



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

ELIAS TIBÚRCIO JÚNIOR

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE VARIANTES DO ONCOGENE
E7 DO HPV-58 ISOLADOS DE PACIENTES, ATRAVÉS DA VIA NF-KB**

Recife
2023

ELIAS TIBÚRCIO JÚNIOR

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE VARIANTES DO ONCOGENE
E7 DO HPV-58 ISOLADOS DE PACIENTES, ATRAVÉS DA VIA NF-KB**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Inovação Terapêutica. Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Bárbara Simas Chagas

Recife

2023

Catálogo na Fonte
Bibliotecário: Marcos Antonio Soares da Silva
CRB4/1381

Tibúrcio Júnior, Elias

Investigação da atividade biológica de variantes do oncogene E7 do HPV-58 isolados em pacientes, através da via NF-KB. / Elias Tibúrcio Júnior . – 2023.

87 f. : il., fig.; tab.

Orientador: Antonio Carlos de Freitas.
Coorientadora: Bárbara Simas Chagas.

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, 2023.

Inclui referências e apêndice.

HPV-58. 2. NF-kB. 3. Variantes. 4. Polimorfismos. I. Freitas, Antonio Carlos de (Orient.). II. Chagas, Bárbara Simas (Coorient.). III. Título.

ELIAS TIBÚRCIO JÚNIOR

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE VARIANTES DO ONCOGENE
E7 DO HPV-58 ISOLADOS DE PACIENTES, ATRAVÉS DA VIA NF-KB**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Biociências, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Inovação Terapêutica. Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde.

Aprovado em: 13/06/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Paulo Euzébio Cabral (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof^a. Dr^a. Maria Angélica Ramos da Silva (Examinador Externo)
Instituto Federal da Paraíba - IFPB

Prof. Dr. Breno Caldas de Araújo (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof^a. Dr^a. Vanessa Emanuelle Pereira Santos (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dedico este trabalho aos meus amados pais, Elias Tibúrcio Gomes e Maria Lúcia Nunes Gomes, que sempre me apoiaram e fizeram o melhor por mim. A vocês, minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me deu forças e sabedoria para realização deste trabalho. Sem Ele nada disso seria possível.

Aos meus pais, Elias Tibúrcio e Lúcia Nunes, por tudo que fizeram por mim, por tanto esforço para que eu pudesse ter uma boa educação e por todo apoio incondicional para que eu chegasse até aqui. Vocês sempre serão minha maior inspiração.

Aos meus familiares que sempre me apoiaram e se orgulharam de mim, em especial à minha tia Lindineide e à minha avó Severina.

Aos meus amigos e colegas de laboratório do LEMTE, que fizeram com que essa jornada fosse mais leve, que sempre me ajudaram e que estiveram ao meu lado quando precisei. Minha gratidão a Ruany, Daffany, Bianca e Anna Jéssica, por toda ajuda durante esse período, troca de conhecimentos e apoio nos experimentos.

Ao meu orientador, Antonio de Freitas, por todo conhecimento compartilhado, por toda ajuda, incentivo e paciência. Obrigado por toda compreensão e apoio durante todo esse período.

Aos meus amigos que sempre me apoiaram e torceram pelo meu sucesso e conclusão deste trabalho!

RESUMO

A infecção pelo Papilomavirus Humano é o principal fator responsável pela carcinogênese cervical. A oncogenicidade do HPV pode estar associada ao seu tipo viral, variantes virais e a presença de polimorfismos nos seus oncogenes, como é o caso de E6 e E7. Essas variações podem ter papel primordial no grau e velocidade da progressão a malignidade. Em alguns casos, os polimorfismos levam a mudanças na função biológica, resultando em alterações clínicas. Quando presentes em E7, os polimorfismos podem atuar alterando a expressão de genes responsáveis pelo gerenciamento do ciclo celular (pRB), além de levar a possíveis alterações na via inflamatória (NF- κ B). O HPV-58 faz parte do grupo de HPVs de alto risco oncogênico, e está entre os tipos mais prevalentes na região nordeste do Brasil. No estudo aqui apresentado, foi descrito a presença das variantes do HPV-58 em pacientes atendidas em hospitais do Recife (PE) e Aracaju (SE). Foi realizada uma análise funcional dessas variantes baseadas na atividade da via NF- κ B dos polimorfismos de E7 do HPV-58. Também foi avaliada a expressão de mRNA, do oncogene E7, a partir de cultura celular, utilizando células C33A. Entre as variantes do HPV-58, as linhagens A, C e D foram detectadas, sendo a linhagem A detectada em amostras de lesão cervical de alto grau. Variações de nucleotídeos presentes no oncogene E7 do HPV são importantíssimos, visto que, E7 desempenha um importante papel no desenvolvimento do câncer do colo do útero, devido à sua capacidade de inativar produtos de genes supressores de tumor. A ativação de NF- κ B em grau elevado é capaz de aumentar a sobrevivência celular, inibindo a morte celular programada através do estímulo de transcrição de genes antiapoptóticos. As variantes HPV58/UFPE-58SE e HPV58/UFPE-60M apresentaram atividade de ativação da via NF- κ B semelhante ao protótipo. A variante HPV58/UFPE-54PE se comportou de modo diferente das demais variantes, observando-se a diminuição da atividade da via NF- κ B, quando comparada a referência E7. A variante HPV58/UFPE-54PE foi a que apresentou a menor expressão de mRNA, correlacionando com o nível de ativação da via NF- κ B. Esse estudo pode fornecer dados relevantes a respeito de alterações genéticas, no oncogene E7 do HPV-58, e suas possíveis implicações na via NF- κ B e sua relação com diferentes graus de lesão resultante.

