

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

Thaís Souto Paula da Costa Neves

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE POLIMORFISMOS SOBRE A ATIVIDADE DA LCR
DE DIFERENTES VARIANTES DO PAPILOMAVIRUS HUMANO TIPO 16**

Recife
2021

Thaís Souto Paula da Costa Neves

**AValiação DO EFEITO DE POLIMORFISMOS SOBRE A ATIVIDADE DA LCR
DE DIFERENTES VARIANTES DO PAPILOMAVIRUS HUMANO TIPO 16**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Inovação
Terapêutica da Universidade Federal de
Pernambuco como parte dos requisitos
exigidos para obtenção do título de Mestre em
Inovação Terapêutica

Orientador: Dr. Antônio Carlos de Freitas

Coorientadora: Dra. Bárbara Simas Chagas

Dra. Rita de Cassia Pereira de Lima

Recife

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Neves, Thaís Souto Paula da Costa

Avaliação do efeito de polimorfismos sobre a atividade da LCR de diferentes variantes do papilomavirus humano tipo 16. / Thaís Souto Paula da Costa Neves. – 2021.

58 f.: il. col.

Orientador: Antônio Carlos de Freitas

Coorientadora: Bárbara Simas Chagas

Coorientadora: Rita de Cassia Pereira de Lima

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2021.

Inclui referências.

1. Doenças por papilomavírus 2. Papillomavirus humano 16 3. Análise de Sequência de DNA I. Freitas, Antônio Carlos de (orient.) II. Chagas, Bárbara Simas (coorient.) III. Lima, Rita de Cassia Pereira de (coorient.) IV. Título.

616.911

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2021 - 376

Elaborado por Marylu Souza - CRB-4/1564

Folha de Aprovação

Thaís Souto Paula da Costa Neves

AVALIAÇÃO DO EFEITO DE POLIMORFISMOS SOBRE A ATIVIDADE DA LCR DE DIFERENTES VARIANTES DO PAPILOMAVIRUS HUMANO TIPO 16

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Inovação
Terapêutica da Universidade Federal de
Pernambuco como parte dos requisitos
exigidos para obtenção do título de Mestre em
Inovação Terapêutica

Aprovada em: 29/01/2021

Banca Examinadora

Prof. Antonio Carlos de Freitas
Instituição: Universidade Federal de Pernambuco
Assinatura:_____

Profa. Ana Pavla Almeida Diniz Gurgel
Instituição: Universidade Federal da Paraíba
Assinatura:_____

Prof. André Luiz Santos de Jesus
Instituição: Universidade Federal de Pernambuco
Assinatura:_____

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à minha família, por todo o apoio e compreensão durante essa etapa de minha vida.

Aos membros do LEMTE, especialmente ao meu orientador, o dr. Antônio Carlos de Freitas, minhas co-orientadoras dra. Barbara e dra. Rita e a ms. Ruany, ms. Ligia, dra. Anna Jéssica.

Gostaria também de agradecer aos membros de minha banca de qualificação, dra. Ana Pavla Almeida Diniz Gurgel, dr Antônio Roberto Lucena de Araújo e aos membros da minha banca de defesa, dra. Ana Pavla Almeida Diniz Gurgel e o dr André Luiz Santos de Jesus.

A todos que fizeram parte desta caminhada, que me ajudaram, que me ensinaram, que me moldaram. Cada um que passou ajudou, de alguma forma, fazer quem eu sou hoje. Cada um deixou um pedaço de si. E a isso, sou muito grata,

Obrigada.

RESUMO

Infecções persistentes por Papilomavírus Humano (HPV) de alto risco são um dos pré-requisitos para o desenvolvimento do câncer cervical, que é a quarta causa de morte no mundo. Dentre os diferentes tipos de HPV, o HPV 16 é o mais incidente, tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento. O genoma do HPV é composto por três regiões, a Região Longa de Controle (LCR), a região *Early*, e a região *Late*. Variações na região LCR do HPV podem afetar a oncogenicidade, progressão e persistência da infecção viral, inclusive causando alterações nos sítios de ligação aos fatores transcricionais E2, YY1, NF-1 e AP1. Neste estudo, realizou-se uma avaliação dos efeitos de variantes presentes na região promotora da LCR do HPV 16 circulante no Estado de Pernambuco. Para isso, foram selecionados três isolados de diferentes variantes da LCR do HPV 16, os isolados 49, 64, e 74. Elas foram clonadas no vetor pGEM-T *Easy* e subclonadas no vetor de expressão pNL1.1 (*Nluc*), e transfectados em células HeLa. Foi realizado um modelo de ensaio de luminescência das amostras observando como as variantes de LCR afetam a expressão do gene repórter *Nluc*. Dentre os isolados estudados, o 64 (variante D), que apresenta o maior número de alterações em sítios de ligação para fatores de transcrição, foi o que mais reprimiu a expressão do gene repórter *Nluc*. O isolado 49 (variante A), que apresenta o menor número de alterações, possuiu a segunda menor expressão do gene repórter. Já o isolado 74 (variante C) foi quem menos reprimiu a atividade do gene repórter *Nluc*. A análise estatística não mostrou diferenças significativa entre as regiões LCR polimórficas, com valor de $p=0,53$. Assim, um perfil mais refinado das variantes de LCR do HPV 16 e sua importância para o prognóstico de lesões cervicais começa a ser traçado.

Palavras-chave: HPV 16; LCR; variantes

ABSTRACT

Persistent infections by high-risk human papillomavirus (HPV) are a prerequisite to the development of cervical cancer, the fourth most common cause of death worldwide. Amongst the different types of HPV, HPV 16 is the most common, in both developed and in development countries. The HPV genome is composed of three regions, the Long Control Region (LCR), the Early region, and the Late region. Variations in the LCR HPV region can affect oncogenicity, viral infection progression and persistence, and even cause alterations on binding sites to transcriptional factors E2, YY1, NF-1, and AP1. In this study, the effect of variants in the promoter LCR region of HPV 16 circling in the Estate of Pernambuco was evaluated. For that, three isolates were selected with different LCR variants from HPV 16, the isolates 49, 64, and 74. They were cloned in pGEM-T Easy vector, and then subcloned in pNL1.1 (Nluc) expression vector, then they were transfected in HeLa cells. A luminescence essay model was created to observe how LCR variants of HPV affect the reporter gene Nluc. Among the isolates studied, the 64 (variant D), which presented the highest number of alterations in binding sites to transcription factors, was the one that repressed the reporter gene Nluc the most. The isolate 49 (variant A), which presents the lowest number of alterations, had the second lowest expression of the reporter gene. The isolated 74 (variant C) was the one with the lowest repression of the reporter gene. The statistical analysis did not show significant differences between the polymorphic LCR regions, with p value of 0,53. Thus, a better, more refined profile of the HPV 16 LCR variants begins to be formed.

Keywords: HPV 16; LCR; variants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição proporcional dos dez tipos mais incidentes de câncer estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma.	17
Figura 2 – Progressão do Câncer Cervical pelo Papilomavírus Humano (HPV).	18
Figura 3 – Árvore Filogenética da família <i>Papillomaviridae</i>	20
Figura 4 – Árvore filogenética mostrando as espécies dos Alpha-PVs, baseadas no sequenciamento do gene L1.	21
Figura 5 – Organização viral do genoma do HPV 16. A figura mostra os genes de expressão <i>Early</i> e <i>Late</i> e a região regulatória (LCR).	23
Figura 6 – Representação esquemática da LCR do HPV 16.	26
Figura 7 – Árvore Filogenética de variantes do HPV 16 com base na região reguladora LCR (<i>Long Control Region</i>).	31
Figura 8 – Mapa do vetor pNL1.1	35
Figura 9 – Mapa do Vetor pCI-neo	35
Figura 10 – Representação esquemática da contagem de células utilizando um hemocitômetro e o azul de Tripán. A mostra a aplicação do Azul de Tripán. B mostra a esquemática do hemocitômetro. C apresenta a representação esquemática dos quadrantes que devem ser contados, e D mostra a forma apropriada de contar cada um dos 16 quadrados nos quadrantes.	37
Figura 11 – Representação esquemática da etapa de co-transfecção. Todos os poços foram co-transfectados com os isolados (regiões LCR polimórficas) separadamente, assim como com o plasmídeo expressando Renilla na concentração de 30 ng e o regulador transcricional E2 na concentração de 25 ng. Os três primeiros poços foram usados como controle, e neles foi co-transfectado o vetor pNL1.1 vazio, a Renilla e o E2.	38
Figura 12 – Gel representativo demonstrando a amplificação da região LCR variante com o uso de <i>primers</i> específicos LCR do HPV 16. M: Marcador 1 kb; C: Controle negativo; 1: Fragmento amplificado.	40
Figura 13 – Gel de extração da região LCR do HPV 16 das amostras 49, 64 e 74 clonadas no vetor pNL1.1.	41
Figura 14 – Gel de confirmação da clonagem das variantes 49, 64 e 74 da LCR do HPV 16 por digestão no pNL1.1. M: Marcador 1 kb; 1: Digestão enzimática.	41

Figura 15 – Demonstra que a variante 74 da LCR do HPV 16 tem maior capacidade de alterar os níveis de expressão do gene repórter Nluc, quando comparada as variantes 49 e 64 de LCR do HPV 16. A variante 64 da LCR do HPV 16 tem menor capacidade de alterar os níveis de expressão do gene Nluc, em comparação com as outras variantes. Comparando com o vetor pNL1.1 vazio, a expressão do gene Nluc nas três variantes foi menor do que a do vetor.42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Variabilidade genética da LCR dos isolados de HPV 16. Os nucleotídeos conservados em relação à sequência de referência (K02718.1) estão marcados com pontos.

Referência: sequência protótipo do HPV 16.32

Tabela 2 – Primers usados na amplificação das regiões de LCR variantes do HPV 16.....33

LISTA DE ABREVIACÕES

µL	microlitros
16E5	Proteína E5 do HPV 16
AA	Asiático-Americano
Af-1	Africano 1
Af-2	Africano-2
AP1	Proteína Ativadora 1
As	Asiático
ASC-H	Células escamosas atípicas de lesão epitelial escamosa de alto grau
ASC-US	Células escamosas atípicas de significado indeterminado
BPV	<i>Bovine papillomavirus</i>
BSA	Albumina de Soro Bovino
C/EBP	Proteína de ligação à sequência CCAAT
CB	Centro de Biociências
COPV	<i>Canine Oral Papillomavirus</i>
CRPV	<i>Cottontail Rabbit Papillomavirus</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
kb	quilobases
E	Early
E	Europeu
EGFR	Fator de crescimento epitelial
HLA	Antígeno leucocitário humano

HPV	Papilomavírus humano
HR HPV	HPV de alto risco
HSIL	Lesão epitelial escamosa de alto grau
HSPGs	Receptores heparon sulfato
hTERT	Telomerase reversa humana
IL10	Interleucinas
L	Late
LABCEN	Laboratório Central
LB	Meio Luria-Bertani
LCR	Região Longa de Controle
LR-HPV	HPV de baixo risco
LSIL	Lesão Epitelial Escamosa de Baixo Grau
MDM2	<i>Murine Double Minute 2</i>
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
mL	Mililitros
MMP9	Matriz Metaloproteinase 9
NF-1	Fator nuclear 1
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
NIC I	Neoplasia intraepitelial cervical grau 1
NIC II	Neoplasia intraepitelial cervical grau2
NIC III	Neoplasia intraepitelial cervical grau3
Oct-1	Fator de ligação à octameros

OMS	Organização mundial de saúde
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
Ori	Origem de replicação
Pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia de polimerase
pRB	Proteínas do retinoblastoma
PV	Papilomavírus
RNA	Ácido ribonucleico
SIL	Lesões intraepiteliais escamosas
SP1	Fator transcricional promotor seletivo 1
TNF	Fator de necrose tumoral
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
YY1	Fator yin-yang

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 CÂNCER CERVICAL E INFECÇÃO PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO.....	17
2.2 CLASSIFICAÇÃO DOS PAPILOMAVÍRUS	19
2.3 DISTRIBUIÇÃO DO HPV	22
2.4 ORGANIZAÇÃO DO GENOMA VIRAL	22
2.5 CICLO DE INFECÇÃO VIRAL	24
2.6 REGIÃO LCR E FATORES TRANSCRICIONAIS	25
2.7 VARIANTES DO HPV.....	26
3 JUSTIFICATIVA.....	28
4 OBJETIVOS	29
4.1 OBJETIVO GERAL	29
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
5 METODOLOGIA	30
5.1 VARIAÇÕES NUCLEOTÍDICAS AVALIADAS	30
5.2 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO LCR	32
5.3 CLONAGEM DOS AMPLICONS.....	33
5.4 REAÇÃO DE DIGESTÃO DO DNA PLASMIDIAL	34
5.5 SUBCLONAGEM DA REGIÃO LCR (VARIANTES)	34
5.6 TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA	36
5.7 SEQUENCIAMENTO DO DNA E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS.....	36
5.8 CULTIVO E TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS EUCARIÓTICAS	36
5.9 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DIRIGIDA PELA LCR	38
5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
6 RESULTADOS PARCIAIS.....	40
6.1 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO LCR DO HPV16	40
6.2 CLONAGEM, SUBCLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DAS SEQUÊNCIAS VARIANTES DA REGIÃO LCR DO HPV16	40

6.3 ENSAIOS DE LUCIFERASE	42
7 DISCUSSÃO	43
8 CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

O quarto tipo de neoplasia mais frequente em mulheres do mundo todo é o câncer cervical. O INCA estimou para o triênio de 2020-2022 no Brasil o surgimento de 16.590 novos casos deste tipo de neoplasia. Dentre as regiões do Brasil, o Nordeste está em terceiro lugar em termos de incidência de casos de câncer cervical, e em Recife, o número de casos novos supera a taxa nacional, com uma taxa bruta de 22,13 novos casos por 100 mil habitantes (INCA, 2020).

Um dos pré-requisitos para o desenvolvimento do câncer cervical e de lesões pré-cancerosas é o Papilomavírus humano (HPV) (zur Hausen, 2002). O HPV é um vírus de DNA de fita dupla pertencente à família *Papillomaviridae* (Bernard et al., 2010; Burk et al., 2013; de Villiers et al., 2004) que possui afinidade por células mucoides ou cutâneas no tecido epitelial. A principal forma de transmissão desse vírus é por meio do contato sexual (Souto et al., 2005). Com um genoma de aproximadamente 8kb, o HPV é composto por três regiões: A região de expressão tardia (*Late*), a região de expressão precoce (*Early*) e a região LCR (Região Longa de Controle). É na região LCR onde as sequências regulatórias da transcrição viral são encontradas e onde há a origem da replicação dos genes *Early* (E1, E2, E5, E6, E7) e *Late* (L1 e L2), que recebem estes nomes de acordo com sua ordem de expressão ao longo do ciclo infeccioso do vírus (Favre & Orth, 1997; Sichero, L; Sobrinho, J. S; Villa, L. L, 2012)

O HPV possui mais de 220 tipos diferentes caracterizados (Bernard et al., 2010). Dentre os diferentes tipos de HPV, o HPV 16 é o mais associado ao desenvolvimento do câncer cervical mundialmente, apesar de apenas uma pequena parcela das lesões por HPV 16 vir a evoluir em câncer (Hang et al., 2014).

