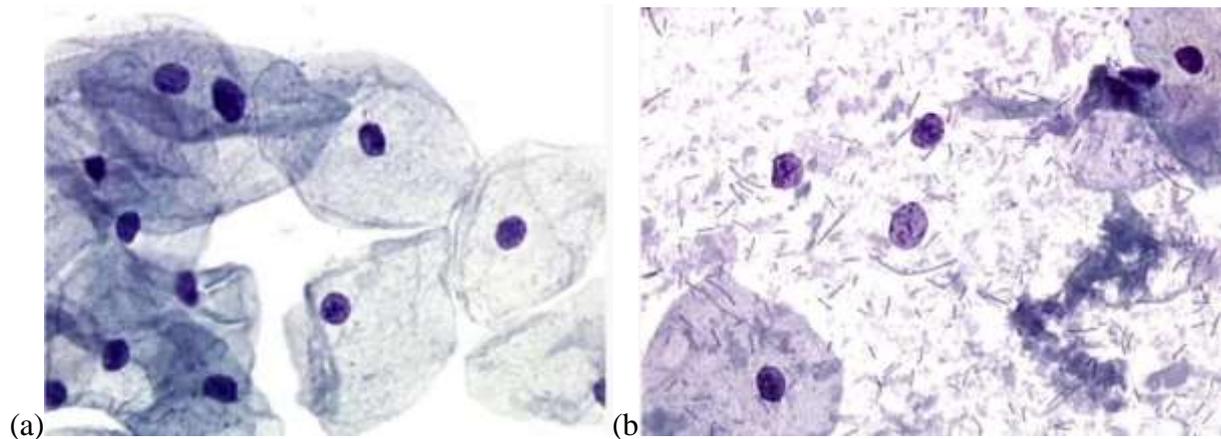
Figura 4: As imagens (a) e (b) representam células parabasais.



Fonte: Disponível em: <https://screening.iarc.fr/atlasicyto.php?lang=4>

As células intermediárias (**Figura 5**) são as células mais comuns nos esfregaços citológicos. Elas exibem citoplasma geralmente basofílico e poligonal. O núcleo da célula intermediária é vesicular, ou seja, redondo ou oval, com cromatina delicada e uniformemente distribuída. A abundância do citoplasma e o núcleo de tamanho menor diferenciam as células intermediárias das parabasais. As células naviculares representam um subtipo das células intermediárias e são um pouco menores, com abundante glicogênio citoplasmático, que pode corar amarelado ou acastanhado. As bordas citoplasmáticas são espessas e o núcleo é excêntrico. Essas células são mais comuns na gravidez, a partir do segundo mês, mas podem ser vistas em outras situações, como na segunda metade do ciclo menstrual e na fase inicial da menopausa. (ARAUJO, 1999; NETO, 2012; BRASIL, 2012).

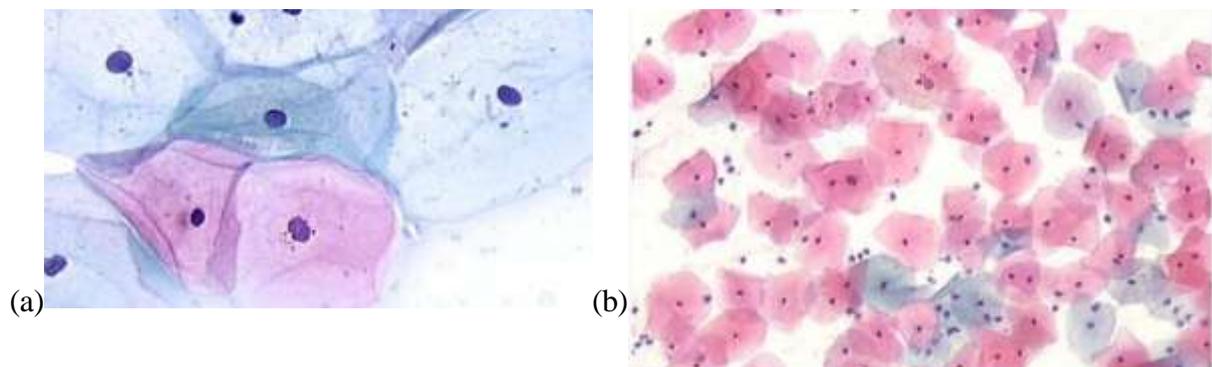
Figura 5: As imagens (a) e (b) representam células intermediárias.



Fonte: Disponível em: <https://screening.iarc.fr/atlascyto.php?lang=4>

E por último, na camada mais externa temos as células superficiais (**Figura 6**). Que são as maiores células normais encontradas nos esfregaços citológicos e representam o último estágio de maturação. Elas são aproximadamente do mesmo tamanho das células intermediárias, também são poligonais, porém o citoplasma é mais aplanado e transparente, geralmente eosinofílico e o núcleo picnótico é caracterizado pela condensação da cromatina (ARAUJO, 1999; NETO, 2012; BRASIL, 2012).

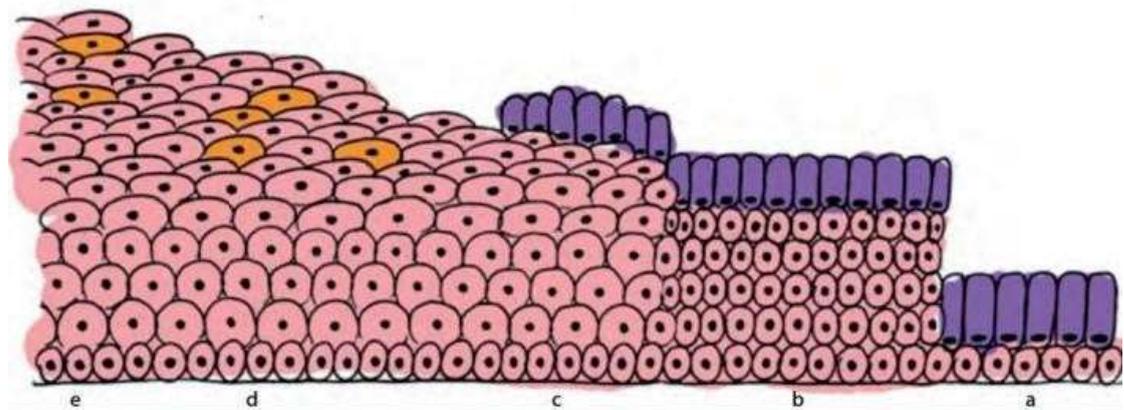
Figura 6: As imagens (a) e (b) representam células superficiais. A propriedade do citoplasma corar em rosa é relacionada a sua afinidade química com a eosina, um corante ácido utilizado na técnica de Papanicolaou. Contudo, a coloração eosinofílica não é específica, e o citoplasma pode assumir as cores azul ou verde. Para diferenciar uma célula intermediária de uma superficial é fundamental a análise da estrutura nuclear.



Fonte: Disponível em: <https://screening.iarc.fr/atlascyto.php?lang=4>

Com o início da produção estrogênica pelos ovários durante a puberdade, o colo uterino cresce e o canal endocervical se alonga e sobrepõe a ectocérvice, um fenômeno fisiológico chamado de Ectopia. O epitélio da endocérvice por não ser estratificado, se torna bastante delicado, e à medida que vai se alongando em direção a ectocérvice, ele passa a encontrar um ambiente mais ácido, devido ao PH vaginal, e as células de reserva que são as responsáveis por manter a renovação tecidual do epitélio colunar, na tentativa de se tornarem mais resistentes sofrem um processo de hiperplasia (aumentam em quantidade) e posteriormente sofrem uma metaplasia e originam as chamadas células metaplásicas, constituindo a chamada Zona de Transformação (Figura 7). Essas células metaplásicas possuem uma alta atividade mitótica, e são alvo frequente das infecções pelo HPV. (ARAUJO, 1999; NETO, 2012; BRASIL, 2012).

Figura 7: Ilustração da representação das diferentes etapas de metaplasia escamosa que ocorrem na área de ectopia: Em (a) observamos uma única camada de células de reserva localizadas abaixo do epitélio simples colunar/cilíndrico. Em (b) tem-se uma hiperplasia das células de reserva ocorrendo abaixo do epitélio colunar endocervical. Na etapa (c) temos o primeiro estágio da metaplasia (metaplasia imatura) começando a diferenciação escamosa, havendo ainda a persistência do epitélio colunar. As representações (d) e (e) demonstram o amadurecimento do epitélio metaplásico onde as células colunares se tornam ausentes e o epitélio se torna totalmente escamoso.



Fonte: Disponível em: https://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/atlas_citopatologia_ginecologica

3.2 SINALIZAÇÃO CELULAR

As células monitoram tanto o seu ambiente interno como externo e respondem a essas mudanças com o auxílio de diversas proteínas produtoras de sinais que atuam na comunicação da sinalização celular. A recepção dos sinais depende de proteínas receptoras

que estão geralmente localizadas na superfície das células, mas também as encontramos no interior das células. Quando uma molécula de sinalização se liga ao seu receptor ocorre sua ativação, com isso é ativada uma ou mais vias de sinalização intracelular com o objetivo de alterar o comportamento da célula (ALBERTS, 2017).

Independente da natureza do sinal, a célula-alvo responde por meio de um receptor, onde a molécula de sinalização se liga iniciando uma resposta na célula-alvo. Esse receptor tem um sítio de ligação com uma estrutura complexa justamente para reconhecer com alta especificidade a molécula de sinalização, evitando que outra molécula se ligue de forma inespecífica e gere uma resposta inadequada. Na maioria dos casos esses receptores são proteínas transmembrana presentes na superfície celular que ao se ligar a molécula de sinalização ocorre sua ativação e geram uma cascata de sinais intracelulares que alteram o comportamento da célula (SOUZA *et al.*, 2005; ALBERTS, 2017).

Temos três classes principais de proteínas receptoras de superfície celular: Os receptores acoplados a proteína G, os receptores acoplados a canais iônicos e os receptores acoplados a enzimas, sendo principalmente representadas pelas cinases e quando ativadas fosforilam alvos. Esses receptores são proteínas transmembrana que tem seu sítio de interação com o ligante localizado na parte externa da membrana plasmática e na face citoplasmática está ligada a uma enzima ou tem atividade enzimática intrínseca. O receptor mais comum dessa classe é o receptor tirosina-cinase (ALBERTS, 2017).

Quando a molécula de sinalização extracelular se liga no sítio de ligação localizado na face extracelular do receptor isso leva a uma dimerização dos receptores unindo os dois domínios citoplasmáticos da cinase, promovendo a ativação. A dimerização estimula a atividade da cinase permitindo que um domínio fosforile o outro nas tirosinas específicas nos sítios ativos da cinase. A ativação cria sítios de ancoragem para várias proteínas de sinalização intracelular, que agora irão se ligar a um sítio fosforilado no receptor para efetuar a transmissão do sinal (SOUZA *et al.*, 2005; ALBERTS, 2017).