Palavras-chave: HPV-58; NF- κ B; variantes; polimorfismos.

ABSTRACT

Human Papillomavirus infection is the main factor responsible for cervical carcinogenesis. The oncogenicity of HPV may be associated with its viral type, viral variants and the presence of polymorphisms in its oncogenes, such as E6 and E7. These variations may play a key role in the degree and speed of progression to malignancy. In some cases, polymorphisms lead to changes in biological function, resulting in clinical changes. When present in E7, polymorphisms can act by altering the expression of genes responsible for cell cycle management (pRB), in addition to leading to possible changes in the inflammatory pathway (NF- κ B). HPV-58 is part of the group of high oncogenic risk HPVs and is among the most prevalent types in the northeast region of Brazil. In the study presented here, the presence of HPV-58 variants was described in patients treated at hospitals in Recife (PE) and Aracaju (SE). A functional analysis of these variants based on the activity of the NF- κ B pathway of the E7 polymorphisms of HPV-58 was performed. The mRNA expression of the E7 oncogene from cell culture using C33A cells was also evaluated. Among the HPV-58 variants, A, C, and D strains were detected, with A strain being detected in high-grade cervical lesion specimens. Nucleotide variations present in the HPV E7 oncogene are extremely important, since E7 plays an important role in the development of cervical cancer, due to its ability to inactivate tumor suppressor gene products. Activation of NF- κ B to a high degree is capable of increasing cell survival, inhibiting programmed cell death by stimulating the transcription of anti-apoptotic genes. The HPV58/UFPE-58SE and HPV58/UFPE-60M variants showed similar activation activity in the NF- κ B pathway as the prototype. The HPV58/UFPE-54PE variant behaved differently from the other variants, observing a decrease in the activity of the NF- κ B pathway, when compared to reference E7. The HPV58/UFPE-54PE variant showed the lowest mRNA expression, correlating with the level of activation of the NF- κ B pathway. This study may provide relevant data regarding genetic alterations, in the E7 oncogene of HPV-58, and their possible implications in the NF- κ B pathway and its relationship with different degrees of resulting lesion.

Keywords: HPV-58; NF- κ B; variants; polymorphisms.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ciclo de vida do HPV	14
Figura 2 – Representação linear do genoma do HPV31	16
Figura 3 – Genoma do HPV 16	18
Figura 4 – Árvore filogenética inferida das sequências de nucleotídeos L1 de 189 papilomavírus	20
Figura 5 – Árvores filogenéticas mostrando tipos representativos e linhagens/sublinhagens variantes de alfa-9	21
Figura 6 – Infecção viral em células do colo do útero, diferenciação de queratinócitos e expressão de proteínas do HPV	23
Figura 7 – Fatores celulares direcionados por proteínas do HPV para manter a competência do ciclo celular em células suprabasais	25
Figura 8 – Vias NF- κ B canônicas e não canônicas	28
Figura 9 - Árvore filogenética de HPV-58	42
Figura 10 – Modelagem da proteína E7 do HPV58	45
Figura 11 – Predição de epítomos de células T e células B	45
Figura 12 – Efeito de E7 (HPV-58) e suas variantes na atividade de NF- κ B	47
Figura 13 – Expressão de E7 de HPV-58 e suas variantes	48
 Quadro 1 – Variabilidade genética de E7 dos isolados de HPV-58 detectados em Pernambuco	 37
Quadro 2 – Grau de lesões de amostras positivas para HPV-58	40
Quadro 3 – Variabilidade de nucleotídeos e aminoácidos da região E7 do HPV-58 e a suposta função biológica afetada	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados do teste LRT para detecção de locais sob seleção positiva (diversificadora) . 43