Variantes intratipo de HPV são definidas como tendo mais de 98% de identidade de sequência nucleotídica determinada sobre ORFs (*Open Reading Frames*) E6, E7 e L1 com a sequência de referência, também denominada de protótipo (Bernard, 2005). Sequências variantes de um mesmo tipo de HPV podem diferir umas das outras em menos de 2% no gene L1 e em até 5% na região não codificante da LCR (de Villiers et al., 2004; Ho et al., 1993). Por serem mais predominantes no mundo inteiro, variantes intratipo de HPV 16 e 18 foram muito estudadas e acredita-se que elas possuam diferente potencial oncótico (Bernard et al., 2006; Schiffman et al., 2010). Além disso, a associação entre o risco de lesões de alto grau

prevalentes e incidentes e as variantes intratipo de HPV 16 e HPV 18 foram demonstrada em estudos (Sichero et al., 2007; Xi et al., 1997).

Variações da região LCR do HPV podem influenciar a progressão do câncer cervical e resultar na perda da capacidade de ligação entre os fatores transcricionais E2, YY1, NF-1, AP1. Estudos sugerem que variações na LCR conferem um aumento no risco de infecções persistentes causadas pelos tipos de HPV 16, 18, 33 (Gagnon et al., 2004) e 58 (Raiol et al., 2011). Outros estudos têm apontado uma associação entre as variantes não europeias e um maior risco de desenvolvimento de lesões de alto grau de displasia (Sichero et al., 2007). Entretanto, apesar da importância do conhecimento da variabilidade genética da região LCR em variantes de HPV, existem poucos estudos realizados em amostras brasileiras. Por isso, o presente estudo busca avaliar os efeitos de polimorfismos em variantes da região promotora (LCR) do HPV 16 extraídas de mulheres residentes no Estado de Pernambuco.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Câncer Cervical e infecção pelo Papilomavírus humano

O câncer cervical é o quarto tipo de neoplasia mais prevalente em mulheres no mundo, com 570.000 casos diagnosticados em 2018 de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), e responsável pela morte de 311.000 mulheres. Por isso, ele foi classificado como um grave problema de saúde pública. No Brasil, estima-se que a incidência de novos casos de câncer cervical no triênio de 2020-2022 será de 16.590 (Figura 1), sendo o terceiro mais incidente na Região Norte (21,20/100mil pessoas), Região Nordeste (17,62/100 mil pessoas) e Região Centro Oeste (15,92/100 mil pessoas) (INCA, 2020).

Figura 1 – Distribuição proporcional dos dez tipos mais incidentes de câncer estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma.

Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%			Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

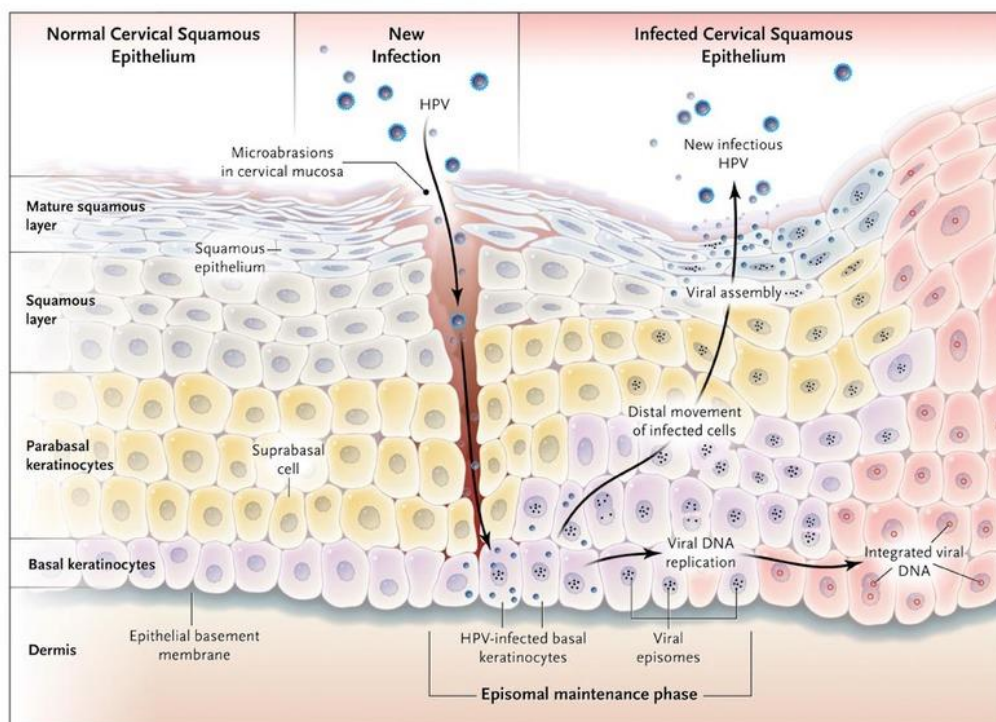
Fonte: INCA (2020)

A infecção persistente por certos tipos de HPVs está associada a progressão das lesões cervicais e ao câncer cervical (Sichero et al, 2007; Woodman et al, 2007; Villa et al, 2000). A evolução de lesões pré-malignas não invasivas, denominadas neoplasias intraepiteliais cervicais – NIC (*cervical intraepithelial neoplasia* – *CIN*) ou de lesões intraepiteliais escamosas (*squamous intraepithelial lesions* – *SIL*), em câncer cervical pode ser prevenida caso as lesões sejam diagnosticadas previamente e tratadas. O diagnóstico dessas lesões pode ser feito por meio de exame citológico das células cervicais esfoliativas e será confirmado por meio de exame histológico. Quando diagnosticado, o câncer cervical é uma das formas de câncer que possui maior taxa de sucesso de tratamento, desde que seja

detectado cedo e tratado de forma apropriada e, mesmo em estágios mais avançados, ele pode ser controlado com tratamento apropriado e cuidado paliativo (OMS, 2014).

As alterações histológicas são classificadas de acordo com a morfologia e o grau progressivo das células epiteliais em: displasia leve (NIC I – neoplasia intraepitelial cervical grau 1); displasia moderada (NIC II – neoplasia intraepitelial cervical grau 2) e displasia severa (NIC III – neoplasia intraepitelial cervical grau 3), a qual pode progredir para câncer invasivo (carcinoma *in situ*) (Li et al., 2011; Woodman et al., 2007) (Figura 2). De acordo com a classificação citológica, a lesão epitelial escamosa de baixo grau (LSIL) é correspondente ao NIC I e a lesão epitelial escamosa de alto grau (HSIL) corresponde aos NIC II e NIC III. Quando não é possível realizar o diagnóstico de NICII e NICIII, podem ser encontradas células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US) e células escamosas atípicas HSIL (ASC-H).

Figura 2 – Progressão do Câncer Cervical pelo Papilomavírus Humano (HPV).



Fonte: Jessica A. Kahn, 2009

A infecção por HPV é transmitida sexualmente e, apesar da frequência de infecções, muitas vezes o organismo consegue combatê-las espontaneamente, o que ocasiona alterações

citológicas e histológicas menores e transitórias ou, até mesmo, subclínicas (Bosch et al., 2002).

Cerca de 99,7% dos tumores de colo de útero estão associados com o HPV (Muñoz et al., 2006). Entretanto, apenas apresentar a infecção por HPV de alto risco não é considerado um fato suficiente para imortalizar as células epiteliais do hospedeiro. São necessárias alterações genéticas e epigenéticas para que haja o desenvolvimento da carcinogênese. Tais fatores podem alterar o ciclo celular, o que pode resultar na célula hospedeira adquirindo características malignas e invasivas (Saavedra et al., 2012).

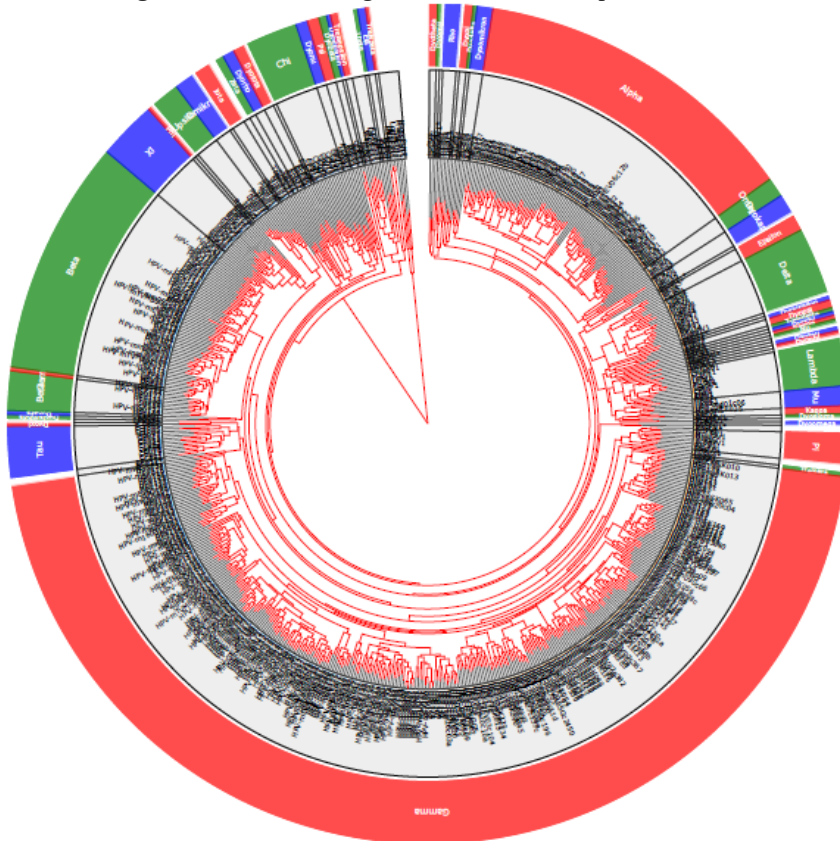
2.2 Classificação dos Papilomavírus

O Papilomavírus (PVs) é pertencente à família *Papillomaviridae* e possui a capacidade de infectar humanos e outros mamíferos, assim como aves e reptéis. Tais papilomavírus recebem sua denominação de acordo com o hospedeiro do qual o genoma PV foi isolado: CRPV (*Cottontail Rabbit Papillomavirus*), que infecta coelhos, COPV (*Canine Oral Papillomavirus*), que infecta cães, BPV (*Bovine Papillomavirus*) que infectam bovinos e HPV (*Human Papillomavirus*), que infecta humanos (Scheurer et al., 2005; Bernard et al., 2010).

O Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus estabeleceu a classificação do papilomavírus de acordo com a sequência nucleotídica do gene L1, o que tornou possível o agrupamento dos PVs em gênero e espécie (de Villiers et al., 2005; Kalantari et al., 2010). Porém, a análise de um único gene não é suficiente para classificar as variantes. Por isso, para nomear uma variante é necessário que seja realizado o estudo do genoma completo. Uma sequência vai ser agrupada em variante quando a sequência nucleotídica da região L1 diferir de 1 a 10% em relação à sequência de referência, e em sublinhagem quando variar entre 0,5 a 1% (Burk et al., 2013; Ziguí et al., 2015).

Os HPVs podem ser divididos em cinco gêneros (Figura 3): *Alphapapilomavírus*, *Betapapilomavírus*, *Gammapapilomavirus*, *Mupapilomavírus* e *Nupapilomavírus* (Bernard et al., 2010; de Villiers et al., 2004).

Figura 3 – Árvore Filogenética da família *Papillomaviridae*.

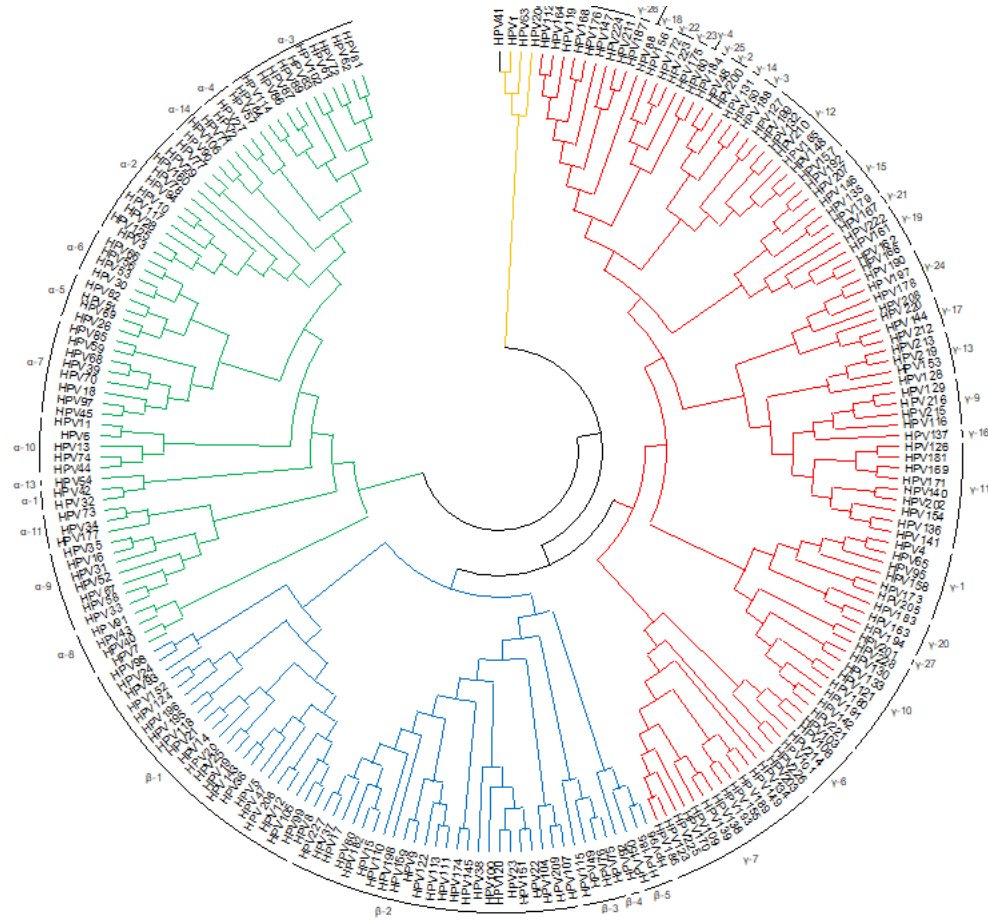


. Fonte: <https://pave.niaid.nih.gov/treeviewer.html#main/> (2020)

Dentre os mais de 200 tipos de HPV que já foram identificados (Hampson et al., 2020) aproximadamente 60 desses são predominantemente detectados na mucosa epitelial e pertencem ao gênero Alpha Papillomavirus (alpha-PV) (Bernard et al., 2010, Burk et al., 2013, de Villiers et al., 2004,).