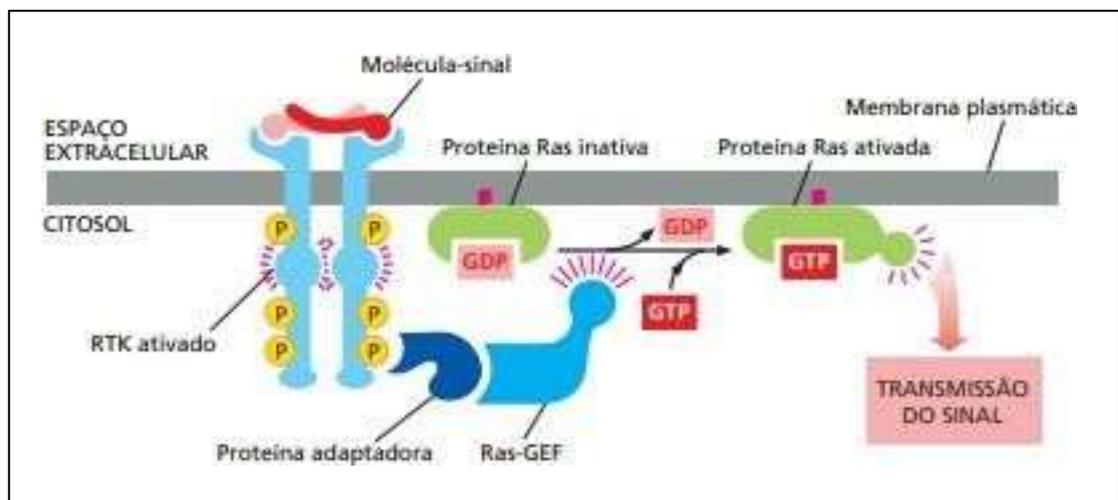
As proteínas de sinalização intracelular que se ligam a essas fosfotirosinas dos receptores tirosina-cinase apesar de terem funções e estruturas diferentes possuem domínios de ligação em comum, como por exemplo os domínios SH2, SH3 e PTB, esses domínios permitem que as proteínas que os possuem se liguem aos receptores tirosina-cinase ativados bem como a muitas outras proteínas sinalizadoras intracelulares (ALBERTS, 2017).

Algumas proteínas de sinalização funcionam como adaptadoras para proteínas que não possuem seus próprios domínios SH2, como é o caso da proteína sinalizadora GTPase Ras que é muito importante na mediação da sinalização intracelular, sendo a responsável por fazer

a mediação da sinalização da maior parte dos receptores tirosina-cinase. A proteína Ras tem a capacidade de propagar o sinal ao longo de várias vias de sinalização diferentes, inclusive na propagação de sinais referentes a proliferação e diferenciação que são enviadas ao núcleo. Dessa forma, se a função da Ras por exemplo for inibida, as respostas de proliferação e diferenciação celular normalmente induzidas pelos receptores tirosina-cinase (RTKs) ativados, não ocorrem (SOUZA *et al.*, 2005; ALBERTS, 2017).

As proteínas Ras ela funciona como o que chamamos de comutadores moleculares (com GTP ligado são ativas e com GDP ligado são inativas). Duas proteínas sinalizadoras regulam a atividade da Ras, que são a Ras-GEF (fator de troca de nucleotídeo de Guanina) que estimula a dissociação do GDP e a ligação ao GTP, ativando a Ras. A outra proteína é a Ras-GTPase que estimula a hidrólise do GTP em GDP, inativando a Ras (SOUZA *et al.*, 2005; ALBERTS, 2017). Esse esquema é exemplificado na **Figura 8**.

Figura 8: Ilustração da representação da sinalização celular mediado por receptor tirosina-cinase via proteína Ras: Após a ativação do receptor (proteína transmembrana), este ativa a proteína Ras através da molécula adaptadora (GRB2) e um fator de troca do nucleotídeo de guanina (Ras-GEF), induzindo Ras a trocar seu GDP por um GTP, propagando o sinal.

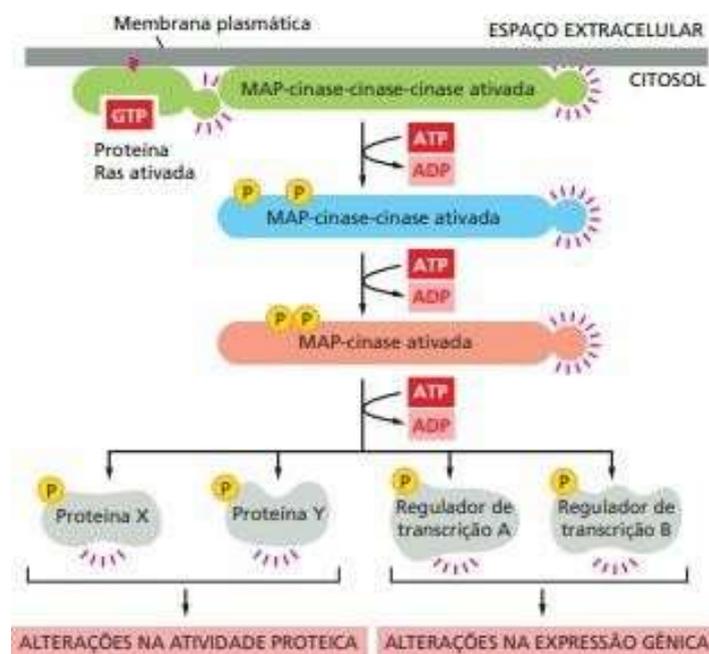


Fonte: Disponível em: ALBERTS B. *et al.*, 2017.

Quando se fala em estímulo da proliferação e da diferenciação celular é necessário que o sinal de curta duração seja convertido em um sinal de longa duração, pois quando se altera a nível de expressão genica é necessário um sinal mais longo, e um dos mecanismos chave utilizados é o módulo MAP-Cinase (**Figura 9**), que é formado por um conjunto de três proteínas-cinase (MAPKKK, MAPKK e MAPK). A última é denominada de MAPK (ou

Map-quinase ou ERK), a penúltima é a MAPKK (Map-quinase-quinase ou MEK) e a primeira é a MAPKKK (Map-quinase-quinase-quinase ou RAF) que é ativada diretamente pela Ras, cujo efeito final pode levar por exemplo a alterações na atividade proteica e alterações a nível de expressão genica (SILVA *et al.*, 2005; ALBERTS, 2017).

Figura 9: Ativação do complexo MAP-Cinase: A proteína Ras ativada desencadeia a ativação do completo MAP-Cinase, evento este seguido por uma estimulação sequencial de diversas proteínas quinases citoplasmáticas, como a Raf (MAPKKK), a MEK (MAPKK) e a ERK (MAPK) acarretando alterações a nível de expressão gênica.



Fonte: Disponível em: ALBERTS B. *et al.*, 2017.

O complexo MAP-Cinase ativa um regulador de transcrição denominado MYC. A MYC vai induzir a entrada no ciclo celular por meio do aumento da expressão de Ciclinas (através da G1-Ciclina) que, irão ativar CDKs (Cinases dependentes de ciclina) formando o Complexo Ciclina-CDK, que são as principais responsáveis pelo controle do ciclo celular. A G1-CDK ativa fatores de regulação genica como as denominadas proteínas E2F que irão induzir a transcrição de genes para formar as G1-S Ciclina e S-Ciclin. Na ausência de um estímulo mitogênico ocorre uma interação entre a proteína E2F e a pRb (proteína do retinoblastoma), que é um importante reguladora do ciclo celular, e a pRb a inibe, no entanto, na presença de um estímulo mitogênico, a G1-CDK fosforila a pRb e reduz sua ligação a proteína E2F e agora a proteína E2F livre pode induzir a expressão do genes irão codificar as G1-S e S-Ciclina para promover a entrada na fase S do ciclo celular (ALBERTS, 2017).

3.3 CÂNCER

O câncer é uma doença multifatorial que está relacionado a influências ambientais, genéticas, comportamentais, culturais, socioeconômicas e do envelhecimento (ARAÚJO *et al.*, 2019). A nível mundial, o câncer é o principal problema de saúde pública e configura entre uma das principais causas de morte em pacientes com idade inferior a 70 anos. Os índices crescentes referentes a incidência e a mortalidade por câncer em todo o mundo são explicados pelo crescimento populacional, pelo envelhecimento dessa população, como também pela prevalência dos fatores de risco para o seu desenvolvimento, muitas vezes associados a fatores socioeconômicos (ALMEIDA, SHIMODA, 2022).

O câncer é um termo abrangente, incluindo mais de cem doenças que apresentam como característica em comum o crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos (INCA, 2022). O processo de proliferação anormal de células ocorre principalmente por dois mecanismos, seja por mutações em proto-oncogenes que em condições normais passam a ativar constantemente o ciclo celular, como também por mutações em genes supressores de tumor, nos quais deixam de inibir o ciclo celular, levando também a perda do controle do ciclo celular. O segundo mecanismo para o desenvolvimento do câncer ocorre por mutações no gene que codifica a proteína p53. A p53 é um supressor tumoral, desempenhando papel no controle do ciclo celular, no reparo do DNA e na indução de apoptose (ARAÚJO *et al.*, 2019). O gene p53, conhecido como “o guardião do genoma” é o gene de maior importância envolvido no processo carcinogênico (Fett-Conte *et al.*, 2002).

3.3.1 O HPV e o Câncer do colo do útero

A relação entre câncer cervical e o Papilomavírus Humano (HPV) é amplamente conhecida e aceita, sendo o principal fator de risco para o desenvolvimento de lesões intraepiteliais de alto grau e do câncer do colo do útero (NETO, 2012). A Organização Mundial de Saúde desde o ano de 1992 considera que a persistência do vírus HPV em altas cargas virais representa o principal fator de risco para o desenvolvimento da doença (NOGUEIRA-RODRIGUES e MELO, 2012). É um vírus transmitido sexualmente, e que em humanos é capaz de produzir lesões hiperproliferativas do epitélio cutâneo-mucoso que afeta além do colo uterino outras regiões como o trato anogenital, boca, esôfago e laringe (NETO, 2012). A presença do vírus HPV é um fator necessário, mas não suficiente, para ativar o desenvolvimento tumoral, sendo dependente de outros fatores próprios do hospedeiro como a imunidade, características genéticas e o comportamento sexual (BODILY, LAIMINS, 2011;

NAKAGAWA *et al.*, 2000).

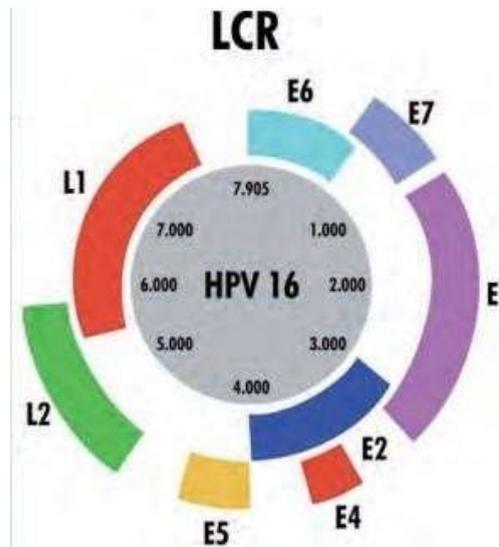
O vírus HPV é do tipo DNA, pertencente à família *Papillomaviridae*, gênero *Papillomavirus* (PANCERA, SANTOS, 2018). São vírus não-envelopados, de simetria icosaédrica e possuindo um genoma de DNA de fita dupla circular, constituindo-se de aproximadamente 6.800 a 8.400 pares de bases (SOUTO *et al.*, 2005). O vírus HPV se replica no núcleo das células epiteliais escamosas e são capazes de permanecer fora das células por longo período sem perder suas propriedades infecciosas (NETO, 2012).