Tabela 2 – Impacto previsto de mutações na estabilidade estrutural da proteína HPV58 E7, conforme determinado pelo Site Directed Mutator..... 44

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 HPV E CÂNCER CERVICAL	13
2.2 GENOMA E ESTRUTURA VIRAL DO HPV	15
2.3 HPVS: GENÓTIPOS E VARIANTES	18
2.4 CICLO INFECCIOSO DO HPV E CARCINOGENESE VIRAL	22
2.5 VIA NF-kB, HPV E CÂNCER CERVICAL.....	26
3 OBJETIVOS.....	32
3.1 OBJETIVO GERAL	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 ASPECTOS ÉTICOS E BIOSSEGURANÇA.....	33
4.2 GRUPOS DE ESTUDO E ISOLAMENTO DE DNA	33
4.3 TRIAGEM DE HPV (DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DO HPV).....	33
4.4 SEQUENCIAMENTO DO ONCOGENE 47 E ANÁLISE DE VARIANTES	34
4.5 ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	35
4.6 ANÁLISE DE PRESSÕES SELETIVAS	35
4.7 MODELAGEM DE PREDIÇÃO DE ESTRUTURA DA PROTEÍNA	36
4.8 PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS DE CÉLULAS T E CÉLULAS B.....	37
4.9 CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEOS E CLONAGEM.....	37
4.10 ISOLAMENTO DE DNA DE VETORES RECOMBINANTES E TRANSFEC- ÇÃO DO C33A.....	38
4.11 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO CONDUZIDA POR E7 DE HPV-58	38
4.12 qPCR EM TEMPO REAL	39
4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
5 RESULTADOS.....	40
5.1 DETECÇÃO E TIPAGEM DE HPV	40
5.2 VARIAÇÕES NA SEQUÊNCIA DE E7 HPV-58	41
5.3 ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	42
5.4 ANÁLISE DE PRESSÃO SELETIVA.....	43
5.5 ANÁLISE ESTRUTURAL DE MUTAÇÕES E7.....	44
5.6 PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS DE CÉLULAS T E CÉLULAS B.....	45
5.7 EFEITO DAS VARIANTES POLIMÓRFICAS E7 NA VIA NF-KB.....	46

5.8 VARIANTE 54PE DE E7 DE HPV-58 APRESENTOU A MENOR EXPRESSÃO DE mRNA E7	47
6 DISCUSSÃO	49
7 CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS.....	55
APÊNDICE A – ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA.....	68

1 INTRODUÇÃO

O câncer de colo do útero, também conhecido como câncer cervical, é considerado o terceiro tumor maligno (excetuando-se o câncer de pele não melanoma) mais frequente na população feminina no Brasil, ficando atrás apenas do câncer de mama e colo retal e o quarto tipo de câncer que mais mata mulheres no Brasil todos os anos. Segundo dados de 2019 do Instituto Nacional de Câncer (Inca), a estimativa é de 16.590 novos casos e o número de mortes em 2019 foi cerca de 6.596 óbitos (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2019a).

O principal fator de risco para o desenvolvimento do câncer de colo do útero é a infecção persistente pelo Papilomavírus Humano (HPV). O prognóstico dessa patogênese está relacionado principalmente ao tipo de HPV presente na infecção e o período de replicação do vírus que infecta as células epiteliais, infecção esta que está presente na zona de transformação do colo do útero. Existe uma relação entre os tipos de HPV de alto risco com o desenvolvimento do câncer cervical, relação que se deu através de estudos epidemiológicos que mostraram a detecção do vírus em mais de 99,7% em carcinoma de células escamosas e em quase 100% de amostras de carcinoma cervical adenoescamoso (Clifford *et al.*, 2003; Crosbie *et al.*, 2013).

Estudos demonstraram que a infecção pelo HPV de alto risco é um fator causal na progressão do câncer cervical. Até agora, mais de 40 tipos diferentes de HPV já foram detectados no trato genital feminino, sendo 15 deles classificados como de alto risco oncogênico (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82), de acordo com a associação epidemiológica e os casos de desenvolvimento do câncer cervical (Schulte-Frohlinde *et al.*, 2022).