Os Alpha Papilomavírus (Figura 4) são divididos de acordo com o potencial para desenvolvimento de câncer na região genital em: altamente carcinogênicos HPVs 16, 18, 31, 33, 45, 51 e 52; provavelmente carcinogênico HPV 68; possivelmente carcinogênico HPVs 26, 53, 64, 65, 66, 67, 69, 70, 73 e 82. Outros membros estão, também, frequentemente associados a lesões benignas na região genital e não genital, tais como o HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81 e 89 (Cubie, 2013; Schiffman et al., 2009).

Figura 4 – Árvore filogenética mostrando as espécies dos Alpha-PVs, baseadas no sequenciamento do gene L1.



Fonte: https://www.hpvcenter.se/human_reference_clones/ (2020)

A maioria dos tipos oncogênicos ou de alto risco associados com câncer cervical invasivo (Burk et al., 2013, Li et al., 2011, Munoz et al., 2003, Smith et al., 2007) são agrupados em uma clade de alpha-HPVs que contêm espécies dos grupos alpha-5, alpha-6, alpha-7, e alpha-9 (Burk et al., 2009, 2013, Schiffman et al., 2005) e acometem cerca de 90% de todos os casos de câncer cervical no mundo (Burk et al., 2013, Li et al., 2011, Smith et al., 2007). Os HPVs dos gêneros Gama, Mu e Nu são mais associados a papilomas cutâneos e verrugas sem progressão maligna. Já os HPVs do gênero Beta são mais frequentemente relacionados a infecções cutâneas (de Villiers et al., 2004) ou com infecções de pele (Freitas et al., 2012).

2.3 Distribuição do HPV

A distribuição dos genótipos do HPV varia entre áreas geográficas (Bosch et al., 1995; Clifford et al., 2005; de Martel et al., 2017; de Sanjosé et al., 2007; Walboomers et al., 1999). O HPV 16 é o tipo mais comum encontrado mundialmente, seguido pelo HPV 18 na Europa, América Central e América do Sul e pelos HPVs 33, 52, 56 e 58 na Ásia (Bosch et al., 1995; Clifford et al., 2003; Clifford et al., 2005; de Sanjosé et al., 2007; de Martel et al., 2017).

Os quatro tipos mais frequentes de HPVs em mulheres sem lesões cervicais são os HPVs 16, 18, 31 e 52. A frequência de certos tipos de HPVs, entretanto, pode mudar de acordo com o grau de lesão cervical, os tipos dos casos de câncer cervical e a região geográfica onde as pacientes residem. Nos países em desenvolvimento, os genótipos mais prevalentes são os HPVs 16, 18, 58 e 33, enquanto nos países desenvolvidos há a prevalência dos genótipos 16, 18, 33 e 31 (de Sanjose et al., 2010).

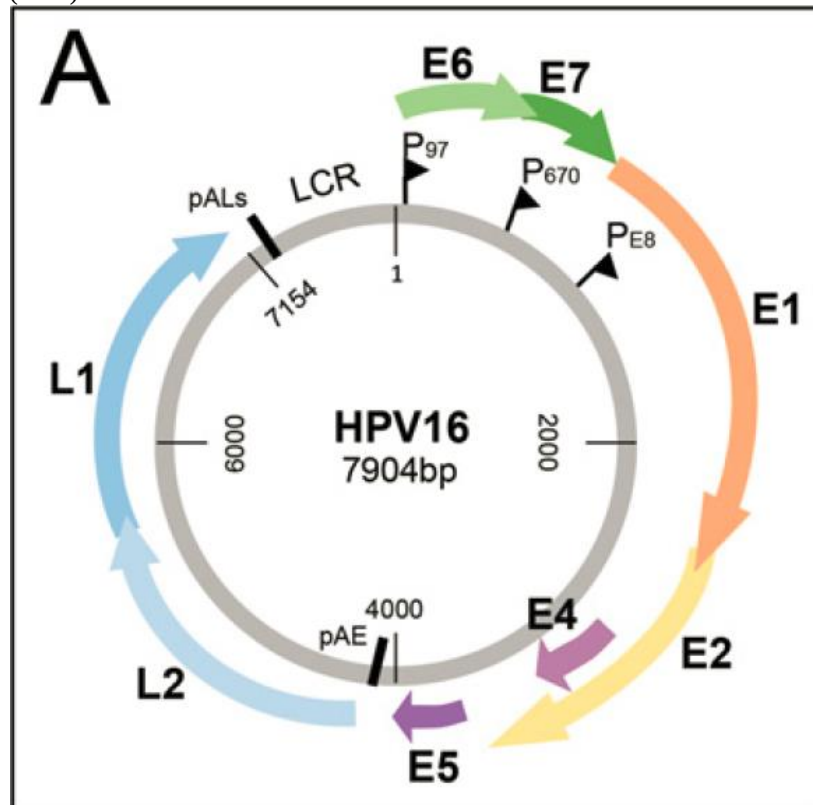
Em Recife (Pernambuco), o HPV 16 é o tipo mais frequentemente detectado, seguido pelos tipos HPV 31, HPV 33 e HPV 58 (Baldez da Silva et al., 2009; Lorenzato et al., 2000). Acredita-se que a diferença na distribuição dos HPVs pode ocorrer devido ao processo de migração de pessoas, uma vez que este contribui para uma maior diversidade populacional. (Barzon et al., 2008; Bosch et al., 1995).

2.4 Organização do genoma viral

O Papilomavírus humano (HPV) é um vírus de fita dupla de ácido desoxirribonucleico (DNA) que contém cerca de 8.000 pares de bases em formato circular associado às histonas celulares (Tan et al., 1998; zur Hausen 1996). O genoma do HPV (Figura 5) possui cerca de 8 quadros abertos de leitura (*Open Reading Frames* – ORFs), sequências que são expressas na fase precoce (E) e tardia (L) da diferenciação da célula hospedeira ao longo da infecção codificando proteínas não estruturais e estruturais, respectivamente (Graham, 2010). As proteínas *Early* (E – de expressão precoce) são responsáveis pela replicação viral, transformação celular e pelo controle transcricional. Os genes expressos nesta fase são denominados: E1, E2, E4, E5, E6 e E7. As proteínas E são expressas logo após a infecção quando ocorre a indução e síntese de DNA. Os genes

expressos na fase *Late* (L - de expressão tardia) são genes estruturais, denominados L1 e L2. Essas proteínas estruturais do HPV têm como função codificar proteínas do capsídeo viral sendo, por isso, expressas em estágios posteriores (Burd, 2003; Fehrman & Laimins, 2003; zur Hausen, 1996).

Figura 5 – Organização viral do genoma do HPV 16. A figura mostra os genes de expressão *Early* e *Late* e a região regulatória (LCR).



Fonte: Graham, 2017.

Além destes dois grupos de genes, o DNA do HPV contém uma região não traduzida: a LCR (*Long Control Region*), a qual regula a transcrição e replicação viral. A LCR está situada entre os genes L1 e E6 (Figura 5), e contém diversos sítios de ligação para fatores transcricionais celular e viral, assim como regiões promotoras e uma região de replicação do DNA viral, além de uma sequência de origem de replicação (Burd, 2003; Burk et al., 2013; Chen et al., 2011; Kisseljov, 2000; Schwarts, 2013; Silva, 2003; Smith et al., 2011; zur Hausen 1996; zur Hausen 2002). A região LCR é uma região em que variações podem influenciar a progressão do câncer cervical e resultar na perda da capacidade de ligação dos fatores transcricionais E2, YY1, NF-1, AP1.

2.5 Ciclo de infecção viral

Não se sabe exatamente o mecanismo pelo qual o HPV entra na célula nem os receptores envolvidos neste processo, entretanto, a hipótese mais aceita atualmente é que a proteína L1 do HPV interage com os receptores Heparon sulfato (HSPGs) e outros componentes de membrana das células basais das mucosas anogenitais, tais como a laminina (Doorbar et al., 2012; Johnson et al., 2009; Sapp e Day, 2009). Estas moléculas atuam como receptores primários deste vírus e podem ser encontradas na superfície celular dos queratinócitos. Após a ligação do vírus a essas moléculas, alterações conformacionais ocorrem que resultam na exposição da região amino terminal da proteína L2. A exposição dessa região permite a ação da furina convertase, que cliva uma região de L2, o que resulta em uma segunda alteração conformacional. Esta alteração conformacional vai expor o sítio de ligação para um segundo co-receptor, que se acredita ser o $\alpha 6$ integrina. O genoma viral vai entrar nos queratinócitos por meio de endocitose. Após a entrada do vírus na célula hospedeira, as vesículas de endocitose serão acidificadas, o que leva a desencapsidação do genoma viral. O genoma dos HPVs migra para o núcleo da célula, assumindo a forma episomal e assim tem início o ciclo de replicação viral, com a expressão dos genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7 (Combita et al., 2001; Doorbar et al., 2012; Giroglou et al., 2001; Johnson et al., 2009; Sapp e Day 2009; Woodman et al., 2007).

A expressão gênica e o ciclo de infecção dos HPVs acompanham o ciclo de diferenciação dos queratinócitos, desde a camada basal até o estrato córneo. Depois que o HPV entra na célula hospedeira, as proteínas E1 e E2 regulam a replicação do genoma viral em baixos níveis. Durante a divisão celular, há o início do processo de diferenciação celular quando algumas células filhas se deslocam para o estrato superior das camadas da mucosa. Neste estágio, a transcrição dos genes da fase tardia do ciclo de infecção inicia-se pelo genoma viral, devido principalmente a proteína E2 do HPV. A proteína E2 vai regular dois promotores no genoma viral, o p97 (localizado na região 3' da LCR) e o promotor dependente de diferenciação p670 (localizado no gene E7). Quando o promotor p670 é ativado, há o aumento dos níveis de E2 que, por sua vez, inibe o promotor p97, responsável pela expressão dos genes da fase inicial, permitindo a expressão dos genes da fase tardia do ciclo de replicação viral, os quais incluem a expressão dos genes E4, L1 e L2. As partículas virais vão,

então, ser liberadas com a ajuda da proteína E4, que desmancha a rede de citoqueratina, permitindo a liberação do vírus (Bernard, 2013; Doorbar, 2013; McBride, 2013).

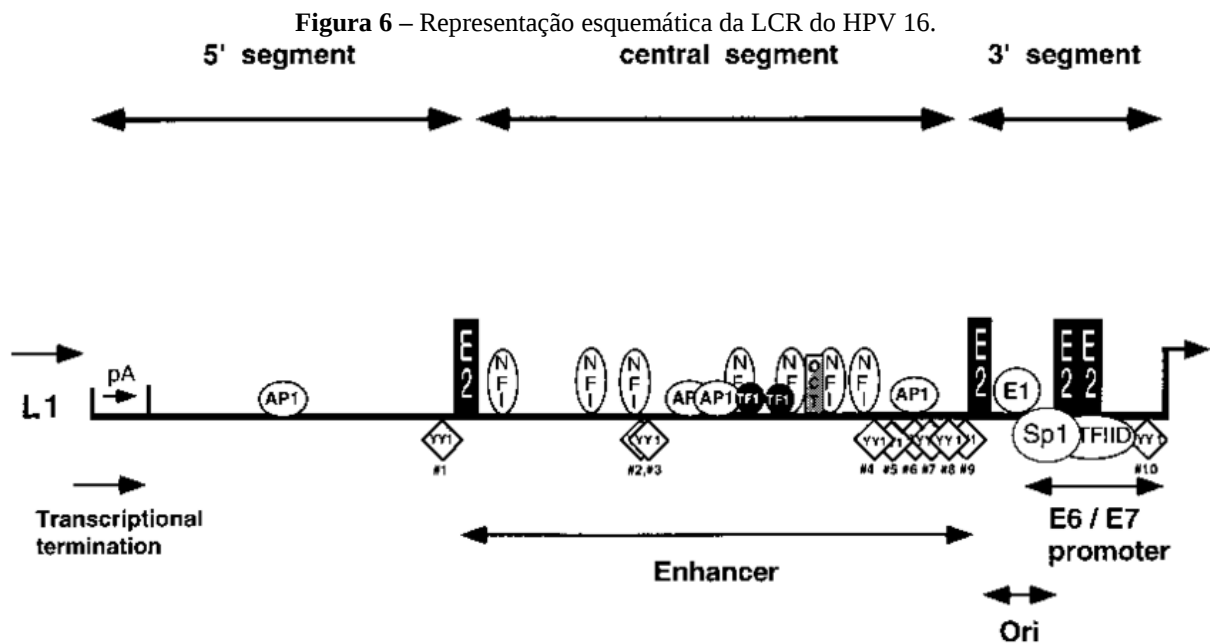
2.6 Região LCR e fatores transcrpcionais

A LCR contém os promotores p97 (HPV 16 e HPV 31), p105 (HPV18) e p99 (HPV31) além da origem de replicação (ori) e sítios numerosos de ligação para fatores transcrpcionais celular e viral. A LCR é dividida em três segmentos: A região 5', o segmento central e a região 3'. Além de possuir quatro sítios de ligação ACCGNNNNCGGT para o fator transcrpcional viral E2 (Bernard, 2013; O'Connor; 1995).

Na região 5' da LCR há um sítio de ligação de terminação AATAAA da síntese dos genes L1 e L2, localizados 100pb *downstream* do término do gene L1. Existem sítios de ligação nessa região para alguns fatores transcrpcionais, tais como o E2, proteína ativadora 1 (AP1) e fator yin-yang (YY1) (Bernard, 2013).

Na região 3' da LCR estão contidos os promotores para a transcrição dos genes de fase precoce E6 e E7 e a região TATAAA box, localizados de 21 a 26pb *upstream* E6, onde a RNA polimerase II se liga. Essa região também possui uma segunda TATA box, localizada de 32 a 37pb *upstream* E6, que é o sítio de ligação do fator transcrpcional E2 que reprime a transcrição, e o fator transcrpcional promotor seletivo 1 (*selective promoter* 1 – SP1), o qual ativa a transcrição. SP1 e E2 competem, pois, pelo sítio de ligação, regulando a síntese do DNA viral. O YY1 se liga próximo ao promotor p97 e, assim, diminui a expressão dos oncogenes E6 e E7.

A região central da LCR contém os *enhancers* epitélio específicos e é por esse motivo que esse grupo dificilmente infecta outros tipos de célula. Esta região contém diversos sítios de ligação para vários fatores de transcrição celular que vão modular a expressão dos genes virais, como o AP-1, fator nuclear 1 (NF1), fator de ligação à octameros (Oct-1), YY1 e o C/EBP beta (Bernard, 2013) (Figura 6).