São conhecidos mais de 150 tipos de HPV, porém, aproximadamente 40 afetam o trato genital inferior. Os HPVs genitais são divididos em subgrupos, conforme o risco oncogênico. Os vírus considerados de baixo risco provocam doenças de natureza benigna, como os condilomas (verrugas) e lesões intraepiteliais de baixo risco, principalmente representadas pelos tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 e 81 sendo rara a associação dos HPVs de baixo risco ao carcinoma escamoso invasivo, enquanto que os de alto risco são responsáveis por lesões intraepiteliais de alto risco e o câncer invasivo, representados principalmente pelos tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56,58, 59, 61, 66, 68, 73 e 82 (NETO, 2012; PANCERA, SANTOS, 2018).

O genoma do HPV possui duas regiões principais (Figura 10), sendo uma região codificante e uma região não codificante. A região codificante é constituída por seis genes que se expressam precocemente e dois genes que se expressam tardiamente, sendo denominados respectivamente de E (Early) e L (Late), possuindo em sua totalidade oito ORF's (fase de leitura aberta). A região precoce ou Early (E) codifica as proteínas não estruturais: E1, E2, E4, E5, E5 e E7, já a região tardia ou Late (L) é responsável pela síntese das proteínas L1 e L2 que irão formar o capsídeo viral (NETO, 2012), sendo no gene L1 encontrada a região a mais conservada do genoma do HPV (IARC, 2007). O genoma do HPV possui ainda a região reguladora LCR (Longa região de controle), região não codificante, localizadas entre as regiões L1 e E6, e é nessa região onde se encontram sequencias estimuladoras e repressoras da transcrição viral, além da origem de replicação do genoma viral (SOUTO *et al.*, 2005). A LCR representa 10% do genoma viral e não codifica nenhuma proteína funcional, mas é nessa região onde encontram-se o sítio de origem de replicação e múltiplos sítios para a ligação de fatores de transcrição que são importantes para determinar o início da transcrição do genoma viral pela RNA polimerase II

(BERNARD, 2002; MORSHED et al., 2014; ZHENG, BAKER, 2006).

Figura 10: Genoma do HPV: O genoma do HPV é organizado em três regiões básicas: long control region (LCR), além das regiões L (tardia) e E (precoce). A região E contém seis ORFs (E1, E2, E4, E5, E6 e E7), que são necessários à replicação viral com alguns apresentando propriedades de transformação oncogênica. A região L contém duas longas ORFs, denominadas de L1 e L2. Os genes L codificam as proteínas estruturais que constituem o envoltório viral (proteínas do capsídeo do vírus).



Fonte: Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/tecnico_citopatologia_cademo_referencia_1.

O gene E1 está relacionado com a replicação viral, sendo uma enzima que possui atividade helicase, ligando-se na origem de replicação do DNA viral, sendo fundamental para a replicação do papilomavírus, uma vez que essa proteína se liga a origem de replicação viral e irá recrutar a maquinaria de replicação da célula para iniciar a replicação do DNA viral. A proteína codificada pelo gene E2 atua na regulação da transcrição dos oncogenes E6 e E7, tanto atuando como ativador quanto como repressor transcricional através da sua ligação a regiões específicas na LCR, ou seja, a inativação de E2 implica no aumento da produção de E6 e E7 (NETO, 2012; IARC, 2007). A proteína E2 ainda auxilia na replicação do DNA viral, recrutando a proteína E1 no sítio de origem de replicação, além de também atuar na transferência do genoma viral para as células filhas durante a divisão celular da célula infectada (IARC, 2007). O gene E4 codifica a proteína relacionada ao processo de liberação do vírus, enquanto o gene E5 estaria envolvido na proliferação celular e impedindo o reconhecimento das células infectadas pelo sistema imunológico (NETO, 2012; MORSHED et al., 2014). Os genes E6 e E7 codificam proteínas que irão atuar sobre proteínas que regulam o ciclo celular, provocando uma diminuição do controle do ciclo celular e da

maturação celular, sendo, portanto, genes envolvidos na oncogenicidade (NETO, 2012).

O genoma do HPV apresenta um promotor precoce que é responsável pelo controle da expressão de quase todos os genes E (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) e um promotor tardio responsável pelo controle da expressão dos genes L (L1 e L2), além do mais, o término da transcrição dos transcritos precoces e tardios são determinados por sítios de poli-adenilação, isso faz com que todos os genes virais sejam transcritos a partir da mesma fita de DNA molde, acarretando na formação de transcritos bi ou policistrônicos, referentes aos genes L e aos genes E. Esse produto da transcrição poderá ser processado por diversos eventos de *Splicing* alternativo, gerando mais de oito produtos gênicos (JOHANSSON; SCHWARTZ, 2013).

O sequenciamento do DNA viral permite identificar os tipos virais. Atualmente considera-se um novo tipo de HPV quando as sequências de nucleotídeos dos genes L1, E6 e E7 diferir em mais de 10% dos tipos conhecidos. Quando esse percentual é menor que 2%, classifica-se como uma variante do mesmo tipo. Os subtipos virais correspondem a genomas em que a sequência de nucleotídeos nessas regiões genicas diferem entre 2% e 10% dos tipos conhecidos (SOUTO *et al.*, 2005).

O Carcinoma do colo uterino é uma doença complexa com múltiplos determinantes ambientais e genéticos. As infecções genitais, especialmente as associadas ao papilomavírus humano de alto risco, e o comprometimento da resposta imune celular são fatores diretamente envolvidos no processo de transformação maligna (TERMINI, VILLA, 2008).

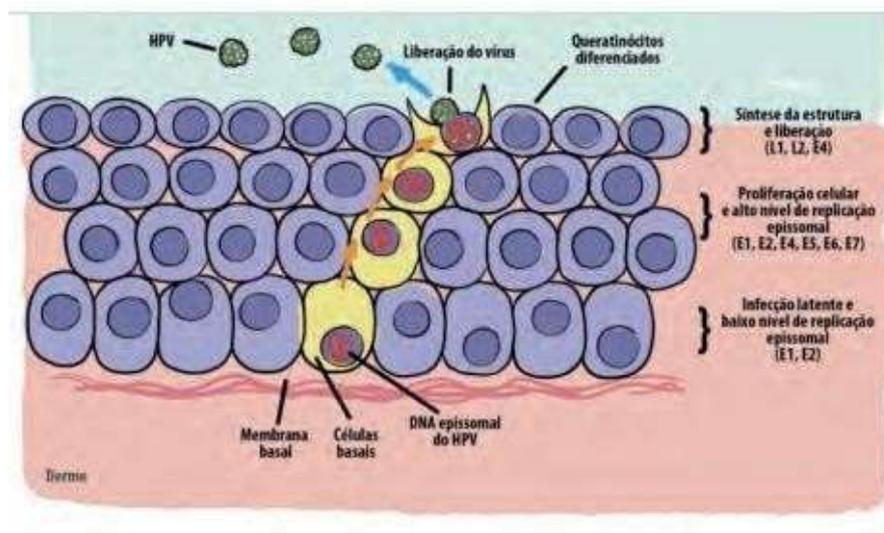
O mecanismo da infecção pelo HPV tem início com o encontro das partículas virais com as células basais do hospedeiro que se encontram acessíveis pela presença de microtraumas no epitélio. O vírus ao penetrar na célula tem seu material genético liberado do capsídeo e transportado para o interior do núcleo, apresentando seu genoma na forma episomal (extracromossômica, de formato circular) no núcleo da célula hospedeira (NETO, 2012).

Com a infecção das células basais (**Figura 11**) e utilizando a maquinaria celular, o promotor precoce do vírus é ativado e com isso, permite a expressão dos genes de expressão precoce (E), no entanto, as expressões dos genes E6 e E7 são reprimidas pela ação da proteína E2, que tem a função de regular a expressão dos oncogenes E6 e E7 (STEGER; CORBACH, 1997; SOUTO *et al.*, 2005).

A replicação viral ocorre inicialmente em uma velocidade lenta, e à medida que essas células escamosas vão se diferenciando ocorre um aumento da replicação viral com posterior expressão dos genes tardios para formação das proteínas estruturais e posterior empacotamento do vírus em capsídeos nas camadas superiores para que ocorra a sua

liberação (NETO, 2012). Portanto, o ciclo de vida produtivo do HPV é dependente da diferenciação celular, e mais que isso, ao se dividirem, essas células infectadas distribuem equitativamente o DNA viral entre as células filhas, e enquanto uma célula filha sofre o processo de diferenciação celular, as demais células continuam se dividindo na camada basal e servindo de reservatório de DNA viral para as posteriores divisões celulares (SOUTO *et al.*, 2005).

Figura 11: Ciclo de vida do HPV: O HPV é incapaz de se replicar de forma independente, assim, para completar o seu ciclo de vida, o HPV depende do metabolismo das células hospedeiras infectadas. O vírus ao penetrar na célula perde o seu capsídeo e é transportado para o núcleo onde permanece inicialmente no estado episomal (forma circular, não integrado ao genoma da célula hospedeira) com baixo nível de replicação viral. À medida que ocorre o amadurecimento das células, aumenta-se a replicação viral com expressão dos demais genes E e por fim, ocorre a expressão dos genes L com a produção das proteínas do capsídeo viral e liberação das partículas virais completas, podendo agora infectar outras células.

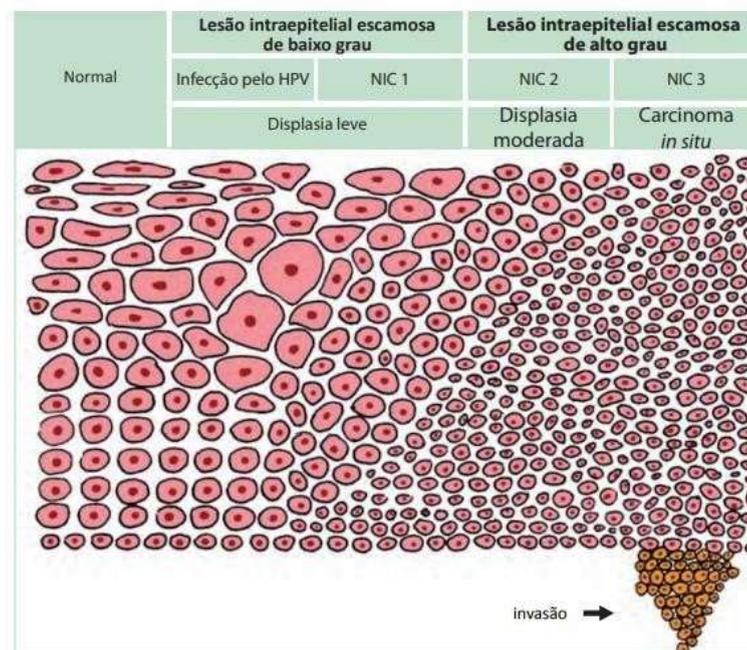


Fonte: Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/tecnico_citopatologia_caderno_referencia_1.pdf

A Lesão Intraepitelial escamosa de baixo grau (nomenclatura citológica) correspondente a nomenclatura histopatológica de Neoplasia intraepitelial cervical grau I (NIC I) é observada durante a fase produtiva da infecção pelo HPV (**Figura 12**), e nessa fase, a maior parte das infecções podem ser eliminadas pelo sistema imunológico da paciente. Nos casos em que o vírus não é eliminado pelo sistema de defesa, a infecção pode ser tornar persistente, fato esse correlacionado com as questões de mecanismo de escape do vírus pelo sistema imunológico ou pela própria deficiência do sistema de defesa do organismo (NETO, 2012; NAKAGAWA *et al.*, 2000). Já a progressão dessas lesões intraepiteliais escamosas

para Lesão Intraepitelial escamosa de alto grau (Figura 12), que na histologia corresponde a Neoplasias intraepiteliais cervicais de alto grau (NIC II e NIC III) e o câncer invasivo estão associados com a integração do genoma do HPV no genoma da célula hospedeira, fato esse decorrente da persistência do vírus com consequente quebra do DNA viral e superexpressão dos genes E6 e E7 (WOODMAN, COLLINS, YOUNG, 2007).

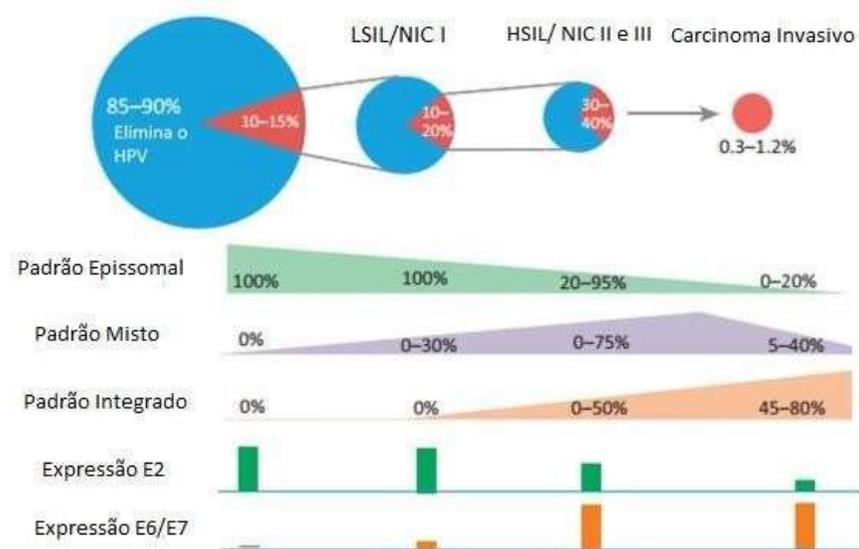
Figura 12: Ilustração representativa da evolução das lesões pré-cancerosas: O diagnóstico e a classificação histológica da NIC é dependente da diferenciação, maturação e estratificação das células, além das anormalidades nucleares



Fonte: Disponível em: https://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/atlas_citopatologia_ginecologica

As diferenças no conteúdo genômico entre os HPV de alto e baixo risco oncogênicos auxiliam no entendimento das ações virais junto ao genoma da célula hospedeira e justificam as diferenças na capacidade transformante desses agentes (SOUTO *et al.*, 2005). Dessa forma, nas lesões benignas causadas pelo HPV de baixo risco, o DNA do vírus está presente na forma episossomal, enquanto que nas lesões malignas causadas pelo HPV de alto risco, o DNA viral sofre uma quebra para que ocorra a integração ao genoma da célula hospedeira, formando uma ligação estável e perdendo a capacidade de se replicar de maneira autônoma (NETO, 2012), conforme **Figura 13**. Na replicação por HPV produtiva, o DNA viral permanece em estado episossomal e há repressão da atividade das duas oncoproteínas mais importantes, E6 e E7 (NOGUEIRA, MELO, 2012), cujo controle transcricional/repressão é exercido pelo gene E2 (SOUTO *et al.*, 2005).

Figura 13: Ilustração representativa do estado físico do HPV correlacionando com a evolução das lesões pré-cancerosas e o Câncer: O estado físico epissomal do vírus é observado nas lesões pré-cancerosas de baixo grau (LSIL/NIC I) em 100% dos casos, com isso, a expressão de E2 encontra-se ao máximo e consequentemente suprimindo a expressão de E6 e E7. Quando o E2 é perdido no processo de linearização e integração, há a interrupção do circuito regulatório viral transcricional E2, com o aumento da síntese de E6 e E7, que é o que ocorre nas lesões de alto grau (HSIL/NIC II e III), podendo encontrar o DNA viral tanto na forma mista quanto integrada em sua maioria. No carcinoma invasivo observamos o grau máximo de expressão de E6 e E7 e diminuição ainda mais acentuada do gene E2, estando o status físico do HPV em sua maioria no padrão integrado, podendo ainda ter o vírus na forma epissomal, caracterizando a presença de ambos os padrões como padrão misto.

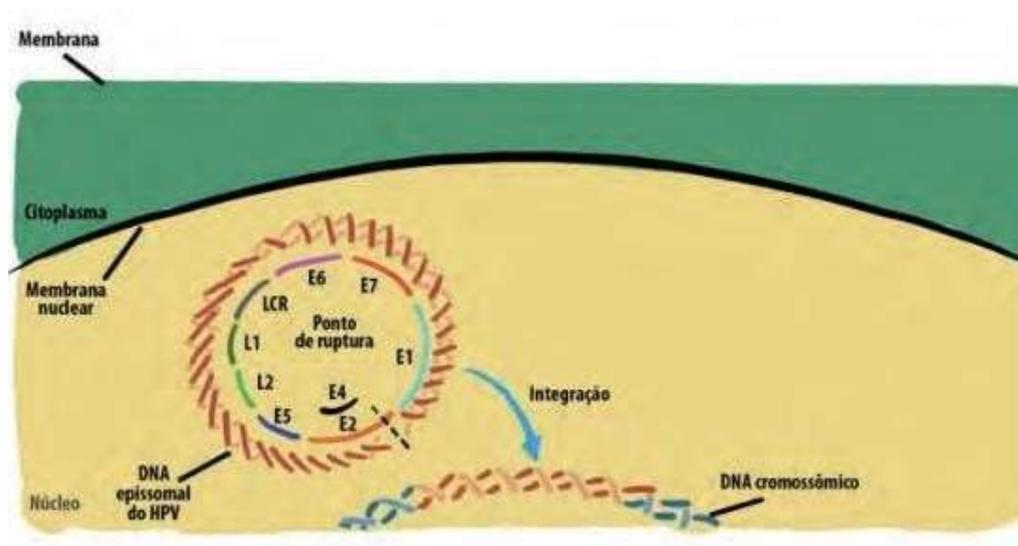


Fonte: Adaptado de SHULZHENKO *et al.*, 2014.

Nas lesões pré-neoplásicas e no câncer, o DNA viral se integra ao genoma da célula humana (NOGUEIRA, MELO, 2012). Essa integração do genoma viral parece ocorrer ao acaso, não havendo sítio preferencial de integração no genoma, mas por outro lado, há uma grande especificidade no local de clivagem do DNA circular do vírus, ocorrendo uma clivagem na região dos genes E1/E2 (**Figura 14**), com consequente interrupção do controle transcricional exercido pelo gene E2 (SOUTO *et al.*, 2005). A integração do genoma viral pode ocorrer em qualquer local do genoma, mas com frequência acomete sítios frágeis, pontos de translocações conhecidos e regiões de transcrição ativas (KRAUS *et al.*, 2008), sendo de conhecimento que a integração viral pode ativar oncogenes ou inativar genes supressores de tumor nas células hospedeiras, fato este evidenciado por alguns estudos que afirmam que a integração ocorre perto ou dentro de genes potencialmente tumorais, como o gene MYC

(FERBER *et al.*, 2003). A integração provoca uma ruptura no gene E2, e como consequência é observada uma superexpressão dos oncogenes virais E6 e E7 (WOODMAN, COLLINS, YOUNG, 2007).

Figura 14: Ilustração representativa da integração do DNA do HPV: Os HPVs de alto risco apresentam maior capacidade de se integrarem ao genoma da célula hospedeira. No mecanismo de integração viral, o DNA do HPV que é circular tem que se abrir, tornando-se retilíneo. Essa abertura/quebra sempre se faz na posição de E1/E2, interrompendo o gene E2 e impedindo a síntese das proteínas E2 que agem regulando a transcrição das oncoproteínas E6 e E7. O aumento da produção de E6 e E7 é associado com o risco de desenvolvimento de carcinoma devido a inativação das proteínas celulares supressoras de tumor, p53 e pRb, cuja função é atuar impedindo a proliferação de células com DNA lesionado.



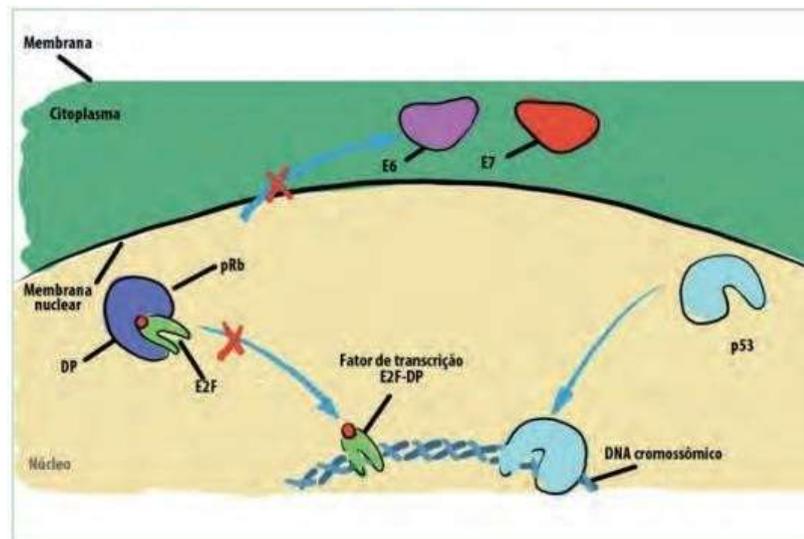
Fonte: Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/tecnico_citopatologia_caderno_referencia_1.pdf

Os HPVs de alto risco, principalmente os vírus HPV-16 e HPV-18 apresentam maior risco por se integrarem ao DNA do hospedeiro, em comparação com os outros tipos de HPV de baixo risco, por isso os tipos 16 e 18 são os mais associados com o câncer a nível mundial (RODRIGUES A, SOUSA J, 2015). Com a integração e o desencadeamento da produção das oncoproteínas virais, constata-se que os genes E6 e E7 são os únicos genes do HPV que tem papel de promover o processo carcinogênico (NOGUEIRA, MELO, 2012).

A proteína E6 do HPV de alto risco oncogênico tem a função de inativar a proteína p53 por degradação (Figura 15) e acarretando como consequência uma replicação descontrolada da célula. A proteína E7 do HPV de alto risco liga-se a proteínas da família pRb e promove a sua degradação (Figura 15) e com isso desregulando a maquinaria do ciclo celular da célula infectada, portanto, as proteínas virais E6 e E7 são capazes de interagir com

as proteínas controladoras do ciclo celular, com isso, a célula é conduzida à transformação, imortalização celular e, posteriormente, ao câncer (SOUTO R, FALHRI JPB, CRUZ AD, 2005). Essas oncoproteínas ainda são capazes de regular diretamente a atividade de receptores de fatores de crescimento, inibir a apoptose, promover angiogênese, culminando na alteração do ciclo celular e na alteração do programa de diferenciação das células, com isso, promovendo o acúmulo de defeitos mitóticos que levam a instabilidade genômica (NOGUEIRA, MELO, 2012). As proteínas codificadas pelos E6 e E7 dos HPVs de baixo risco parecem se ligar menos ativamente ou não se ligar a p53 e pRb (BRASIL, 2012).

Figura 15: O papel da p53 e da pRb: O papel da p53 é averiguar e responder a presença de lesões do DNA, com isso, atuar como um fator transcricional de genes envolvidos na interrupção do ciclo celular e indução dos sistemas de reparo do DNA ou ainda na indução da apoptose. A função da pRb é inativar o fator de transcrição E2F, cuja função é induzir a transcrição de genes envolvidos na replicação do DNA. Essas duas proteínas são conhecidas como supressoras de tumor porque são essenciais para impedir a divisão de células com DNA lesionado. Na ausência de E6 e E7 do HPV, as proteínas p53 e pRb funcionam normalmente evitando a transformação maligna.