2.7 Variantes do HPV

Variações genéticas observadas nos HPVs provavelmente não foram resultado de recombinação genética, mas sim do acúmulo de alterações nucleotídicas, em um processo chamado de fixação de linhagem (variante). Acredita-se, pois, que a acumulação de mutações leva a especiação dos HPVs, o que permite classificá-los em tipos, linhagens e sublinhagens (Burk et al., 2013; Cornet et al., 2012, 2013; Smith et al., 2011).

Os HPVs 16, 18, 31, 33 e 58 foram recentemente reclassificados em variantes e sublinhagens. Por exemplo, o HPV 16 possui 4 variantes (A, B, C, D) e nove sublinhagens (Burk et al., 2013; Cornet et al., 2012; Smith et al., 2011). Entre as variantes da LCR do HPV 16, as variante B, C e D são consideradas mais oncogênicas do que a variante A (Burk et al 2013).

Variantes de HPV que possuem um potencial oncogênico maior que outras variantes podem ser advindas de substituições de nucleotídeos (Chagas et al., 2011, 2013; de Freitas et al., 2012; Gurgel et al., 2013). Uma mudança de nucleotídeo nos oncogenes E6 e E7, por exemplo, pode alterar a ligação com proteínas celulares, interferindo na degradação e fosforilação da p53 e pRB, respectivamente (Chagas et al., 2011, 2013; Villa et al., 2000). Por sua vez, polimorfismos na região LCR podem alterar a ligação de fatores de transcrição

(Cornet et al., 2012; Raiol et al., 2009), por exemplo, alterações nos sítios de ligação para a proteína E2, que é primariamente um repressor transcricional, reduzem a repressão do E2 mediada pela p97 (Romanczuk et al., 1990; Soeda, et al., 2006; Xi et al., 2017), já deleções ou mutações nos sítios de ligação da YY1 levam a super expressão de oncogenes virais e progressão tumoral (Dong et al., 1994; Pande et al., 2008; Xi et al., 2017).

O fator NF-1 ativa a expressão dos oncogenes virais (Sichero; Sobrinho; Villa, 2012). O Oct-1 quando super expresso resulta na diminuição da atividade do *enhancer* do HPV (O'Connor M, 1995). Variações no sítio do fator transcricional C/EBP beta podem diminuir a atividade do promotor viral p99 (SEN et al., 2002).

Em trabalho realizado com amostras de LCR do HPV 16 de mulheres Tailandesas (Pietong et al., 2013), sublinhagens das variantes A e D foram comparadas com o protótipo, e os resultados mostraram que a LCR em todas as linhagens de HPV estudadas tinham atividade transcricional maior do que no protótipo.

3 JUSTIFICATIVA

Declarado pela Organização Mundial de Saúde como um problema de saúde pública, o câncer cervical possui alta incidência em mulheres no mundo. A principal causa desse tipo de neoplasia é a presença de infecções persistentes por HPV, que quando não tratada, pode evoluir em câncer.

Dos diferentes tipos de HPV, o HPV 16 é o mais prevalente e o mais associado a casos de neoplasias cervicais, entretanto apenas apresentar a infecção por HPV 16 não é o suficiente para o desenvolvimento do câncer. Estudos mostram que a Região Longa de Controle (LCR) do HPV 16 é a região mais variável do genoma do HPV 16 e que essas variações podem ter um papel importante na progressão viral e no desenvolvimento de câncer cervical, além de resultar na perda de ligação dos fatores transcricionais E2, YY1, NF-1 e Oct1, que podem causar a super expressão ou a repressão de oncogenes virais e progressão tumoral.

Este estudo buscou entender se as variantes da região LCR do HPV 16 na população de Pernambuco estão relacionadas com o alto número de casos de câncer cervical no estado.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito na atividade de variantes da região promotora (LCR) do HPV 16 circulantes no estado de Pernambuco.

4.2 Objetivos específicos

- Obter vetores de expressão contendo as variantes da região LCR do HPV16;
- Analisar a expressão condicionada a região LCR polimórfica da variante de HPV16;
- Relacionar os resultados das atividades de diferentes LCR obtidos por meio de modelo de ensaio de luminescência *Nluc* com os polimorfismos encontrados nelas.

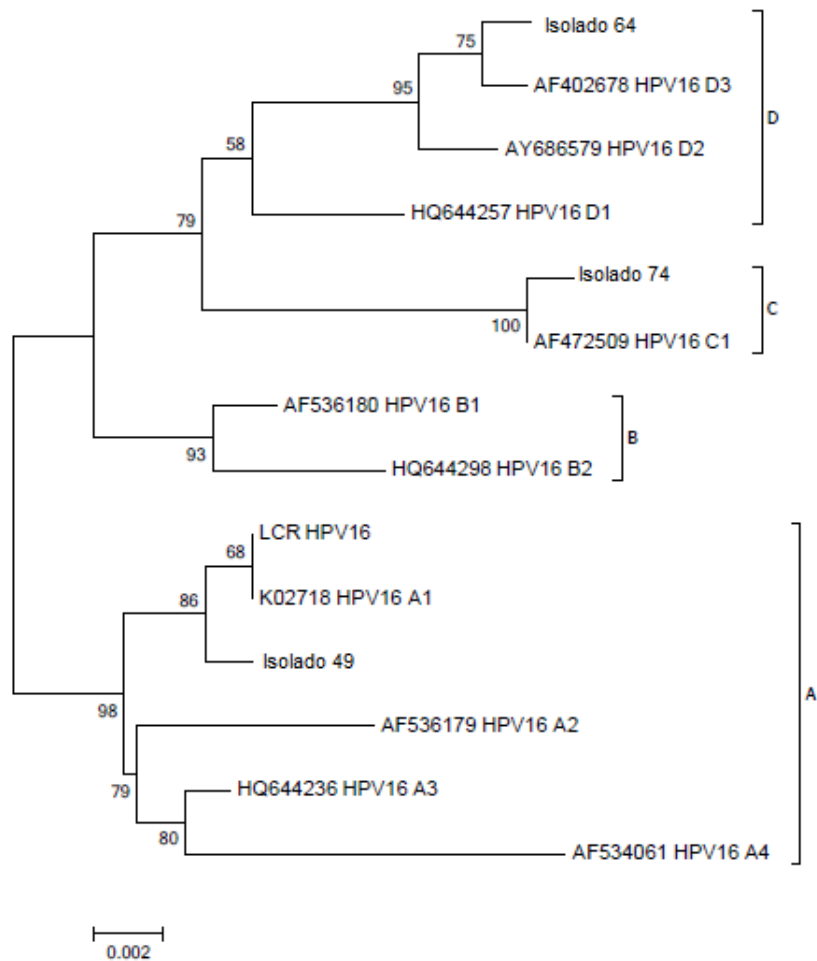
5 METODOLOGIA

5.1 Variações nucleotídicas avaliadas

As amostras utilizadas para o processo de clonagem da LCR do HPV16 foram previamente identificadas em um trabalho já publicado intitulado *Prevalence of Human Papillomavirus Variants and Genetic Diversity in the L1 Gene and Long Control Region of HPV 16, HPV 31 and HPV 58 found in the North-East Brazil* (Gurgel et al., 2015).

Neste estudo foram analisadas três variantes da LCR do HPV16; a LCR do isolado 49 pertence a variante A, a do isolado 64 pertence a variante D e a do isolado 74 pertence a variante C como pode ser visto na árvore filogenética (Figura 07). Nas pacientes de onde essas variantes foram encontradas, as amostras 49 e 74 vieram de pacientes que possuíam NIC I, já a amostra 64 foi encontrada em pacientes com NIC II.

Figura 7 – Árvore Filogenética de variantes do HPV 16 com base na região reguladora LCR (*Long Control Region*).



Fonte: Gurgel et al., 2015

A Tabela 1 mostra as variações nucleotídicas presentes na LCR dos três isolados (49, 64 e 74) selecionados para este trabalho. O isolado 49 apresentou alteração em um dos sítios de ligação para YY1. O isolado 64 apresentou três alterações em sítios de ligação para o YY1, além de duas alterações em sítios de ligação para NF-1, uma alteração para o fator E2, uma para o Oct-1 e uma para o C/EBP beta. O isolado 74 apresentou alterações em três sítios para o fator YY1 e dois para o NF-1. Os três isolados apresentaram deleção de A na posição 7862 da região LCR, indicando uma alteração no sítio E2 de todos os três isolados.

Tabela 1 – Variabilidade genética da LCR dos isolados de HPV 16. Os nucleotídeos conservados em relação à sequência de referência (K02718.1) estão marcados com pontos. Referência: sequência protótipo do HPV 16.

LCR HPV16										
	7434	7436	7485	7521	7690	7730	7768	7790	7869	7891
Referência	*	C	A	G	C	A	C	C	A	C
Isolado 49	C	G	.	.	.	.	.	.	*	.
Isolado 64	C	G	C	A	A	T	T	T	*	G
Isolado 74	C	G	C	A	.	.	T	T	*	.
Fator transcricional	NF-1, YY1	YY1	NF-1	YY1	E2	Oct-1	NF-1	YY1	E2	C/EBP beta

* Inserção de C na posição 7432 da região LCR.

* Deleção de A na posição 7862 da região LCR.

Fonte: Gurgel et al., 2015

5.2 Amplificação da região LCR

Inicialmente, três amostras clínicas positivas para HPV16 (isolados 49, 64 e 74), contendo polimorfismos na LCR de diferentes variantes (variantes A, D e C) e o genoma do HPV, foram usados nas reações de amplificação da região LCR.

A reação de PCR foi realizada utilizando 5µL do DNA das amostras (50 ng/µL), 4,5µL de água milli-Q, 1,5µL do *primer Forward* (10 µM), 1,5 µL do *primer Reverse* (10 µM) (Tabela 2) e 12,5µL do Master Mix (Promega). As amostras, juntamente com um controle negativo, foram submetidas a 35 ciclos de amplificação (94 °C por 5 minutos, 94 °C por 1 minuto, 61,5 °C por 1 minuto, 72 °C por 1minuto e 30 segundos e 72 °C por 7 minutos) para a PCR.

Após a amplificação, foi realizada a eletroforese em gel de Agarose 1%, corado com brometo de etídio para análise qualitativa da PCR, observando também se havia presença de padrões de banda inespecíficos antes da realização da purificação dos produtos da PCR.

A purificação dos produtos da PCR foi realizada utilizando o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up system* da Promega, seguindo o protocolo com instruções do fabricante.

Tabela 2 – Primers usados na amplificação das regiões de LCR variantes do HPV 16.

<i>Primers</i>	<i>Sequência dos oligonucleotídeos (5'-3')</i>	<i>Amplicon</i>	<i>Temperatura de anelamento</i>
LCR HPV	F: *CTCGAGAGACCTAGATCAGTTTC	970	53,5°C
16	R: **AAGCTTGCAGTAACTGTTGCTTGC		

*Verde: Sítio de restrição para enzima XhoI.

**Azul: Sítio de restrição para enzima HindIII.

5.3 Clonagem dos amplicons

Após a purificação, cada produto de PCR foi ligado ao vetor pGEM-T *easy* (Promega), em uma reação na qual foram utilizados 12,5µL de Ligase Buffer, 3 µL de T4 Ligase, 3 µL do vetor e 10 µL do inserto. A reação de ligação foi incubada a 8°C por um período de 16 horas.

A transformação bacteriana foi realizada utilizando células competentes de *Escherichia coli* da linhagem DH5α. Adicionou-se 50µL de células competentes a 10µL da reação de ligação. Uma vez homogeneizada, a solução foi mantida no gelo por 15 minutos, seguido imediatamente de um choque térmico no Thermoblock a 42 °C por 5 minutos. Posteriormente, adicionou-se 1mL do meio LB (Luria-Bertani) líquido ao produto da transformação e ele foi incubado por 1 hora a 37 °C. Depois de incubar por uma hora, realizou-se o *spread plate* em placas de petri com meio LB Ágar com o antibiótico ampicilina (100 µL/mL), que é deixado *overnight* a 37 °C.

As colônias que cresceram foram isoladas e repicadas, sendo plaqueadas e incubadas *overnight*. As novas placas que tiverem repiques com melhor crescimento foram selecionadas e os repiques foram inoculados em 5mL de LB líquido com ampicilina para crescimento *overnight* a 37 °C. A extração de DNA plasmidial ocorreu seguindo o protocolo de fabricação do Promega e foi realizada a partir do inóculo.

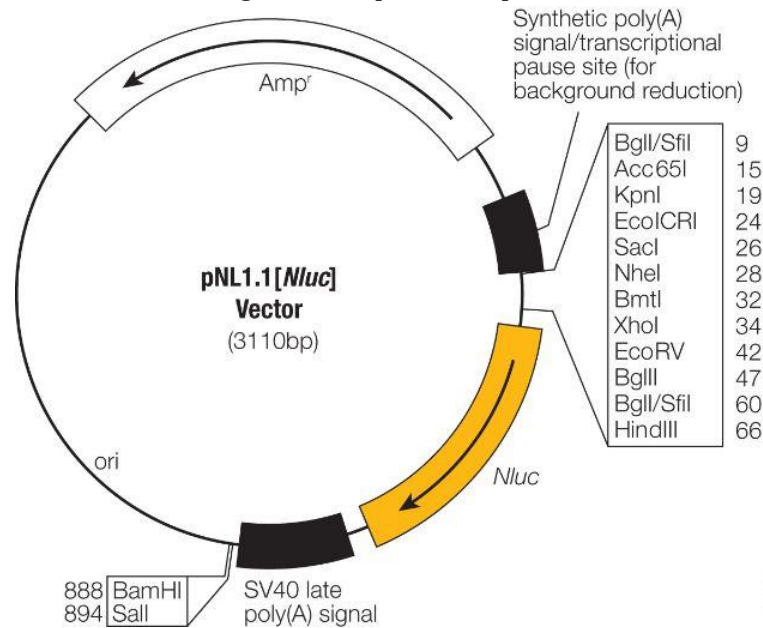
5.4 Reação de digestão do DNA plasmidial

O produto da extração foi digerido em uma reação de volume final de 25,3 μL , contendo 20 μL do produto da extração, 1 μL da enzima XhoI (Promega), 1 μL da enzima HindIII (Promega), 0,3 μL de BSA e 3 μL do tampão B que permite a dupla digestão das duas enzimas de acordo com instruções do fabricante. Por último, a reação de digestão foi incubada a 37 °C por um período de 4 horas.

Para a confirmação da clonagem da região LCR variante no vetor pGEM-T *easy*, o produto da digestão foi submetido a eletroforese em gel de Agarose a 1% para a observação do padrão de bandas.