Fonte: Disponível em: https://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/tecnico_citopatologia_caderno_referencia_1.pdf

3.4 EPIDEMIOLOGIA

O câncer do colo do útero é uma das principais causas de morte por câncer em mulheres em todo o mundo, excetuando-se o câncer de pele não melanoma, representa o terceiro tumor maligno mais frequente na população feminina (**Figura 16**), atrás apenas do câncer de mama e do câncer colorretal, sendo causada pela infecção persistente de alguns

tipos do Papilomavírus Humano – HPV (INCA, 2022). Para cada ano do triênio 2023-2025, são esperados 17.010 casos novos, sendo na região Norte e Nordeste o segundo tipo de câncer mais incidente, na região Centro-Oeste o terceiro em incidência, seguidos da região Sul e Sudeste como o quarto e o quinto em incidência, respectivamente. Em termos globais, países europeus, Estados Unidos, Canadá, Japão e Austrália apresentam as menores taxas, enquanto países da América latina e países mais pobres do continente africano apresentam valores bastante expressivos, evidenciando a alta prevalência dos casos em países subdesenvolvidos (INCA, 2022).

Figura 16: Os dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, excetuando o câncer de pele não melanoma: O câncer do colo do útero configura como o terceiro mais incidente entre as mulheres, com estimativa de cerca de 17.010 novos casos.

Homens			Mulheres		
Localização Primária	Casos	%	Localização Primária	Casos	%
Próstata	71.730	30,0%	Mama feminina	73.610	30,1%
Côlon e reto	21.970	9,2%	Côlon e reto	23.660	9,7%
Traqueia, brônquio e pulmão	18.020	7,5%	Colo do útero	17.010	7,0%
Estômago	13.340	5,6%	Traqueia, brônquio e pulmão	14.540	6,0%
Cavidade oral	10.900	4,6%	Glândula tireoide	14.160	5,8%
Esôfago	8.200	3,4%	Estômago	8.140	3,3%
Bexiga	7.870	3,3%	Corpo do útero	7.840	3,2%
Laringe	6.570	2,7%	Ovário	7.310	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.420	2,7%	Pâncreas	5.690	2,3%
Fígado	6.390	2,7%	Linfoma não Hodgkin	5.620	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2023.pdf>

4. METODOLOGIA

4.1 AMOSTRAGEM

Utilizando um total de 35 (trinta e cinco) amostras de descamação cervical positivas para Lesão de baixo grau (NIC I), confirmadas por biópsia, fornecidas pelo banco de dados do laboratório Bioensaios & Diagnósticos Laboratórios Clínicos LTDA, foi realizado o estudo da genotipagem e posterior integração genômica viral do HPV pelo método direto (HPV-IntG). Também foram utilizadas duas linhagens celulares de Câncer do Colo do Útero (CCU), sendo elas, *SiHa* e *Ca Ski*, para análise de integração.

As pacientes, ou seus responsáveis legais foram informadas do procedimento e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE, autorizando

espontaneamente a utilização das amostras. Todas as mostras foram identificadas por código alfanuméricos, sendo de mínimo quatro (4) números e 3 (três) letras ou símbolos, para garantir o direito à privacidade das doadoras.

Esta pesquisa foi apreciada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Saúde do Estado da Paraíba sob o CAAE: 71772723.8.0000.5186..

4.2 EXTRAÇÃO DO DNA

As amostras foram submetidas à extração do DNA no Laboratório Biologia Molecular Estrutural e Oncogenética - LBMEO. A amostra foi proveniente de raspado cervical, coletada em condições adequadas e conservadas em água DEPC 0,1%, para posterior extração, genotipagem e aplicação do método HPV- IntG.

Para extração do DNA utilizou-se o método de Salting Out, onde as amostras foram homogeneizadas em vortex, posteriormente foi adicionado 1000uL de tampão de extração (Tris 1M; EDTA 0,5M; NaCl5M) e transferido para microtubos de 2000uL. As amostras foram centrifugadas à 10.000 RPM por 10 minutos para que as células se depositassem no fundo do tubo. Após isso, adicionou-se 300uL de tampão de extração, 50µ L de proteinase K (10mg/mL) e 50µ L de SDS 20%. Os microtubos foram agitados em vortex por 15 segundos e em seguida incubados em banho-maria a 80°C por 30 minutos para a lise celular.

Decorrido este tempo, adicionou-se 60uL de NaCl 5M e homogeneizou-se em vortex por 15 segundos. As amostras foram centrifugadas em baixa rotação, 3.000 RPM, por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado (500uL) e transferido para outro microtubo de 2000uL contendo 1.500 uL de álcool etílico absoluto para precipitação do DNA. As amostras foram centrifugadas em alta rotação, 10.000 RPM por 10 minutos. Após isso, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 1.000 uL de álcool etílico 50% para lavagem do DNA. Esse procedimento foi repetido mais duas para um total de três lavagens, visando melhor lavagem e retirada do excesso de NaCl. O sobrenadante foi descartado após centrifugação e as amostras foram levadas ao banho seco a 80°C por 30 minutos para secagem da amostra.

As amostras secas foram ressuspensas com 100uL de água Milli Q e armazenadas em temperatura ambiente para eluição por 24 horas. Decorrido esse período, as amostras foram quantificadas em Nanodrop Lite (Thermo Scientific) e posteriormente diluídas, quando necessário.

4.3 AMPLIFICAÇÃO POR PCR – MULTIPLEX

As amostras devidamente quantificadas e diluídas foram submetidas as condições da qPCR para pesquisa e genotipagem do subtipo de HPV de interesse. A amplificação da sequência específica dos subtipos HPV associados ao risco oncológico e da determinação da integração genômica viral em células hospedeiras pelo Método HPV-IntG foi realizada por PCR - Multiplex por meio dos iniciadores específicos para método HPV-IntG desenhados no LBME0, realizado após análise *in silico* dos genomas dos subtipos de HPV de interesse (Tabela 1).

Tabela 1. Iniciadores específicos para subtipos de HPV para amplificação pelo método HPV-IntG

SUBTIPO DE HPV	INICIADORES DO MÉTODO HPV-IntG
HPV-16	5'-TAT(N) 16 CTA-3'
IntG1	5'-HWD(N) ₂₀ RYT-3'
IntG2	5'-VSR(N) ₂₂ ASY-3'
IntG3	5'-NAW(N) ₂₀ RRC-3'
IntG4	5'-WWD(N) ₂₂ SRA-3'
IntG5	5'-NWR(N) ₂₀ RAT-3'
IntG6	5'-HSD(N) ₂₀ AYT-3'
IntG7	5'-HWD(N) ₂₀ RYT-3'

Fonte: Do próprio autor (2024)

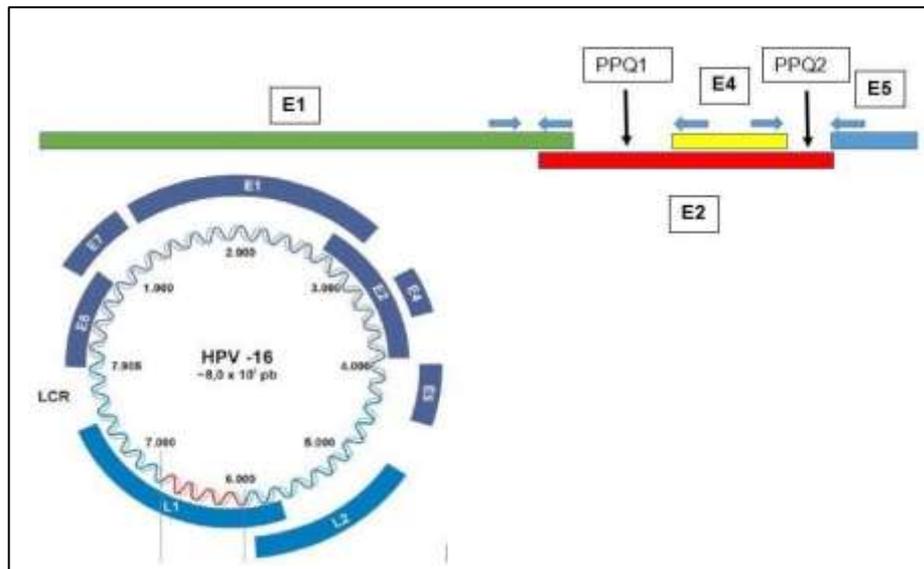
A integração do genoma do HPV ao genoma das células infectadas é fator determinante para o estabelecimento e progressão do processo neoplásico nos tecidos infectados, a exemplo nas células do colo do útero, as quais quando sofrem infecção seguida de integração do genoma do HPV e evoluem para o CCU. O método *IntG-HPV* analisa as regiões dos genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7 do subtipo de HPV de interesse. No padrão episomal são gerados obrigatoriamente *amplicons* específicos para o subtipo HPV de interesse, no padrão integrada, a depender de qual sítio de recombinação participa do mecanismo de integração, haverá ausência de *amplicon* específico.

A amplificação do método *IntG-HPV* foi realizada preferencialmente por *PCR-*

Multiplex utilizado amostras de DNA das linhagens celulares de CCU *SiHa*, *Ca Ski* e em 35 amostras de DNA de células de descamação do colo uterino com lesões de baixo grau e positivas para o HPV-16, preferencialmente no volume final 50 μ L.

O conjunto de primers utilizados na *PCR-Multiplex* do método *IntG-HPV* para o *HPV-16* foram desenhados com base na estrutura genômica do HPV com ênfase na sequência do HPV-16 (Figura 17). Os seguintes primers foram desenhados: Entre os genes E1 e E2, gerando um fragmento de cerca de 88 pb; entre os genes E1 e E2 dentro da região do gene E4, formando um amplicon de cerca de 657pb (local de provável ponto de quebra do genoma); entre os genes E2 e E5 formando um amplicon de 313 pb (local de provável ponto de quebra do genoma); entre os genes E6 e E7 formando um amplicon de 450pb.

Figura 17: Representação do genoma do HPV demonstrando as regiões de pontos de quebra possíveis (PPQ1 e PPQ2) nas quais os primers foram desenhados: O primer desenhado entre os genes E6 e E7 não mostrados na imagem representam o amplicon de 450pb, que é sempre constante, pois como não há quebra nessa região para que ocorra a integração, o referido amplicon precisa estar sempre presente.



Fonte: Do próprio autor (2023)

4.3.1 PCR - MULTIPLEX E SUAS CONDIÇÕES

A reação da PCR - Multiplex para método HPV-IntG foi realizada em um volume final de 50 μ L contendo 200 μ M de dNTPs (deoxinucleotídeo trifosfato), 2.0mM de MgCl₂

(Cloreto de magnésio), 50ng de DNA, 200pM de cada oligonucleotídeo (primer) e 0.5U AmpliTaq GOLD (Applied Biosystems, Foster City, CA). As condições da PCR para amplificação dos genes serão as seguintes: uma desnaturação prévia por 2 minutos a 94°C e 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 54°C por 1:30 minuto e 72°C por 30 segundos, com uma extensão final de 2 min a 72°C.

4.4 ANÁLISE

A análise do método HPV-IntG tem como fundamento a diferença de tamanhos dos *amplicons* específico para cada subtipo de HPV associado ao risco oncológico e a análise direta da integração do genoma viral ao genoma das células hospedeiras. O método *IntG-HPV* para determinação direta dos padrões dos *status* físico do genoma do hpv em relação ao genoma das células infectadas, tem como alvo regiões do HPV, que determinam diretamente os padrões dos *status* físico Epissomal, Misto e Integrado do genoma do HPV em relação ao genoma da célula infectada, porém não se limita ao diagnóstico e prognóstico da infecção por HPV no rastreamento e na prevenção do CCU. A primeira etapa do método *IntG-HPV* consiste na produção de *amplicons* específicos a partir dos conjuntos *primers* das regiões recombinantes e não recombinantes do genoma do HPV em relação ao genoma das células infectadas preferencialmente por *PCR-Multiplex*, onde os resultados podem ser analisados tanto por sistema de PCR *Real Time* quanto por gel de poliacrilamida – PAGE ou agarose. A segunda etapa é caracterizada pelos processos de análise dos *amplicons*, os quais determinam os padrões moleculares Epissomal, Misto e Integrado

4.5 VALIDAÇÃO

A validação dos resultados gerados pelo método HPV-IntG foi realizada por PCR em Tempo Real de forma indireta pela análise da quantificação da relação dos genes E6 e E2 do HPV.

5. RESULTADOS

. Foram selecionadas 35 (trinta e cinco) amostras positivas e genotipadas como HPV-

16, onde tais amostras já apresentavam laudos histopatológicos de confirmação para NIC I (Neoplasia Intraepitelial grau 1). Após isso, as amostras selecionadas e em conjunto com as linhagens celulares *SiHa* e *Ca Ski* foram submetidas a análise da integração através do método *IntG-HPV*.

A exemplo do *status* físico Epissomal do genoma do HPV-16, quando amplificado por *PCR-Multiplex* do método *IntG-HPV* são gerados preferencialmente os *amplicons* 88pb, 313pb, 450pb e 657pb. A ausência do *amplicon* 657pb está associada ao sítio de integração do genoma do HPV-16. A ausência do *amplicon* 313pb está associada ao sítio de integração do genoma do HPV-16, envolvendo as regiões adjacentes ao gene L2. A ausência dos *amplicons* 88pb e 657pb está associada ao sítio de integração do genoma do HPV-16. Uma vez, o genoma do HPV-16 integrado ao genoma das células infectadas, o *amplicon* 450pb é produzido a partir das regiões não recombinantes. Assim, sua amplificação é constante e serve também como referência para determinação do padrão misto.

Para diferenciar o padrão misto do padrão epissomal há necessidade de estabelecer a Razão Relativa (RR) entre a intensidade ou amplificação do *amplicon* constante pela a intensidade ou amplificação dos *amplicons* “não constante”, separadamente, sendo a $RR \leq 1$ para cada *amplicon* analisado, o genoma do HPV se encontra no padrão epissomal ou não integrado. Quando a $RR > 1$ para quaisquer *amplicons* analisados, o genoma do HPV se encontra no padrão integrado ao genoma das células infectadas. A Razão Relativa é calculada pela expressão matemática, $RR = I_{Ak} / I_{An}$. Onde, RR representa a Razão Relativa entre a intensidade ou amplificação do *amplicon* constate (I_{Ak}) pela intensidade ou amplificação do *amplicon* não constate (I_{An}) para cada *amplicon*. O percentual de integração dos subtipos de HPV de interesse (P_{ig}) é calculado pela expressão matemática, $P_{ig} = (RR - 1) \times 100$.

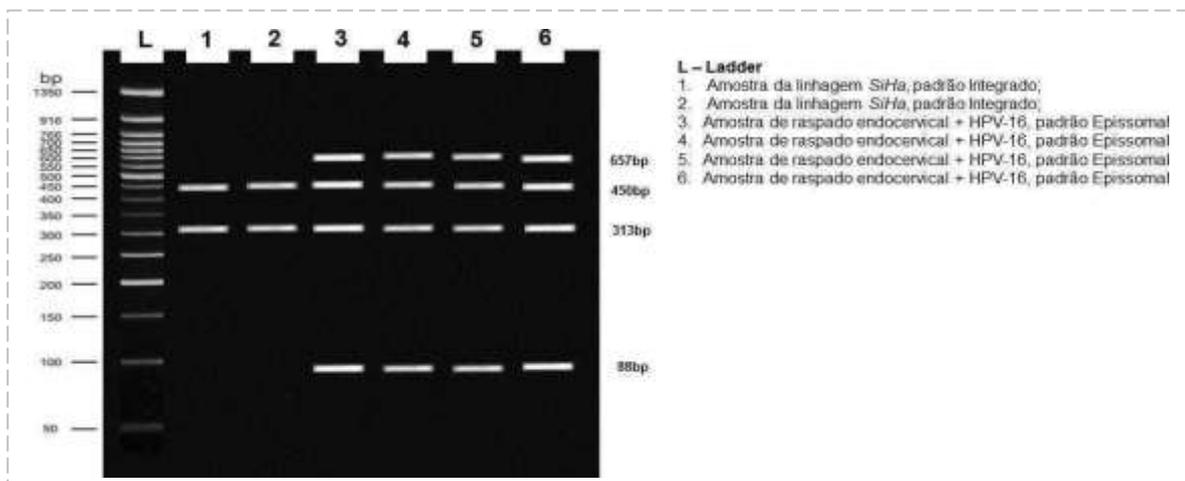
O método *IntG-HPV* foi validado em amostra de DNA extraído da linhagem celular de CCU *SiHa*, que é um modelo *in vitro* adequado para essa finalidade, determinando a análise do *status* físico do genoma do HPV-16. A referida linhagem celular foi imortalizada pela integração do genoma do HPV-16 e estabelecida em 1970 a partir de amostra de CCU de uma paciente de 55 anos (Friedl F, et al. 1970). As amplificações por reação *PCR-Multiplex* do método *IntG-HPV* foram realizadas em duplicata, bem como, em amostras de células de descamação do colo uterino (N = 35 amostras) com lesões de baixo grau e positivas para o HPV-16, sendo os volumes utilizados na reação e as condições da reação conforme descritos acima.

Os resultados do método *IntG-HPV* em DNA da linhagem celular de CCU *SiHa* quando comparado às amostras de células de descamação do colo uterino com lesões de baixo

grau e positivas para o HPV-16 pelo Teste Exato de *Fisher*, apresentaram diferenças estatisticamente significativa valor- $p > 0,05$. Assim, os resultados do método *IntG-HPV* sugerem a associação do padrão Epissomal do genoma do HPV-16 ao genoma das células de descamação do colo uterino com lesões de baixo grau e a associação do padrão Integrado do genoma do HPV-16 ao genoma da linhagem celular de CCU *SiHa* por meio das ausências dos *amplicons* 88pb e 657pb, que estão associadas ao sítio de recombinação do genoma do HPV-16.

A análise dos *amplicons* foi realizada por meio da utilização do gel de agarose, conforme mostra a figura 18. A extremidade do gel representa a aplicação do Ladder, marcador de peso molecular, apresentando fragmentos de DNA que vão de 50pb até 1350 pb. Nos poços 1 e 2 foram aplicadas, em duplicata, o produto da amplificação do DNA da linhagem *SiHa*. Observou-se que nessa linhagem ocorreu a perda dos fragmentos de 88pb e de 657 pb, indicando que o genoma viral teve uma quebra/perda da região, demonstrando ausência de amplificação e geração dos fragmentos, caracterizando a devida linhagem *SiHa* como de padrão integrado. Os poços 3, 4, 5 e 6 representam as amostras de descamação cervical previamente genotipadas com HPV-16 e com lesão intraepitelial cervical grau 1 (NIC 1), mostrando que nessas amostras houve a presença de todos os *amplicons* e na mesma intensidade, demonstrando a confirmação do seu padrão epissomal.

Figura 18: Análise em gel de agarose dos amplicons gerados pelo método *IntG-HPV*: Observa-se que nas linhagens *SiHa* houve a perda da banda de 657pb e 88pb, demonstrando que houve um ponto de quebra entre os genes E1 e E2 dentro da região do gene E4, acarretando na impossibilidade de gerar os referidos fragmentos/amplicons. Nas amostras de raspado endocervical houve presença de todas as bandas, demonstrando o padrão epissomal do vírus (não integrado).

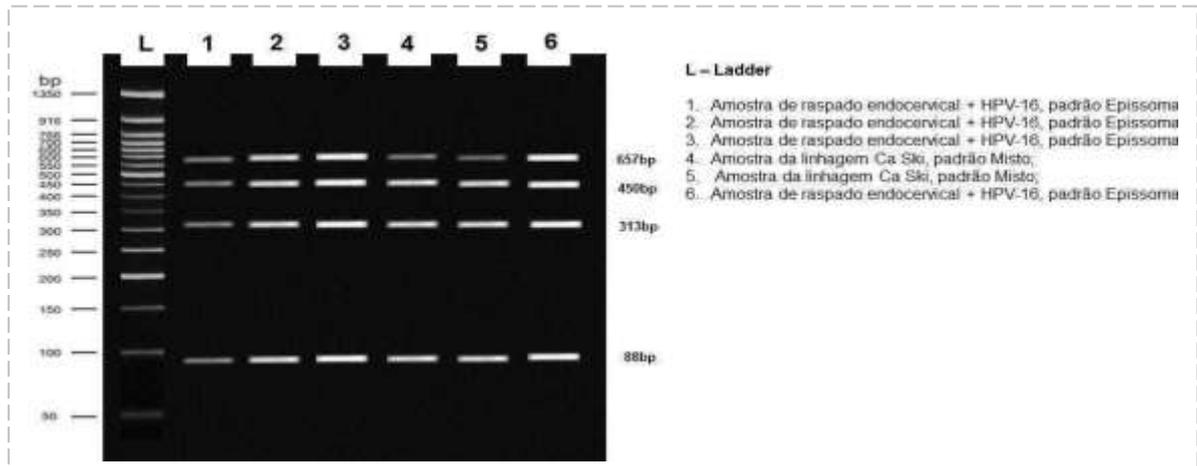


A análise do *status* físico do genoma do HPV-16 também foi validada em amostra de DNA da linhagem celular de CCU *Ca Ski* pelo Método IntG-HPV. A referida linhagem celular pode ser usada em testes e calibração em laboratórios credenciados pela ISO 17025, para contestar o desempenho de ensaios, validar ou comparar métodos de teste e estabelecer sensibilidade, linearidade e especificidade durante a validação ou implementação dos ensaios relacionados ao diagnóstico molecular *in vitro* (ATCC, 2022). A linhagem celular de CCU *Ca Ski* foi imortalizada pela integração de algumas cópias do genoma do HPV-16 e estabelecida em 1977 a partir de células epidermóides do carcinoma cervical de uma paciente de 40 anos (Pattillo et al., 1977). As amplificações da reação *PCR-Multiplex* do método *IntG-HPV* também foram realizadas em duplicata e em conjunto com as amostras de células de descamação do colo uterino com lesões de baixo grau e positivas para HPV-16, utilizando os volumes e condições descritas acima.

Os resultados do método *IntG-HPV* em DNA de linhagem celular de CCU *Ca Ski* quando comparado às amostras de células de descamação do colo uterino com lesões de baixo grau e positivas para o HPV-16 pelo Teste Exato de *Fisher* apresentaram diferença estatisticamente significativa valor- $p > 0,05$. Assim, os resultados do método *IntG-HPV* sugerem a associação do padrão Misto do genoma do HPV-16 ao genoma da linhagem celular de CCU *Ca Ski* e a associação do padrão episomal do genoma do HPV-16 ao genoma das células de descamação do colo uterino com lesões de baixo grau. Portanto, a linhagem celular *Ca Ski* apresenta a redução da intensidade do *amplicon* 657pb, a qual está associada ao sítio de recombinação do genoma do HPV-16, como apresentado na **Figura 19**.