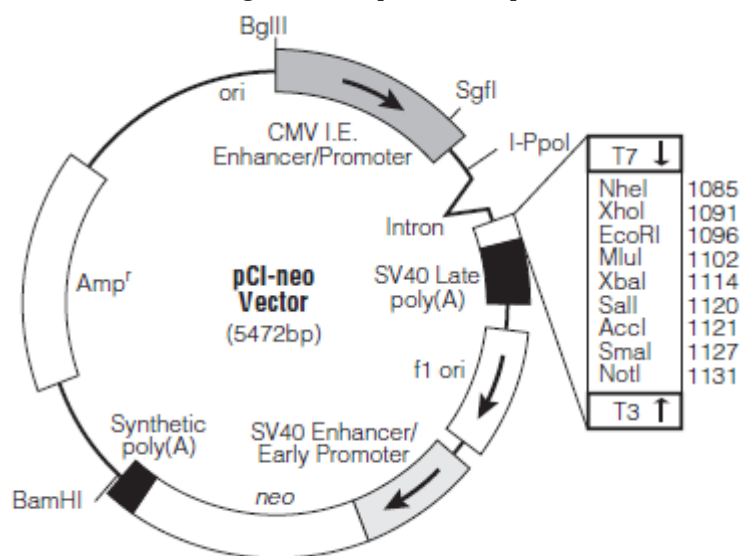
5.5 Subclonagem da região LCR (Variantes)

Para a subclonagem, o produto da digestão foi purificado diretamente do gel a partir da excisão da banda específica, referente a região LCR variantes, utilizando-se o Kit Promega *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up system*, de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, as amostras purificadas foram submetidas a uma reação de ligação no vetor pNL1.1 (Promega) (Figura 8), utilizando 10 μL do inserto, 1 μL do vetor, 1 μL de T4 Ligase e 12,5 μL de Buffer 2x, de forma que o gene repórter (*Nluc* luciferase) presente no vetor se torne dirigido pela sequência promotora LCR do HPV16. A reação de ligação foi deixada *overnight* a uma temperatura de 8°C. O produto da reação de ligação foi utilizado na transformação bacteriana, e em seguida foram realizadas as etapas de extração e digestão seguindo os mesmos protocolos do processo de clonagem anteriormente descrito.

Figura 8 – Mapa do vetor pNL1.1

Fonte: <http://embed.widencdn.net/img/promega/gdioqievnp/640px/10321MA.jpeg?u=7fvzhm> (2020)

O gene E2 do HPV 16 sintético, regulador transcrricional, foi digerido por meio de digestão dupla para separação do vetor pUC57 utilizando as enzimas XhoI e XbaI. O inserto liberado foi então subclonado no vetor pCI-neo (Figura 9).

Figura 9 – Mapa do Vetor pCI-neo

Fonte: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/pci-neo-mammalian-expression-vector-protocol.pdf?la=en> (2020)

5.6 Transformação bacteriana

Construções contendo as sequências variantes de LCR do HPV16 e do protótipo foram transformadas utilizando células competentes de *Escherichia coli* da linhagem DH5 α . Após 16 horas de crescimento a 37 °C em meio LB acrescido de ampicilina (100 μ g /ml) as colônias foram selecionadas, isoladas e repicadas. O repique foi incubado overnight a 37°C. Os clones recombinantes foram selecionados e inoculados em meio líquido LB contendo ampicilina por 16 horas. O DNA plasmidial foi extraído usando o kit *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), de acordo com instruções do fabricante.

5.7 Sequenciamento do DNA e análise das sequências obtidas

Após observar a separação do vetor e do inserto em gel de Agarose, o DNA plasmidial dos clones recombinantes foi submetido ao sequenciamento automático através do método dideoxi-terminal fluorescente, por meio do kit *BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing v 3.1 Ready Reaction* (Applied Biosystems®) da ABI PRISM por meio da Plataforma Tecnológica de Sequenciamento do Laboratório de Genômica e Expressão Gênica, LABCEN/CB/UFPE, onde o sequenciador automático de DNA ABI Prism 3100 (Applied Biosystems®) foi utilizado seguindo os padrões estabelecidos nesta unidade. A fim de confirmar os clones recombinantes, iniciadores específicos foram utilizados, que anelam na sequência do vetor e no inserto. Cada um dos clones obtidos foi sequenciado três vezes em cada sentido (direto e reverso).

Para retirar a sequência do vetor, formar *contigs* e analisar a qualidade do cromatograma, as sequências obtidas foram submetidas ao pacote de programas *Staden*, com os programas *Prepgap4* e *Gap4* (Staden et al, 1996). A identidade das sequências foi determinada usando o programa BLAST, disponível *online*. Foi realizado o alinhamento com as sequências de referência depositadas no site do NCBI.

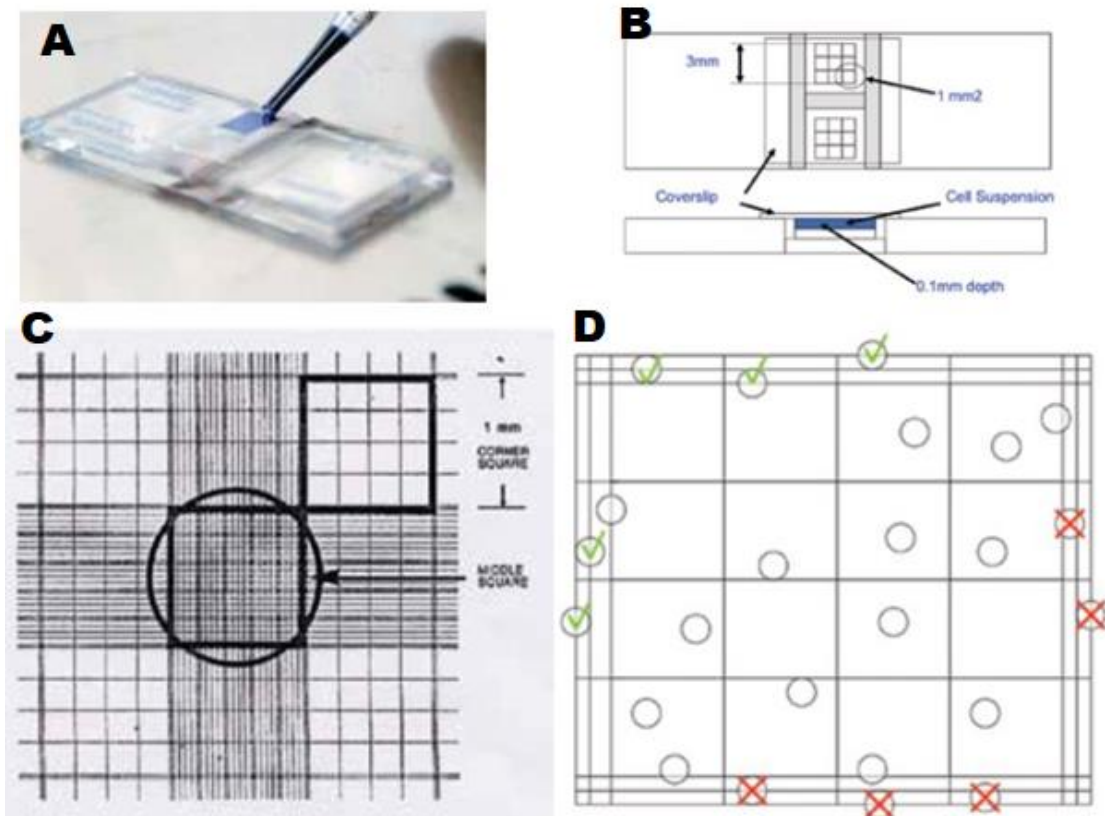
5.8 Cultivo e transfecção de células eucarióticas

Foram cultivadas células eucarióticas HeLa (Queratinócitos derivados de adenocarcinoma de colo uterino) em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium

(DMEMInvitrogen®) acrescido de 10% de soro bovino fetal (Gibco®); 1% L-glutamina (Sigma®) – DMEM completo. Depois as células foram mantidas em estufa úmida a 37°C e com 5% de CO₂.

Quando as garrafas de cultura celular apresentaram uma confluência de 40-80%, as células foram contadas utilizando Hemocítômetro. Para isso, primeiramente as células foram suspensas utilizando 0,05% Tripsina/EDTA em HBSS sem a presença de Ca²⁺/Mg²⁺, depois foi acrescentado um 4mL de meio DMEM. As células foram então centrifugadas, e após serem ressuspensas em 2mL de meio DMEM, foi retirado 10 µL de células e a esse volume foram acrescentados 40 µL de Azul de Tripán. 10 µL da solução corada foram adicionados a cada espaço da câmara, onde foram contadas as células viáveis (que não estavam manchadas de azul) em cada um dos 16 quadrados de cada um dos 4 quadrantes (Figura 10). O número total de células viáveis foi calculado utilizando a fórmula: número de células viáveis contadas x diluição x 10000.

Figura 10 – Representação esquemática da contagem de células utilizando um hemocítômetro e o azul de Tripán. A mostra a aplicação do Azul de Tripán. B mostra a esquemática do hemocítômetro. C apresenta a representação esquemática dos quadrantes que devem ser contados, e D mostra a forma apropriada de contar cada um dos 16 quadrados nos quadrantes.



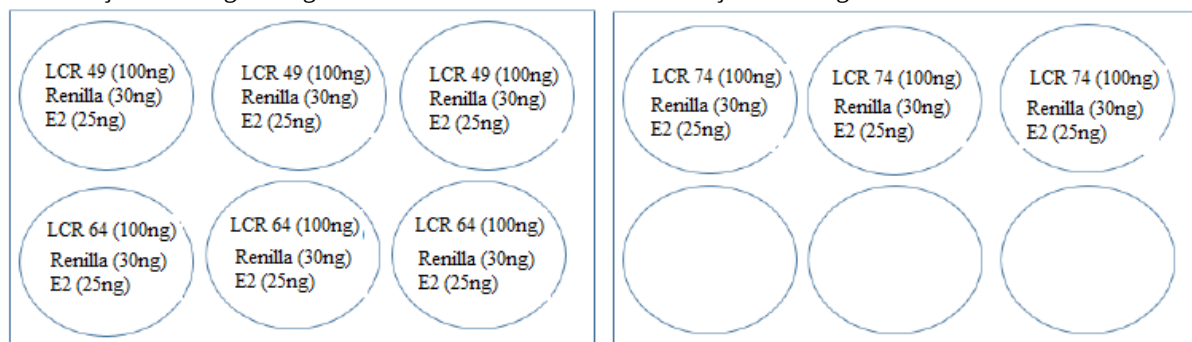
Fonte: <https://www.sigmaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/cell-quantification.html> (2020)

Em seguida, foram distribuídas 4×10^5 células em cada um dos poços de uma placa de seis poços, acrescidas de meio DMEM, onde cresceram por 24 horas em estufa úmida a 37°C e com 5% de CO_2 .

Todos os grupos de célula foram transfectados utilizando Lipofectamine 3000 da Invitrogen de acordo com instruções do fabricante e em seguida cotransfectados (Figura 11) com 30ng de um plasmídeo expressando a Renilla luciferase como normalizador da luminescência, juntamente com 100ng das regiões LCR polimórficas. Além disso, foi adicionado plasmídeo contendo 25ng do regulador transcricional E2 do HPV 16, valor encontrado em estudo realizado por Silva et al. (2020), onde foi feito um estudo sobre o efeito de diferentes concentrações de E2 no fator transcricional do HPV na ativação do promotor, e a concentração de 25ng foi escolhida como a que melhor ativava o promotor e aumentava a expressão do gene repórter *Nluc*.

As células foram encubadas a 37°C em estufa com 5% de CO_2 por 48 horas. Em seguida, os extratos celulares foram lizados utilizando *ReporterLysis Buffer* (Promega) de acordo com as instruções do fabricante para que a quantificação de proteínas e o ensaio de luminescência fossem realizados.

Figura 11 – Representação esquemática da etapa de co-transfecção. Todos os poços foram co-transfectados com os isolados (regiões LCR polimórficas) separadamente, assim como com o plasmídeo expressando Renilla na concentração de 30 ng e o regulador transcricional E2 na concentração de 25 ng.



Fonte: Autor (2020)

5.9 Avaliação da expressão gênica dirigida pela LCR

O ensaio de luminescência foi realizado com o material do extrato celular usando o kit Nanoluc (Promega). As leituras foram realizadas no GloMax® 96 Microplate Luminometer w/ Dual Injectors (Promega). A fim de garantir eficiências comparáveis de

transfecção, os resultados foram normalizados com a Renilla Firefly, e foi realizada a quantificação de proteínas.

5.10 Análise estatística

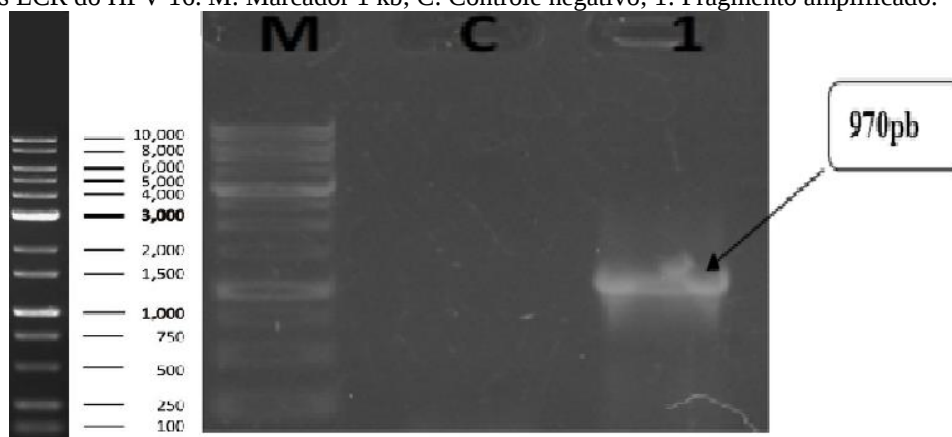
A análise estatística foi realizada utilizando a análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do pós-teste de correção de Bonferroni utilizando o software GraphPad Prism. O valor de $p < 0,05$ é considerado significativo.

6 RESULTADOS

6.1 Amplificação da região LCR do HPV16

A sequência variante da região LCR do HPV16 foi amplificada a partir de três amostras clínicas positivas para o HPV16 (Isolado 49, 74 e 64). O gel da Figura 12 mostra um amplicon de 970pb, contudo a LCR do HPV16 possui 782pb. O tamanho do amplicon de 970pb é devido aos *primers* desenhados os quais se anelaram em regiões nos genes L1 e E6 fazendo com que o tamanho do amplicon final fosse aumentado.

Figura 12 – Gel representativo demonstrando a amplificação da região LCR variante com o uso de *primers* específicos LCR do HPV 16. M: Marcador 1 kb; C: Controle negativo; 1: Fragmento amplificado.



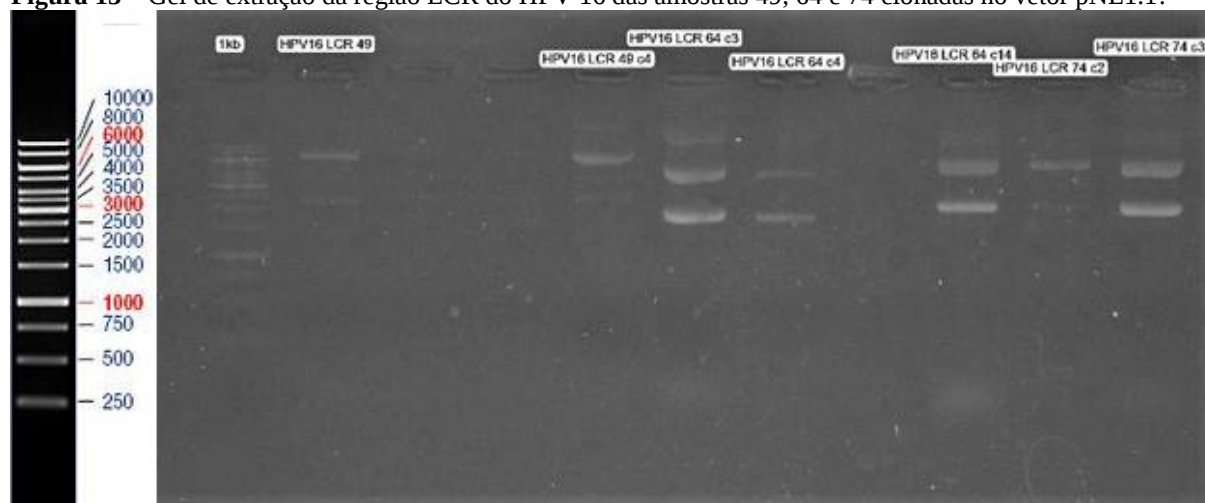
Fonte: Acervo pessoal (2018)

6.2 Clonagem, subclonagem e sequenciamento das sequências variantes da região LCR do HPV16

Após a etapa de subclonagem, foi realizada a mini extração de DNA plasmidial (Figura 13) e confirmação dos clones através de digestão enzimática (Figura 14) com as enzimas de restrição descritas na metodologia.

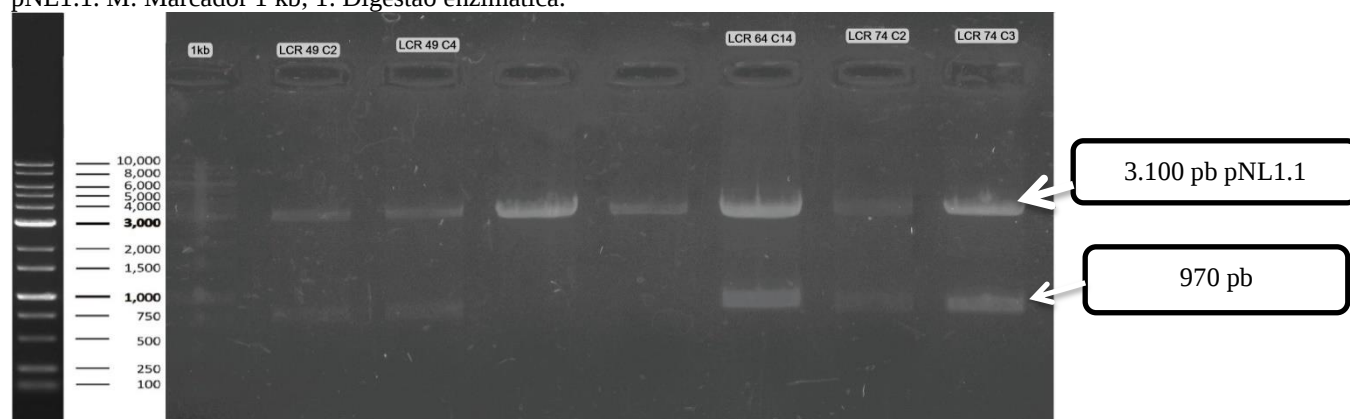
Os clones recombinantes obtidos foram submetidos a reações de sequenciamento para confirmação da integridade das sequências variantes da LCR do HPV 16 através da comparação dessas sequências com as sequências de referência depositadas no GenBank (HPV 16: K02718.1).

Figura 13 – Gel de extração da região LCR do HPV 16 das amostras 49, 64 e 74 clonadas no vetor pNL1.1.



Fonte: Acervo Pessoal (2020)

Figura 14 – Gel de confirmação da clonagem das variantes 49, 64 e 74 da LCR do HPV 16 por digestão no pNL1.1. M: Marcador 1 kb; 1: Digestão enzimática.



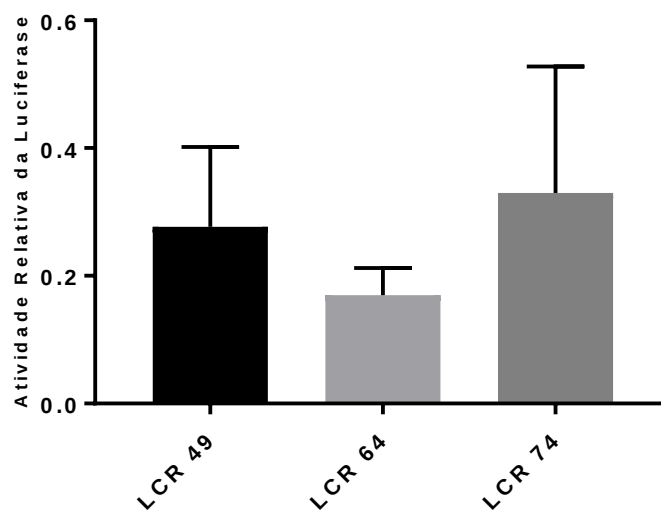
Fonte: Acervo pessoal (2020)

6.3 Ensaios de Luciferase

No gráfico (Figura 15) estão os resultados dos ensaios de Luminescência, onde pode-se observar que o efeito da expressão do gene repórter *Nluc* mediado pela LCR na variante 74 do HPV 16 foi maior do que nas variantes dos isolados 49 e 64. Dentre os três isolados, o 64 foi a que teve menor expressão do gene repórter *Nluc*. O p valor foi de 0,53 e, por ser maior que 0.05, não foi considerado significativo.

Figura 15 – Demonstra que a variante do isolado 74 da LCR do HPV 16 tem maior capacidade de alterar os níveis de expressão do gene repórter *Nluc*, quando comparada as variantes dos isolados 49 e 64 de LCR do HPV 16. O isolado 64 da LCR do HPV 16 tem menor capacidade de alterar os níveis de expressão do gene *Nluc*, em comparação com os isolados das outras variantes.

Efeito da expressão do gene repórter *Nluc* mediado pela LCR



Fonte: Autor (2020)

7 DISCUSSÃO

A infecção persistente por HPV é um dos pré-requisitos para o desenvolvimento do câncer cervical (zur Hausen, 2002). Cerca de 99,7% dos tumores de colo de útero estão associados com o HPV (Muñoz et al., 2006). Entre os diversos tipos de HPV, o HPV 16 é o mais encontrado tanto em países desenvolvidos, quanto em países subdesenvolvidos.

Estudos têm mostrado que as variantes dos HPVs 16, 31 e 58 podem afetar a oncogenicidade, persistência e progressão da infecção viral (Berumen et al., 2001; Burk et al., 2003; Ho et al., 2005; Schiffman et al., 2010; Xi et al., 2007; Yamada et al., 1997). O estudo molecular de variantes de HPV circulantes em uma região geográfica se torna, então, uma importante ferramenta epidemiológica quando se tem em vista o risco de persistência da infecção viral e a susceptibilidade para o desenvolvimento de lesões cervicais (Sichero et al., 2007; Villa et al., 2000).

Variações na LCR aumentam o risco de infecções persistentes por HPVs de tipos 16, 18, 33 (Gagnon et al., 2004) e 58 (Raiol et al., 2011), resultando na perda de capacidade de ligação dos fatores transcricionais E2, YY1, NF-1 e AP1. Por essa razão, a realização de estudos de avaliação funcional de variantes da LCR se torna necessária para que seja possível estudar o potencial real das variantes da região promotora LCR do HPV.

O presente estudo foi realizado em pacientes do Nordeste do Brasil, especialmente da região de Pernambuco. As variantes da região LCR do HPV 16 utilizadas foram identificadas pelo nosso grupo de pesquisa em um trabalho já publicado (Gurgel et al., 2015).

Existem quatro linhagens de variantes para o HPV 16 (A, B, C e D) (Burk et al., 2013). As variantes B, C e D são consideradas mais oncogênicas do que a variante A (Burk et al., 2013). Neste estudo foram usadas três variantes da LCR do HPV 16; a LCR do isolado 49 pertence a variante A, a do isolado 64 pertence a variante D e a do isolado 74 pertence a variante C. Infelizmente, devido a problemas metodológicos, não foi possível subclonar o protótipo do HPV 16 no pNL1.1, o que impossibilitou a comparação das variantes utilizadas neste estudo com o gene de referência. Por isso, neste estudo, o nível de expressão do gene repórter foram comparados entre as três variantes do estudo, e não com o gene de referência.

Em relação ao nível de expressão do gene repórter *Nluc* obtido por meio de modelo de ensaio de luminescência dos polimorfismos da região LCR do HPV 16 neste estudo, ficou

evidente que a variante do isolado 64 foi quem mais reprimiu a atividade do gene repórter, e o isolado 74 foi o quem menos reprimiu a atividade do repórter.

É importante relacionar os resultados dos estudos funcionais de variantes com os polimorfismos encontrados nos isolados, pois eles podem alterar a ligação com os fatores transcricionais e assim interferir na progressão do câncer cervical. As variações encontradas na LCR das amostras presentes neste estudo estão localizadas em sítios de ligação para fatores transcricionais (YY1, NF-1, E2, Oct-1, C/EBP beta). O fator NF-1 ativa a expressão dos oncogenes virais (Sichero; Sobrinho; Villa, 2012). O fator YY1 têm um papel importante na redução da regulação da expressão gênica de vários vírus, inclusive do HPV. Ele se liga próximo ao promotor p97, e diminui a expressão dos oncogenes E6 e E7 (Bernard, et al., 2013). Mudanças na região de ligação do YY1 podem aumentar os níveis de expressão gênica do HPV, contribuindo para a carcinogenese (Dong, et al., 1999).

O fator transcricional E2 quando em baixas concentrações é um ativador, mas quando em altas concentrações ele se torna um repressor (Bouvard et al., 1994; Hang et al., 2014; Schweiger et al., 2007; Thierry e Yaniv, 1987). O Oct-1, quando super expresso, vai resultar na diminuição da atividade do *enhancer* do HPV, entretanto em níveis fisiológicos ele geralmente ativa o *enhancer* (O'Connor M, 1995). Variações no sítio do fator transcricional C/EBP beta podem diminuir a atividade do promotor viral p97 (SEN et al., 2002). O isolado 49 apresenta alteração em um dos sítios de ligação para YY1. O isolado 64 apresenta três alterações em sítios de ligação para o YY1, além de duas alterações em sítios de ligação para NF-1, uma alteração para o fator E2, uma para o Oct-1 e uma para o C/EBP beta. O isolado 74 apresentou alterações em três sítios para o fator YY1 e dois para o NF-1. Os três isolados apresentaram deleção de A na posição 7862 da região LCR.

Os resultados deste estudo mostraram o efeito dos polimorfismos na região LCR do HPV 16, onde o nível de expressão do gene repórter *Nluc* foi comparado entre as três variantes estudadas, e mostrou que a variante do isolado 64, que apresentou o maior número de alterações nos sítios de ligação a fatores de transcrição, teve a menor expressão do gene *Nluc*. Já a variante do isolado 74 apresentou a maior expressão do gene repórter, com alterações em três sítios para o fator YY1, duas para o NF-1, e uma deleção no fator transcricional E2. A variante do isolado 49 apresentou expressão intermediária do gene repórter, e ela é a que possui menos alterações nos sítios de ligação para fatores transcricionais, em comparação com as outras duas variantes. Esses resultados podem ter

ocorrido porque as alterações nos sítios de fatores de transcrição podem resultar no aumento ou diminuição da atividade do promotor p97, e consequentes mudanças na expressão dos oncogenes virais E6 e E7, o que vai impactar o grau de carcinogênese das variantes.

Em trabalho realizado por Pientong et al., 2013 utilizando como amostras a LCR do HPV 16 de mulheres Tailandesas, foram comparadas variantes Asiáticas com sub linhagens Europeias e Asiático-Americanas. Os resultados mostraram que a LCR em todas as linhagens de HPV16 tinha atividade transcricional maior do que no protótipo.

Um estudo realizado por Ferenczi et al., 2013 na Hungria sugere que existem diferenças na atividade transcricional entre variantes de LCR do HPV31 de diferentes linhagens. Nesse estudo, as variantes de LCR da linhagem A do HPV 31 reprimiram a atividade transcricional do gene repórter, enquanto que variantes da LCR das linhagens B e C tiveram atividades transcricionais maiores do gene repórter do que no protótipo.

Outro trabalho realizado com variantes de LCR do HPV 31 foi o de Silva et al., 2020 realizado no estado de Pernambuco, onde as variantes da linhagem C tiveram um nível de expressão significativamente maior do que da variante A, e todas as variantes aumentaram o nível de expressão do gene repórter mais do que o protótipo.

Esses achados corroboram com a ideia que algumas das mudanças nucleotídicas encontradas nesses isolados podem alterar o sítio de ligação ou a atividade dos fatores de transcrição, impactando na oncogenicidade dessas variantes.

8 CONCLUSÃO

- O estudo amplia os conhecimentos sobre as variantes da região Longa de Controle (LCR) do Papilomavirus Humano tipo 16 com base nos polimorfismos circulantes encontrados no estado de Pernambuco. Neste estudo, foi observado que o isolado 74 apresenta a maior expressão do gene repórter Nluc, enquanto o isolado 64 foi o que mais reprimiu a atividade do gene repórter Nluc, comparado com as outras variantes estudadas.

- A variante que apresentava o maior número de polimorfismos em sítios de ligação para fatores transcricionais foi a que mais reprimiu a expressão do gene repórter, o que sugere que as alterações na LCR irão afetar a expressão do promotor LCR afetando a atividade transcricional das variantes.