Conforme demonstra a imagem do gel, os poços 1, 2, 3 e 6 apresentam todos os *amplicons* e com a mesma intensidade, quando comparados a intensidade dos fragmentos entre si de cada amostra de forma isolada, demonstrando o padrão episomal nas amostras de raspado endocervical. Nos poços 4 e 5, realizados em duplicata para o produto da amplificação do DNA da linhagem *Ca Ski*, observa-se que ao mesmo tempo em que é constatado todos os quatro *amplicons*, temos uma diminuição da intensidade do fragmento de 657pb, confirmando a presença tanto do DNA no padrão episomal, como também DNA integrado, caracterizando o padrão como Misto.

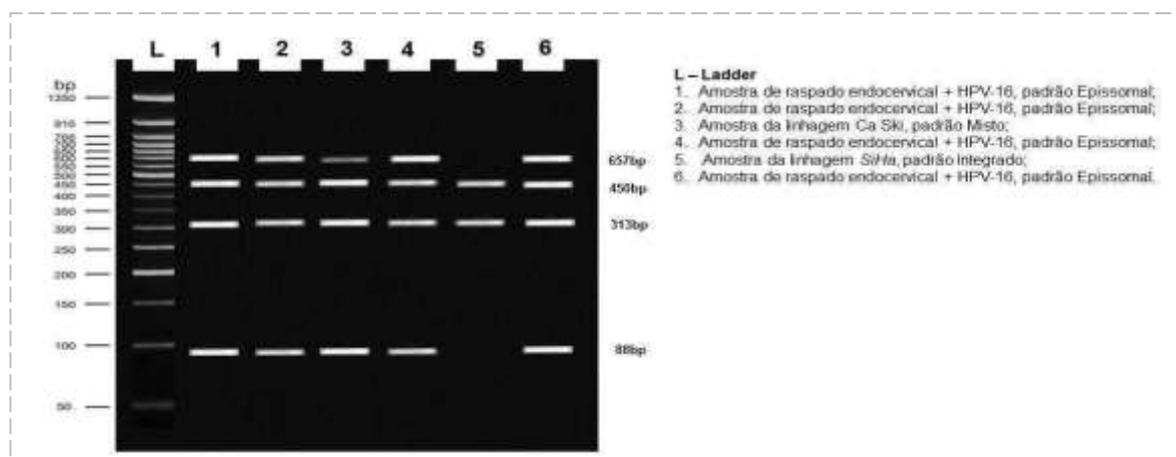
Figura 19: Análise em gel de agarose dos amplicons gerados pelo método IntG-HPV: Observa-se que nas linhagens Ca Ski houve uma diminuição na intensidade da banda do fragmento de 657pb, demonstrando que tem-se a presença de genoma viral com essa região íntegra como também há vírus que sofreu ruptura do seu genoma neste ponto de quebra entre os genes E1 e E2 dentro da região do gene E4, acarretando na geração da banda com diferença de intensidade, demonstrando o padrão misto. Nas amostras de raspado endocervical houve presença de todas as bandas, demonstrando o padrão epissomal do vírus (não integrado).



Fonte: Do próprio autor (2023)

Os resultados do método *IntG-HPV* em DNA foram novamente analisados de forma concomitante entre linhagens celulares de CCU *SiHa*, *Ca Ski* com as amostras de raspado endocervical. Assim, os resultados obtidos pelo método *IntG-HPV* sugerem a associação do padrão epissomal às amostras de células de descamação do colo uterino com lesões de baixo grau, a associação do padrão Misto do genoma do HPV-16 ao genoma da linhagem celular de CCU *Ca Ski* e a associação do padrão Integrado ao genoma da linhagem celular de CCU *SiHa*, como apresentado na **Figura 20**.

Figura 20: Análise em gel de agarose dos amplicons gerados pelo método IntG-HPV: A confirmação do padrão epissomal nas amostras de raspado endocervical com NIC I; presença de padrão misto na linhagem celular de CCU *Ca Ski*; e presença de padrão integrado na linhagem celular *SiHa*.



Fonte: Do próprio autor (2023)

6. DISCUSSÃO

A mudança do estado físico do genoma do HPV de epissomal para integrado está associado com a gravidade das lesões neoplásicas. Lesões NIC 1 apresentam o genoma do HPV exclusivamente na forma epissomal, enquanto mais de 75% dos casos de NIC 2 e NIC 3 apresentam o genoma tanto na forma epissomal quanto a integrada. No estágio de câncer invasivo, raramente é observado a presença apenas do genoma epissomal, sendo a forma integrada a mais comum (presente de 45 a 80% dos casos), porém em diversos casos o genoma viral pode ser encontrado nos dois estados (CRICCA *et al.*, 2007) A frequência com que a integração viral é encontrada em carcinomas provocados pelo HPV 16 e pelo HPV 18 é bastante alta, sendo aproximadamente 80% e 100% respectivamente (PETT; COLEMAN, 2007).

Atualmente, técnicas como PCR e Hibridização *in situ* são técnicas frequentemente utilizadas quando se deseja estabelecer qual subtipo viral está presente no tecido biopsiado. A Hibridização *in situ* (ISH) é uma técnica utilizada para detectar o HPV e sua localização utilizando sequências específicas de ácidos nucleicos em amostras de células ou em tecidos, por meio da ligação de sondas específicas (sequências de DNA). Uma variante da ISH é a hibridização *in situ* cromogênica (CISH), que por meio de uma reação com enzima peroxidase irá permitir a visualização da presença do HPV na amostra devido a formação de uma coloração marrom no núcleo da célula, sendo visualizada em microscópio de luz (GUO *et al.*, 2002; IFTNER; VILLA, 2003; SIADAT-PAJOUH, Majid *et al.*, 1994). No trabalho realizado por Bagarelli e Oliani em 2004, observou-se que a hibridização *in situ* apresentou

alta especificidade e baixa sensibilidade para o DNA do HPV, necessitando de um número considerável de cópias virais por célula, sendo pouco utilizado na rotina diagnóstica (BAGARELLI; OLIANI, 2004).

Técnicas como a PCR (reação em cadeia da polimerase) por apresentarem alta sensibilidade e especificidade representam importantes escolhas diagnósticas para detecção do HPV. No trabalho de pesquisa de Peitsaro *et al.*, utilizando PCR em tempo real também com ênfase no subtipo 16 do HPV, consegue-se afirmar que em neoplasias intraepiteliais cervicais já existia o HPV em sua forma integrada, através da utilização de primers e sondas tendo como alvo os genes E2 e E6 do HPV-16. Peitsaro *et al* relatam que na forma epissomal ocorre uma equivalência na presença de ambos os alvos E2 e E6, enquanto na forma integrada, os números de cópia de E2 seriam menores que de E6. O pesquisador em questão e seus colaboradores desenvolveram um método através da qPCR capaz de calcular o número de cópias virais para as formas epissômica e integrada separadamente da seguinte forma: Os resultados foram registrados como números de cópias em 50 ng de DNA celular. O E6 integrado foi calculado subtraindo o número de cópias de E2 (epissomal) do número total de cópias de E6 (epissomal e integrado). Razões de E2 a E6 inferiores a 1 indicam a presença de formas integradas e epissômicas. A proporção de E2 para E6 integrado representa a quantidade da forma epissomal em relação à forma integrada. Valores maiores que 1 indicam domínio da forma epissomal. A carga viral relativa pode ser estimada calculando a proporção de cópias de E6 para células *SiHa* E6, visto que é de conhecimento que a linhagem celular *SiHa* possui uma ou duas cópias do HPV-16 integrado. Dessa forma, quando apenas a forma epissomal está presente, deve ser detectado número de cópias equivalentes de E2 e E6. Na presença apenas do HPV-16 na forma integrada não é detectada nenhuma amplificação de E2 (PEITSARO *et al.*, 2002).

O método HPV-IntG consiste no ensaio de qPCR-multiplex, onde o resultado pode ser analisado tanto por PCR Real Time quanto por gel de poliacrilamida - PAG. A integração do genoma do HPV ao genoma da célula hospedeira é fator de risco para o estabelecimento e progressão do processo neoplásico nos tecidos infectados, a exemplo nas células do colo do útero.

Portanto, o método HPV-IntG apresenta uma nova abordagem para a determinação do estado físico do genoma do HPV, em especial, dos subtipos de HPV de alto risco oncológico, a exemplo dos subtipos de HPV 16 e 18. O referido método, determina a mudança do genoma do HPV da forma epissomal para forma integrada diretamente nas células infectadas, sendo um método direto para determinação da integração.

O genoma do HPV em relação ao seu estado físico pode ser encontrado na forma episomal, não integrada, e na forma integrada. A forma episomal é definida quando o genoma do HPV se apresenta no seu estado natural, genoma de DNA de dupla fina e circular, portanto, não integrado ao genoma da célula hospedeira. Esta fase corresponde a infecção não persistente com possibilidade de regressão, porém, pode se converter em uma infecção persistente pelo fenômeno da integração ao genoma da célula hospedeira, perdendo sua forma episomal.

O método HPV-IntG analisa as regiões dos genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7 dos subtipos de HPV de interesse, pelo método de PCR – Multiplex. Na forma episomal são gerados obrigatoriamente *amplicons* específicos para os subtipos HPV de interesse. A exemplo do genoma do subtipo 16 de HPV na forma episomal, não integrado, são gerados obrigatoriamente pelo Método HPV-IntG *amplicons* com diferentes tamanhos (88pb, 313pb, 450pb e 657pb). Uma vez, o genoma do subtipo 16 de HPV integrado ao genoma da célula hospedeira, o único *amplicon* constante é de tamanho de 450pb. As ausências dos *amplicons* 88pb e 657pb estão associados ao ponto de integração do genoma do subtipo 16 de HPV, envolvendo as regiões adjacentes ao gene E7. A ausência do *amplicon* 313pb está associado à integração do genoma do subtipo 16 de HPV, envolvendo as regiões adjacentes ao gene L2.

O *amplicon* constante gerados pelo Método HPV-IntG para o subtipo 16 do HPV (450pb) é referência para determinar o percentual de integração, em mostras que apresentam as duas formas do estado físico do genoma de HPV, a forma não integrada ou episomal e a integrada, a forma é definida como “mista”. Para diferenciar a forma “mista” da amostra não integrada ou episomal há necessidade de estabelecer a Razão relativa entre a intensidade ou amplificação ($R_{i,a}$), do *amplicon* constante pela a intensidade ou amplificação dos *amplicons* “não constante”, separadamente, sendo a $R_{i,a} \leq 1$ para cada *amplicon* analisado, o genoma do HPV se encontra na forma episomal ou não integrada. Quando a $R_{i,a} > 1$ em qualquer *amplicon* analisado, o genoma do HPV se encontra integrado ao genoma da célula hospedeira.

$$R_{i,a} = IA_K / IA_n$$

Onde, $R_{i,a}$ representa a Razão relativa entre a intensidade ou amplificação do *amplicon* constate (IA_K) pela intensidade ou amplificação do *amplicon* não constate (IA_n) para cada *amplicon*.