REFERÊNCIAS

- AGUAYO, F. et al. Human papillomavirus-16 is integrated in lung carcinomas: a study in Chile. **British journal of cancer**, v. 97, n. 1, p. 85–91, 2 jul. 2007.
- ALBANELL, J. et al. High Telomerase Activity in Primary Lung Cancers: Association With Increased Cell Proliferation Rates and Advanced Pathologic Stage. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 89, n. 21, p. 1609–1615, 5 nov. 1997.
- AMARAL, C. M. et al. MDM2 polymorphism associated with the development of cervical lesions in women infected with Human papillomavirus and using of oral contraceptives. **Infectious Agents and Cancer**, v. 9, n. 1, p. 24, 18 jul. 2014.
- APPLE, R. J.; ERLICH, H. A.; KLITZ, W.; MANOS, M. M.; BECKER, T. M.; WHEELER, C. M. HLA DR-DQ associations with cervical carcinoma show papillomavirus-type specificity. **Nat Genet.** 6(2):157-62, fev. 1994.
- BALDEZ DA SILVA, M. F. P. T. et al. HPV31 and HPV33 incidence in cervical samples from women in Recife, Brazil. **Genetics and Molecular Research: GMR**, v. 8, n. 4, p. 1437–1443, 2009.
- BARZON, L.; GIORGI, C.; BUONAGURO, F. M.; PALÙ, G. Guidelines of the Italian Society for Virology on HPV testing and vaccination for cervical cancer prevention. **Infectious Agents and Cancer.** 3:14, 3 dez. 2008.
- BERGVALL, M.; MELENDY, T.; ARCHAMBAULT, J. The E1 proteins. **Virology**, Special Issue: The Papillomavirus Episteme. v. 445, n. 1–2, p. 35–56, out. 2013.
- BERNARD, H. U.; BURK, R. D.; CHEN, Z.; VAN DOORSLAER, K.; HAUSEN, H.; DE VILLIERS, E. M. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology.** 2010; 401(1):70–79. doi: 10.1016/j.virol.2010.02.002. [PubMed: 20206957]
- BERNARD, H. U.; CALLEJA-MACIAS, I. E.; DUNN, S. T. Genome variation of human papillomavirus types: Phylogenetic and medical implications. **Int J Cancer** 118:1071-1076, mar. 2006.
- BERNARD, H. U. Regulatory elements in the viral genome. **Virology**, Special Issue: The Papillomavirus Episteme. v. 445, n. 1–2, p. 197–204, out. 2013. 126
- BERNARD, H. U. The clinical importance of the nomenclature, evolution and the taxonomy of human papillomaviruses. **Journal of Clinical Virology.** 32:1-6. 2005.

BERUMEN, J. et al. Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 93, n. 17, p. 1325–1330, 5 set. 2001.

BHATTACHARYA, P.; SENGUPTA, S. Lack of evidence that proline homozygosity at codon 72 of p53 and rare arginine allele at codon 31 of p21, jointly mediate cervical cancer susceptibility among Indian women. **Gynecologic Oncology**, v. 99, n. 1, p. 176–182, out. 2005.

BISHOP, B.; DASGUPTA, J.; CHEN, X. S. Structure-based engineering of papillomavirus major capsid L1: controlling particle assembly. **Virology Journal**, v. 4, n. 1, p. 3, 8, jan. 2007.

BOSCH, F. X.; MANOS, M. M.; MUÑOZ, N.; SHERMAN, M.; JANSEN, A. M.; PETO, J.; SCHIFFMAN, M. H.; MORENO, V.; KURMAN, R.; SHAH, K. V. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. **J Natl Cancer Inst.** 87(11):796-802, jun. 1995.

BOSCH, F. X.; MUÑOZ, N. The viral etiology of cervical cancer. **Virus Res.**89(2):183-90, nov. 2002.

BOUVARD, V.; STOREY, A.; PIM, D.; BANKS, L. Characterization of the human papillomavirus E2 protein: Evidence of trans-activation and trans-repression in cervical keratinocytes. **EMBO J** 13:5451–5459, nov. 1994.

BUCK, C. B.; DAY, P. M.; TRUS, B. L. The papillomavirus major capsid protein L1. **Virology**, Special Issue: The Papillomavirus Episteme. v. 445, n. 1–2, p. 169–174, out. 2013.

BURD E. M. Human papillomavirus and cervical cancer. **Clin Microbiol Rev.** 16(1):1-17, jan. 2003.

BURK, R. D. et al. Distribution of human papillomavirus types 16 and 18 variants in squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the cervix. **Cancer research**, v. 63, n. 21, p. 7215–7220, 1 nov. 2003.

BURK, R. D. et al. Human papillomavirus genome variants, **Virology**, vol. 445, no. 1-2, pp. 232–243, out. 2013.

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

CARPAGNANO, G. E. et al. HPV in exhaled breath condensate of lung cancer patients. **British journal of cancer**, v. 105, n. 8, p. 1183–1190, 11 out. 2011.

CHAGAS, B. S. et al. An interleukin-10 gene polymorphism associated with the development of cervical lesions in women infected with Human Papillomavirus and using oral contraceptives. **Infection, genetics and evolution**, v. 19, p. 32-37, oct. 2013.

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

CHAGAS, B. S. et al. Novel E6 and E7 oncogenes variants of human papillomavirus type 31 in Brazilian women with abnormal cervical cytology. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 16, p. 13–18, jun. 2013.

CHANG, Y.-J. et al. Unique variants of human papillomavirus genotypes 52 and 58 and risk of cervical neoplasia. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 129, n. 4, p. 965–973, 15 ago. 2011.

CHANSAENROJ, J. et al. Whole genome analysis of human papillomavirus type 16 multiple infection in cervical cancer patients. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**, v. 13, n. 2, p. 599–606, 2012.

CHEN, X. S. et al. Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. **Molecular cell**, v. 5, n. 3, p. 557–567, mar. 2000.

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

CLIFFORD, G. M.; GALLUS, S.; HERRERO, R.; MUÑOZ, N.; SNIJDERS, P. J.; VACCARELLA, S.; ANH, P. T.; FERRECCIO, C.; HIEU, N. T.; MATOS, E.; MOLANO, M.; RAJKUMAR, R.; RONCO, G.; DE SANJOSÉ, S.; SHIN, H. R.; SUKVIRACH, S.; THOMAS, J. O.; TUNSAKUL, S.; MEIJER, C. J.; FRANCESCHI, S.; IARC HPV Prevalence Surveys Study Group. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. **Lancet**. 366(9490):991-8, set. 2005.

CLIFFORD, G. M.; SMITH, J. S.; AGUADO, T.; FRANCESCHI, S. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. **Br J Cancer**. 89(1):101-5, jul 2003.

COMBITA, A. L. et al. Gene transfer using human papillomavirus pseudovirions varies according to virus genotype and requires cell surface heparan sulfate. **FEMS microbiology letters**, v. 204, n. 1, p. 183–188, 16 out. 2001.

CORNET, I. et al. Human papillomavirus type 16 E6 variants in France and risk of viral persistence. **Infectious Agents and Cancer**, v. 8, n. 1, p. 4, 23, jan. 2013.

CORNET, I. et al. Human papillomavirus type 16 genetic variants: phylogeny and classification based on E6 and LCR. **Journal of virology**, v. 86, n. 12, p. 6855–6861, jun. 2012.

CUBIE, H. A. Diseases associated with human papillomavirus infection. **Virology**, Special Issue: The Papillomavirus Episteme. v. 445, n. 1–2, p. 21–34, out. 2013.

DE FREITAS, A. C. et al. Susceptibility to cervical cancer: An overview. **Gynecologic Oncology**, 4 abr. 2012.

DE MARTEL, C.; PLUMMER, M.; VIGNAT, J.; FRANCESCHI, S. Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. **Int J Cancer**.141(4):664–70, sept 2017.

DE SANJOSÉ, S.; DIAZ, M.; CASTELLSAGUÉ, X.; CLIFFORD, G.; BRUNI, L.; MUÑOZ, N.; BOSCH, F. X. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. **Lancet Infect Dis**. 7(7):453-9. Review, jul. 2007

DE SANJOSÉ, S. et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. **The Lancet Oncology**, v. 11, n. 11, p. 1048–1056, nov. 2010.

DE VILLIERS, E-M. et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17–27, 20 jun. 2004.

DE VILLIERS, E-M.; SANDSTROM, R. E.; ZUR HAUSEN, H.; BUCK, C. E. (2005) Presence of papillomavirus sequences in condylomatous lesions of the mamillae and in invasive carcinoma of the breast. **Breast Cancer Res**. 7(1):1-11, 2005.

DIMAIO, D.; PETTI, L. M. The E5 proteins. **Virology**, Special Issue: The Papillomavirus Episteme. v. 445, n. 1–2, p. 99–114, out. 2013.

DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clin Sci (Lond)**. 110(5):525-41. Review, maio 2006.

DOORBAR, J. et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. **Vaccine**, v. 30 Suppl 5, p. F55–70, 20 nov. 2012. 129

DOORBAR, J. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. **Virology**, Special Issue: The Papillomavirus Episteme. v. 445, n. 1–2, p. 80–98, out. 2013.

DONG, X.P.; STUBENRAUCH, F.; BEYER-FINKLER, E.; PFISTER, H. Prevalence of deletions YY-1 binding sites in episomal HPV 16 DNA from cervical cancers. **Int J Cancer** 58: 803-808, 1994

DONG, X. P.; PFISTER, H. Overlapping YY1- and aberrant SP1-binding sites proximal

to the early promoter of human papillomavirus type 16. **The Journal of General Virology**, v. 80 (Pt 8), p. 2097–2101, ago. 1999.

DRLICA, K. Understanding DNA and gene cloning: a guide for the curious, Fourth Edition. **Editora Guanabara Koogan S.A.**, 2005.

EFIRD, J. T. et al. The combined influence of oral contraceptives and human papillomavirus virus on cutaneous squamous cell carcinoma. **Clinical Medicine Insights. Oncology**, v. 5, p. 55–75, 2011.

ELLIS, J. R. et al. The association of an HPV 16 oncogene variant with HLA-B7 has implications for vaccine design in cervical cancer. **Nature medicine**, v. 1, n. 5, p. 464–470, maio 1995.

FAVRE, M.; RAMOZ, N.; ORTH, G. Human papillomaviruses: general features. **Clin Dermatol**; 15(2):181-98, 1997.

FEHRMANN, F.; LAIMINS, L. A. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. **Oncogene**.22:5201-7, 2003.

FERENCZI, A. et al., Sequence Variation of Human Papillomavirus type 31 Long Control Region: Phylogenetic and functional Implications. **Journal of Medical Virology** v. 85 p 852-859, 2013.

FREITAS, A. C.; GURGEL, A. P. A. D.; CHAGAS, B. S.; BALBINO, V. Q.; BATISTA, M. V. A. Genetic Diversity of Human and Animal papillomaviruses. In: Julian A. Cervantes 130 Amaya and Miguel M. Franco Jimenez. (Org.). **Genetic Diversity: New Research. Nova Science Publishers**, 1 ed. 2012, p.1.

FREITAS, L. B. et al. Human Papillomavirus 16 Non-European Variants Are Preferentially Associated with High-Grade Cervical Lesions. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. e100746, 1 jul. 2014.

GAGNON, S.; HANKINS, C.; TREMBLAY, C.; FOREST, P.; POURREAUX, K.; COUTLÉE, F. Viral polymorphism in human papillomavirus types 33 and 35 and persistent and transient infection in the genital tract of women. **The Journal of Infectious Disease**; 190:1575-1585, 2004.

GHANEM, K. G. et al. The association of current hormonal contraceptive use with type-specific HPV detection. **Sexually Transmitted Infections**, v. 87, n. 5, p. 385–388, ago. 2011.

GHEIT, T. et al. Risks for persistence and progression by human papillomavirus type 16 variant lineages among a population-based sample of Danish women. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 20, n. 7, p. 1315–1321, jul. 2011.

GIROGLOU, T. et al. Human Papillomavirus Infection Requires Cell Surface Heparan Sulfate. **Journal of Virology**, v. 75, n. 3, p. 1565–1570, 1 fev. 2001.

GRAHAM, S. V. The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. **Portland Press Clinical Science** v. 131 p. 2201-2221. DOI: 10.1042/CS 20160786, 2017.

GRAHAM, S. V. Human papillomavirus: gene expression, regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies. **Future Microbiol** 5(10): 1493–1506, 2010.

GURGEL, A. P. A. D. et al. Prevalence and genetic variability in capsid L1 gene of rare human papillomaviruses (HPV) found in cervical lesions of women from North-East Brazil. **BioMed research international**, v. 2013, p. 546354, 2013.

GURGEL, A. P. A. D.; CHAGAS, B. S.; DO AMARAL, C. M.; NASCIMENTO, K. C. G.; LEAL, L. R. S.; SILVA NETO, J. C.; CARTAXO MUNIZ, M. T.; DE FREITAS, A. C. Prevalence of Human Papillomavirus Variants and Genetic Diversity in the L1 Gene and Long Control Region of HPV 16, HPV31, and HPV58 Found in North-East Brazil. **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 1-12, 2015.

HAMPSON, I. N. ; OLIVER, W. A.; HAMPSON, L. Potential Effects of Human Papillomavirus Type Substitution, Superinfection Exclusion and Latency on the Efficacy of the Current L1 Prophylactic Vaccines. **Viruses**, 10.3390/v131002, dez 2020

HANG, D.; GAO, L.; SUN, M.; LIU, Y.; KE, Y. Functional Effects of Sequence Variations in the E6 and E2 Genes of Human Papillomavirus 16 European and Asian Variants. **Journal of Medical Virology** 86:618–626, abr. 2014.

HARIMA, Y. et al. Polymorphism of the WAF1 gene is related to susceptibility to cervical cancer in Japanese women. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 7, n. 3, p. 261–264, mar. 2001.

HO, C.-M. et al. Detection and quantitation of human papillomavirus type 16, 18 and 52 DNA in the peripheral blood of cervical cancer patients. **Gynecologic Oncology**, v. 99, n. 3, p. 615–621, dez. 2005.

HO, L. et al. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. **Journal of Virology**, v. 67, n. 11, p. 6413–6423, nov. 1993.

HU, W. et al. A Single Nucleotide Polymorphism in the MDM2 Gene Disrupts the Oscillation of p53 and MDM2 Levels in Cells. **Cancer Research**, v. 67, n. 6, p. 2757 –2765, 15 mar. 2007.

HU, X. et al. TP53, MDM2, NQO1, and Susceptibility to Cervical Cancer. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 19, n. 3, p. 755 –761, 1 mar. 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA), 2016. Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Divisão de Detecção Precoce e Apoio à Organização de Rede. – 2. Ed. Ver. Atual. – Rio de Janeiro: INCA, 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA), 2019. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro: INCA, 2019.

INTERNATIONAL HUMAN PAPILLOMAVIRUS (HPV) REFERENCE CENTER, 2020. Human Reference clones. https://www.hpvcenter.se/human_reference_clones/. Acesso em Dezembro, 2020.

JIANG, P. et al. Role of p53 and p21 polymorphisms in the risk of cervical cancer among Chinese women. **Acta Biochimica Et Biophysica Sinica**, v. 42, n. 9, p. 671–676, set. 2010.

JOHNSON, K. M. et al. Role of heparan sulfate in attachment to and infection of the murine female genital tract by human papillomavirus. **Journal of virology**, v. 83, n. 5, p. 2067–2074, mar. 2009.

KAHN, J. A. HPV Vaccination for the Prevention of Cervical Intraepithelial Neoplasia. **The New England Journal of Medicine**, 361: 271-278, jul. 2009.

KALANTARI, M.; CHASE, D. M.; TEWARI, K. S.; BERNARD, H. U. Recombination of human papillomavirus-16 and host DNA in exfoliated cervical cells: a pilot study of L1 gene methylation and chromosomal integration as biomarkers of carcinogenic progression. **J Med Virol**. 82(2):311-20, 2010.