O percentual de integração dos subtipos de HPV de interesse (P_{int}) é calculado pela expressão:

$$P_{ig} = (RR - 1) \times 100$$

Assim como qualquer método, o método HPV-IntG apresenta limitações relacionadas

as condições de transporte e armazenamento da amostra, bem como a qualidade do fixador, tempo excessivo ou insuficiente de fixação, recipiente inadequado para fixação e/ou volume insuficiente do fixador, pois são fatores que podem interferir no diagnóstico, afinal o ácido nucleico viral precisa estar preservado e íntegro para evitar resultados falso negativos. Além de que, não é o método adequado para se trabalhar com amostras parafinadas, pois testes moleculares em amostras incluídas em parafina são mais difíceis de serem analisadas devido ao estado de degradação do DNA, que é maior quando comparado ao DNA de amostras frescas, nas quais o DNA se encontra mais íntegro, sendo de extrema importância que o DNA da amostra encontre-se preservado para que seja possível avaliar a presença e/ou ausência dos genes a serem pesquisados para determinar a estrutura física do genoma do HPV. Apresenta como benefício a possibilidade de se trabalhar com amostra de raspado cervical, método pouco invasivo e indolor para obtenção de amostra representativa do colo uterino.

O método molecular *IntG-HPV*, caracteriza-se com uma inovação disruptiva nas áreas de biologia molecular para diagnóstico, prognóstico, rastreamento e prevenção do CCU, entre outras neoplasias, que são causadas por subtipos de HPV de alto risco oncológico, uma vez que, determina diretamente os padrões do status físico epissomal, misto e integrado do genoma viral em relação ao genoma das células infectadas, à baixo custo, com celeridade e com tecnologia nacional.

7. CONCLUSÃO

Os resultados da pesquisa em questão, demonstram a importância da metodologia *IntG-HPV* no diagnóstico de avaliação do estado físico do vírus HPV (epissomal, integrado ou misto), promovendo resultados específicos e complementares à histopatologia, proporcionando um impacto positivo direto no gerenciamento clínico e/ou tratamento e prognóstico dos pacientes. Os demais protocolos atualmente que utilizam como base a PCR para analisar o status físico do genoma do HPV fornecem análises indiretas, apresentam custo elevado e informação limitada.

Desde o ano de 2021 a OMS (Organização Mundial de Saúde) aconselha mudanças importantes na abordagem para rastreio de câncer do colo do útero, sendo recomendado o teste de HPV baseado em DNA como o método preferido, em vez de inspeção visual com ácido acético ou citologia (Papanicolau). Recentemente, o Ministério da Saúde do Brasil tornou pública a portaria SECTICS/MS N°3, de 7 de Março de 2024 para incorporar no âmbito do SUS os testes moleculares para detecção de HPV por PCR.

Muitas mulheres no Brasil e ao redor do mundo, principalmente as mais pobres,

continuam morrendo por câncer do colo do útero, uma doença que pode ser prevenida e tratada. A implantação da metodologia *IntG-HPV* para o estudo do HPV visa acabar com o sofrimento e reduzir mortes, além de que, viabiliza o desenvolvimento de futuros estudos para identificação de outros agentes infecciosos que contribuirão definitivamente na rotina diagnóstica e na pesquisa clínica.

Essa dissertação de mestrado faz parte do projeto “Análise Comparativa entre o Método Papanicolau e a plataforma molecular DGI-gHPV (Detecção, Genotipagem e análise de integração do genoma do HPV) para rastreamento, prevenção do Câncer do colo do útero no Estado da Paraíba. A plataforma DGI-gHPV é uma Patente de Invenção sob número de processo BR 10 2023 009924 6 com registro de pedido ao INPI (Instituto Nacional da Propriedade Industrial).

REFERÊNCIAS

ALBERTS, Bruce et al. **Biologia molecular da célula**. Artmed Editora, 2017.

ARAÚJO, G. L. S. et al. Apoptose como perspectiva de cura do câncer. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 32-35, 2019. Disponível em: https://www.mastereditora.com.br/periodico/20191115_0727372.pdf#page=32. Acesso em: 7 out. 2022.

ARAÚJO, S. R. Citologia e Histopatologia Básicas do Colo Uterino para Ginecologistas. **Curitiba: VP editora**, 1999.

Bagarelli LB, Oliani AH. Tipagem e estado físico de papilomavírus humano por hibridização *in situ* em lesões intra-epiteliais do colo uterino. Human Papillomavirus Typing and Physical State by *in situ* Hybridization in Uterine Cervix Intraepithelial Lesions. **Trabalhos Originais**. 2004; 26(261):59-64.

BODILY, J; LAIMINS, L. A. Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant progression. **Trends in microbiology**, v. 19, n. 1, p. 33-39, 2011.

BRASIL, MINISTERIO DA SAUDE. Biblioteca Virtual em Saúde. **Atlas de Citopatologia Ginecológica**. Brasília. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/atlas_citopatologia_ginecologica.pdf. Acesso em: 12 dez. 2023.

BRASIL, MINISTERIO DA SAUDE. Biblioteca Virtual em Saúde. **Caderno de Referência**. Brasília. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/tecnico_citopatologia_caderno_referencia_1.pdf. Acesso em: 12 dez. 2023.

CRICCA, M; MORSELLI-LABATE, A. M; VENTUROLI, S; AMBRETTI, S; GENTILOMI, G. A; GALLINELLA, G; COSTA, S; MUSIANI, M; ZERBINI, M. Viral DNA load, physical status and E2/E6 ratio as markers to grade HPV16 positive women for high-grade cervical lesions. **Gynecologic Oncology**, v. 106, n. 3, p. 549–557, set. 2007.

DE ALMEIDA, A. P. M.; SHIMODA, E. Neoplasias cutâneas em hospital de referência em Campos dos Goytacazes: integração dos registros e sua interface com a política em saúde. **Redes**, v. 27, 2022.

FERBER, M; J, THORLAND E. C.; BRINK, A. A; RAPP, A. K; PHILLIPS, L. A; MCGOVERN, R; GOSTOUT, B. S; CHEUNG, T. H; CHUNG, T. K. H; FU, W. Y; SMITH, D. I. Preferential integration of human papillomavirus type 18 near the c-myc locus in cervical carcinoma. **Oncogene**, v. 22, n. 46, p. 7233-7242, 2003.

FETT-CONTE, A. C; SALLES, A. B. C. F. A importância do gene p53 na carcinogênese humana. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 24, p. 85-89, 2002.

<https://www.researchgate.net/publication/323879334>. Acesso em: 22 jul. 2022.

IARC. **IARC monographs on the Evaluation of carcinogenic risks to humans - Volume 90 - Human Papillomaviruses** World Health Organization - International Agency for Research on Cancer, 2007. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol90/>.

IARC. **Citopatologia do colo uterino** – atlas digital. Disponível em: <https://screening.iarc.fr/atlascyto.php?lang=4>. Acesso em: 7 de março 2023.

IFTNER T, VILLA LL. CHAPTER. **Human Papillomavirus Technologies current technology for human papillomavirus dna detection of genital infections**. v.31, p.80-8, 2003.

INCA, INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Incidência**. Rio de Janeiro. Disponível em: [https://www.inca.gov.br/controle-do-cancer-do-colo-do-utero/dados-e-numeros/incidencia#:~:text=No%20Brasil%2C%20exclu%C3%ADdos%20os%20de,mulheres%20\(INCA%2C%202021\)](https://www.inca.gov.br/controle-do-cancer-do-colo-do-utero/dados-e-numeros/incidencia#:~:text=No%20Brasil%2C%20exclu%C3%ADdos%20os%20de,mulheres%20(INCA%2C%202021)). Acesso em: 04 ago. 2022.

INCA, INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **O que é câncer?**. Rio de Janeiro. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/o-que-e-cancer>. Acesso em: 28 jul. 2022.

JOHANSSON, Cecilia; SCHWARTZ, Stefan. Regulation of human papillomavirus gene expression by splicing and polyadenylation. **Nature reviews Microbiology**, v. 11, n. 4, p. 239-251, 2013.

KRAUS, I; DRIESCH, C; VINOKUROVA, S; HOVIG, E; SCHNEIDER, A; VON KNEBEL DOEBERITZ, M; DÜRST, M. The majority of viral-cellular fusion transcripts in cervical carcinomas cotranscribe cellular sequences of known or predicted genes. **Cancer research**, v. 68, n. 7, p. 2514-2522, 2008.

MEDICI, A. C. Custos do tratamento do câncer no Brasil: como melhorar o foco. **Monitor de Saúde**, ano 12, n. 88, mar, 2018. Disponível em: Ming Guo, Gong Y, Deavers M et al. Evaluation of a Commercialized In Situ Hybridization Assay for Detecting Human Papillomavirus DNA in Tissue Specimens from Patients with Cervical Intraepithelial Neoplasia and Cervical Carcinoma. **J. clin. microbiol.** 2008; 46(1):274-80.

MORSHED, K. *et al.* Human Papillomavirus (HPV) - structure, epidemiology and pathogenesis. **Otolaryngologia Polska. The Polish Otolaryngology**, v. 68, n. 5, p. 213–219, out. 2014.

NAKAGAWA, M; et al. Persistence of human papillomavirus type 16 infection is associated with lack of cytotoxic T lymphocyte response to the E6 antigens. **The Journal of infectious diseases**, v. 182, n. 2, p. 595-598, 2000.

NETO, J. C. S. **Citologia Clínica do trato genital feminino**. Editora Revinter, Edição 1, 2012.

NOGUEIRA-RODRIGUES, A; DE MELO, A. C. Perspectivas no Tratamento do Câncer do Colo do Útero: explorando o bloqueio da sinalização celular. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 58, n. 3, p. 529-532, 2012.

PANCERA, T. R.; DOS SANTOS, G. H. N. Epidemiologia Molecular da infecção pelo papilomavírus humano (HPV) e câncer cervical no Brasil: Revisão Integrativa. **Revista de Patologia do Tocantins**, v. 5, n. 2, p. 79-83, 2018.

PEITSARO, PANU; JOHANSSON, BO; SYRJÄNEN, STINA. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 3, p. 886-891, 2002.

PETT, M.; COLEMAN, N. Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? **The Journal of pathology**, v. 212, n. 4, p. 356–367, ago. 2007.

RODRIGUES, A. F; SOUSA, J. A. Papilomavírus humano: prevenção e diagnóstico. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 5, n. 4, p. 197-202, 2015.

SHULZHENKO, N. *et al.* Ménage à trois: an evolutionary interplay between human papillomavirus, a tumor, and a woman. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 6, p. 345– 353, jun. 2014.

Siadat-Pajouh M, Ayscue Ah, Periasamy AHB. Introduction of a fast and sensitive fluorescent in situ hybridization method for single-copy detection of human papillomavirus (HPV) genome. *J. histochem. cytochem.* 1994; 42(11):1503-12.

SILVA, B.V; HORTA, B.A.C; ALENCASTRO, R.B; Pinto, A.C. Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. **Química nova**, v. 32, p. 453-462, 2009.

SOUTO, R; FALHARI, J. P. B; DA CRUZ, A. D. O papilomavírus humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 2, SOUZA, W.F.D; Araújo W.M.D; De-Freitas-Junior, J.C.M; Morgado-Díaz, J.A. Sinalização celular em câncer. *Cienc. Cult.* 2014.

STEGER, G.; CORBACH, S. Dose-dependent regulation of the early promoter of human papillomavirus type 18 by the viral E2 protein. **Journal of Virology**, v. 71, n. 1, p. 50–58, jan. 1997.

TERMINI, L; VILLA, L. L. Biomarcadores na triagem do câncer do colo uterino. **Brazilian Journal of Sexually Transmitted Diseases**, v. 20, n. 2, p. 125-131, 2008.

WOODMAN, C. B. J; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 1, p. 11-22, 2007.