KISSELJOV, F. L. Virus-associated human tumors: cervical carcinomas and papilloma viruses. **Biochemistry**. 2000;65(1):68-77. Translated from **Biokhimiya**. 2000;65(1):79-91

KLUG, S. J. et al. TP53 codon 72 polymorphism and cervical cancer: a pooled analysis of individual data from 49 studies. **The Lancet Oncology**, v. 10, n. 8, p. 772–784, Agosto 2009.

LI, N. et al. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. **International Journal of Cancer**, v. 128, n. 4, p. 927–935, 15 fev. 2011.

LONDESBOROUGH, P. et al. Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities. **International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer**, v. 69, n. 5, p. 364–368, 21 out. 1996.

LORENZATO, F.; HO, L.; TERRY, G.; SINGER, A.; SANTOS, L. C.; DE LUCENA BATISTA, R.; LUBAMBO, T. The use of human papillomavirus typing in detection of cervical neoplasia in Recife (Brazil). **Int J Gynecol Cancer**. 10(2):143-150, mar. 2000.

MACIAG, P. C.; SCHLECHT, N. F.; SOUZA, P. S.; ROHAN, T. E.; FRANCO, E. L.; VILLA, L. L. Polymorphisms of the human leukocyte antigen DRB1 and DQB1 genes and the natural history of human papillomavirus infection. **J Infect Dis.** 186(2):164-72, 2002.

MACLAUGHLAN, S. D.; LACHANCE, J. A.; GJELSVIK, A. Correlation between smoking status and cervical cancer screening: a cross-sectional study. **Journal of Lower Genital Tract Disease**, v. 15, n. 2, p. 114–119, abr. 2011. 133

MCBRIDE, A. A. The Papillomavirus E2 proteins. **Virology**, Special Issue: The Papillomavirus Episteme. v. 445, n. 1–2, p. 57–79, out. 2013.

MOKTAR, A. et al. Cigarette smoke condensate-induced oxidative DNA damage and its removal in human cervical cancer cells. **International Journal of Oncology**, v. 39, n. 4, p. 941–947, out. 2011.

MUÑOZ, N.; CASTELLSAGUÉ, X.; DE GONZÁLEZ, A.B.; GISSMANN, L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**, v.24, n. 3 (Suppl), p.s1-10, ago. 2006.

O'CONNOR, M.; BERNARD, H.-U. Oct-1 activates the epithelial-specific enhancer of human papillomavirus type 16 via a synergistic interaction with NFI at a conserved composite regulatory element. **Scopus**, 1995.

OLIVEIRA, S. et al. The p53 R72P polymorphism does not influence cervical cancer development in a portuguese population: A study in exfoliated cervical cells. **Journal of Medical Virology**, v. 80, n. 3, p. 424–429, 1 mar. 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Comprehensive Cervical Cancer Control. A guide to essential practice 2nd edition. **WHO Library Cataloguing-in-Publication Data**. 2014 ISBN 978-92-4 154895-3.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Globocan Cervical Cancer: Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. **IARC**. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/old/FactSheets/cancers/cervix-new.asp>> Acesso em: 25 jun. 2017.

QUINT, K. D. et al. HPV genotyping and HPV 16 variant analysis in glandular and squamous neoplastic lesions of the uterine cervix. **Gynecologic oncology**, v. 117, n. 2, p. 297–301, maio 2010.

RAIOL, T.; WYANT, P. S.; AMORIM, R. M. S.; GALANTE, P.; MARTINS, C. R. F.; VILLA, L. L.; SICHERO, L. HPV-58 molecular variants exhibit different transcriptional activity **Intervirolgy**; 54: 146-150, 2011.

RAIOL, T. et al. Genetic variability and phylogeny of the high-risk HPV-31, -33, -35, -52, and -58 in central Brazil. **Journal of Medical Virology**, v. 81, p. 685–692, abr. 2009.

ROH, J.-W. et al. P53 Codon 72 and p21 Codon 31 Polymorphisms and Susceptibility to Cervical Adenocarcinoma in Korean Women. **Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics**, v. 18, n. 9, p. 453–459, 2010a.

ROMAN, A.; MUNGER, K. The papillomavirus E7 proteins. **Virology**, Special Issue: The Papillomavirus Episteme. v. 445, n. 1–2, p. 138–168, out. 2013.

ROMANCZUK, H; THIERRY, F; HOWLEY, PM. Mutational analysis of cis elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 P97 and type 18 P105 promoters. **J. Virol.** 64: 2849-2859, 1990

PANDE, S.; JAIN, N.; PRUSTY B.K.; BHAMBHANI, S; GUPTA, S; SHARMA, R.; BATRA, S.; DAS, B. C. Human Papillomavirus type 16 variant analysis of E6, E7, and L1 Genes and Long Control Region in Biopsy Samples from Cervical Cancer Patients in North India. **J Clin Microbiol.** 46(3): 1060-1066, 2008.

ROSENSTIERNE, M. W.; VINTHER, J.; HANSEN, C. N.; PRYDSOE, M.; NORRILD, B. Identification and characterization of a cluster of transcription start sites located in the E6 ORF of human papillomavirus type 16. **J Gen Virol.** 84:2909-20, 2003.

PIENTONG, C. et al. Association of human papillomavirus type 16 long control region mutation and cervical cancer. **Virology Journal** 10:30, 2013

SAAVEDRA, K. P.; BREBI, P. M.; ROA, J. C. Epigenetic alterations in preneoplastic and neoplastic lesions of the cervix. **Clin Epigenetics.** 4(1):13, 2012.

SAPP, M.; DAY, P. M. Structure, attachment and entry of polyoma- and papillomaviruses. **Virology**, v. 384, n. 2, p. 400–409, 20 fev. 2009.

SCHEURER, M. E.; TORTOLERO-LUNA, G.; ADLER-STORTHZ, K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. **International journal of gynecological cancer: official journal of the International Gynecological Cancer Society**, v.15, n.5, p.727–746, oct. 2005.

SCHIFFMAN, M.; CASTLE, P. E.; JARONIMO, J.; RODRIGUEZ, A. C.; WACHOLDER, S. Human papillomavirus and cervical cancer. **Lancet** 370:890-907, set. 2007

SCHIFFMAN, M.; CLIFFORD, G.; BUONAGURO, F. M. Classification of weakly carcinogenic human papillomavirus types: addressing the limits of epidemiology at the borderline. **Infectious Agents and Cancer**, v. 4, n. 1, p. 8, 135, 1 jun. 2009.

SCHIFFMAN, M. et al. A Population-Based Prospective Study of Carcinogenic Human Papillomavirus Variant Lineages, Viral Persistence, and Cervical Neoplasia. **Cancer Research**, v. 70, n. 8, p. 3159 –3169, abr. 2010.

SCHWARTZ, S. Papillomavirus transcripts and posttranscriptional regulation. **Virology**, Special Issue: The Papillomavirus Episteme. v. 445, n. 1–2, p. 187–196, out. 2013.

SCHWEIGER, M. R.; OTTINGER, M.; YOU, J.; HOWLEY, P. M. Brd4- independent transcriptional repression function of the papillomavirus e2 proteins. **J Virol** 81:9612–9622, 2007.

SEN, E.; BROMBERG-WHITE, J. L.; MEYERS, C. Genetic Analysis of cis Regulatory Elements within the 5' Region of the Human Papillomavirus Type 31 Upstream Regulatory Region during Different Stages of the Viral Life Cycle. **Journal of Virology**, v. 76, n. 10, p. 4798–4809, 15 maio 2002.

SICHERO, L. et al. High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18. **International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer**, v. 120, n. 8, p. 1763–1768, 15 abr. 2007.

SICHERO, L.; SOBRINHO, J. S.; VILLA, L. L. Identification of Novel Cellular Transcription Factors that Regulate Early Promoters of Human Papillomavirus Types 18 and 16. **Journal of Infectious Diseases**, v. 206, n. 6, p. 867–874, 15 set. 2012.

SILVA, A. M. T. C.; AMARAL, M. V. T.; DA CRUZ, A. D. O papel do papiloma vírus humano no câncer. **Biotechnol Ciênc Desenvol.**; 29:48-54, 2003.

SILVA, R. C. O.; LIMA, R. C. P.; CORDEIRO, M. N.; SANTOS, D. L.; PENA, L. J.; GURGEL, A. P. A. D.; BATISTA, M. V. A.; CHAGAS, B. S.; FREITAS, A. C. Functional evaluation of human papillomavirus type 31 long control region variants. **Genomics**, 112 (2020), 6, 5066-5071, nov. 2020.

SMITH, B. et al. Sequence Imputation of HPV 16 Genomes for Genetic Association Studies. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, p. e21375 136, 23 jun. 2011.

SOEDA, E; FERRAN, MC; BAKER, C.C; MCBRIDE, A.A. Repression of HPV16 early region transcription by the E2 protein. **Virology** 351: 29-41, 2006

SOUTO, R.; FALHARI, J. P. B.; DA CRUZ, A. D. O papilomavírus humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. **Rev Bras Cancerologia**; 51:155-160, 2005.

STADEN, R. The Staden sequence analysis package. **Molecular biotechnology**, v. 5, n. 3, p. 233–241, jun. 1996.

STEENBERGEN, R. D.; DE WILDE, J.; WILTING, S. M.; BRINK, A. A.; SNIJDERS, P. J.; MEIJER, C. J. HPV-mediated transformation of the anogenital tract. **J Clin Virol**. 32(1): 25-33, 2005.

TAN, S. H.; BARTSCH, D.; SCHWARZ, E.; BERNARD, H. U. Nuclear matrix attachment regions of human papillomavirus type 16 point toward conservation of these genomic elements in all genital papillomaviruses. **J Virol** 72(5):3610-22, 1998.

THE PAPILLOMAVIRUS EPISTEME (PaVE): A MAJOR UPDATE TO THE PAPILLOMAVIRUS SEQUENCE DATABASE; DOORSLAER, K. V; LI, Z.;

XIRASANGAR, S.; MAES, P.; KAMINSKY, D.; LIOU, D.; SUN, Q.; KAUR, R.; HUYEN, Y.; MCBRIDE, A. A. Taxonomy Concept. https://pave.niaid.nih.gov/#explore/taxonomy/taxonomy_concept. Acesso em dezembro 2020

THIERRY, F.; YANIV, M. The BPV1-E2 trans-acting protein can be either an activator or a repressor of the HPV18 regulatory region. **EMBO J** 6:3391-3397, 1987.

TRIMBLE, C. L. et al. Active and passive cigarette smoking and the risk of cervical neoplasia. **Obstetrics and Gynecology**, v. 105, n. 1, p. 174–181, jan. 2005.

UEDA, M. et al. Murine double-minute 2 homolog single nucleotide polymorphism 309 and the risk of gynecologic cancer. **Human Cell**, v. 22, n. 2, p. 49–54, 1 maio 2009.

VAN DOORSLAER, K. Evolution of the Papillomaviridae. **Virology**, Special Issue: The Papillomavirus Episteme. v. 445, n. 1–2, p. 11–20, out. 2013.

VANDE POL, S. B.; KLINGELHUTZ, A. J. Papillomavirus E6 oncoproteins. **Virology**, Special Issue: The Papillomavirus Episteme. v. 445, n. 1–2, p. 115–137, 137, out. 2013.

VILLA, L. L. et al. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. **The Journal of General Virology**, v. 81, n. Pt 12, p. 2959–2968, dez. 2000.

WALBOOMERS, J. M.; JACOBS, M. V.; MANOS, M. M.; BOSCH, F. X. KUMMER, J. A.; SHAH, K. V.; SNIJDERS, P. J.; PETO, J.; MEIJER, C. J.; MUÑOZ, N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **Journal of Pathology**, v.189,n.1, p.12–19, set. 1999.

WANG, J. W.; RODEN, R. B. S. L2, the minor capsid protein of papillomavirus. **Virology**, Special Issue: The Papillomavirus Episteme. v. 445, n. 1–2, p. 175–186, out. 2013.

WARD, K. K.; BERENSON, A. B.; BREITKOPF, C. R. Passive smoke exposure and abnormal cervical cytology in a predominantly Hispanic population. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 204, n. 3, p. 213.e1–6, mar. 2011.

WHO/ICO INFORMATION CENTRE ON HPV AND CERVICAL CANCER (**HPV INFORMATION CENTRE**) Human papillomavirus and related cancers in Brazil. 2015.

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, jan. 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO | Strengthening cervical cancer prevention and control. – Report of the GAVI-UNFPA-WHO meeting. WHO/RHR/10.13; 2010. http://www.who.int/reproductivehealth/publications/cancers/rhr_10_13/en/ Acesso em: Novembro, 2017.

XI, J.; CHEN, J.; XU, M.; YANG, H.; LUO, J.; PAN, Y.; WANG, X.; QIU, L.; YANG, J.; SUN, Q. Genetic variability and functional implication of the long control region in HPV-16 variants in Southwest China. **PLoS ONE** 12(8): e0182388, 2017.

XI, L. F.; DEMERS, G. W.; KOUTSKY, L. A.; KIVIAT, N. B.; KUYPERS, J.; WATTS, D. H.; HOLMES, K. K.; GALLOWAY, D. A. Analysis of human papillomavirus type 16 variants indicates establishment of persistent infection. **J Infect Dis** 172:747-755, 1995.

XI, L. F.; KOUTSKY, L. A.; GALLOWAY, D. A.; KUYPERS, J.; HUGHES, J. P.; WHEELER, C. M.; HOLMES, K. K.; KIVIAT, N. B. Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. **J Natl Cancer Inst** 89:796-802, 1997.

XI, L. F. et al. Association of human papillomavirus type 31 variants with risk of cervical intraepithelial neoplasia grades 2-3. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 131, n. 10, p. 2300–2307, 15 nov. 2012.

XI, L. F. et al. Risk for high-grade cervical intraepithelial neoplasia associated with variants of human papillomavirus types 16 and 18. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 16, n. 1, p. 4–10, jan. 2007.

YAMADA, T. et al. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. **Journal of Virology**, v. 71, n. 3, p. 2463–2472, mar. 1997.

ZEHBEL, I. et al. Rare human papillomavirus 16 E6 variants reveal significant oncogenic potential. **Molecular Cancer**, v. 10, p. 77, 2011.

ZIGUI C.; DE FREITAS, L. B.; BURK, R. D. Evolution and classification of oncogenic human papillomavirus types and variants associated with cervical cancer. **Methods Mol Biol.** 1249: 3–26. doi:10.1007/978-1-4939-2013-6_1, 2015.

ZUNA, R. E. et al. HPV 16 variant lineage, clinical stage, and survival in women with invasive cervical cancer. **Infectious Agents and Cancer**, v. 6, n. 1, p. 19, 28 out. 2011.

ZUR HAUSEN, H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1288, n. 2, p. F55–78, 9 out. 1996.

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