O genoma do HPV está dividido em três regiões: a longa região de controle (LCR-Long Control Region), a região precoce (E-Early) e a região tardia (L-Late). A LCR compreende cerca de 1kb e está localizada entre as Open Reading Frames (ORFs) L1 e E6, que contém as sequências acentuadoras e repressoras da transcrição viral e origem de replicação. A depender do tipo de HPV, a região E (precoce) é formada pelos genes: E1, E2, E4, E5, E6 e E7, que são expressos imediatamente após a infecção da célula hospedeira e cujos produtos participam da replicação do genoma viral, controle de expressão viral, fuga do sistema imunológico e alteração do ciclo celular. A região L (tardia) é composta pelos genes L1 e L2, que

são expressos tardiamente e compõem as proteínas estruturais do vírus (Graham, 2017).

Os HPVs de alto risco possuem atividade transformante que é promovida pelas oncoproteínas E6 e E7, estas oncoproteínas atuam inativando produtos dos principais supressores tumorais, TP53 e pRb, respectivamente. Essa atividade transformante das oncoproteínas se dá principalmente através da indução da proliferação, imortalização e transformação maligna das células infectadas pelo vírus, facilitando, desta maneira o desenvolvimento do câncer (Roman; Munger, 2013; Pol; Klingelutz, 2013).

Alterações nos oncogenes E6 e E7, podem provocar mudanças conformacionais em suas oncoproteínas, e por consequência, alterar suas funções biológicas e seu papel no câncer cervical. Tais modificações devem ser consideradas para o diagnóstico, prevenção e terapia empregados no controle de infecções persistentes (Zhou *et al.*, 2019).

Visto a importância do entendimento do papel dos polimorfismos em E6 e E7 no desenvolvimento do câncer de colo de útero, o presente estudo tem como objetivo, caracterizar e avaliar a função de polimorfismos do oncogenes E7 do HPV-58 com a finalidade de identificar o potencial real desses polimorfismos e a importância clínica com relação à oncogenicidade do câncer de colo uterino em mulheres na região Nordeste do Brasil, utilizando como modelo de funcionalidade a via NF- κ B.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 HPV E CÂNCER CERVICAL

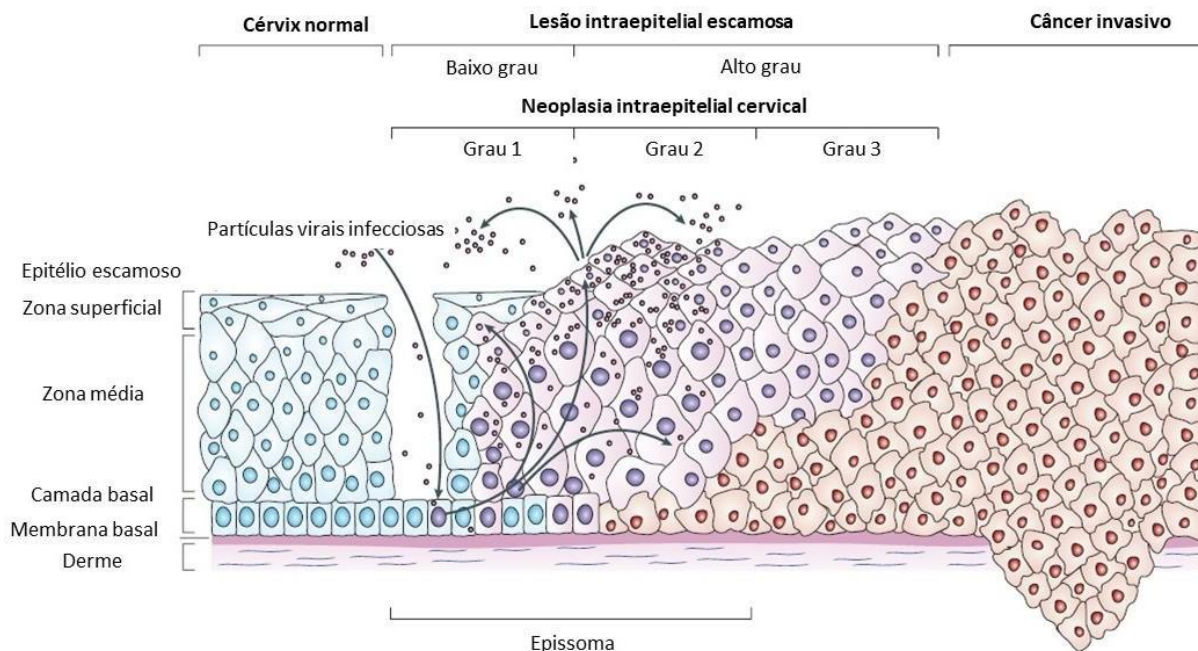
Segundo dados da última estimativa mundial, do ano de 2018, o câncer cervical ocupa o quarto lugar entre os cânceres mais frequentes em mulheres (6,6%) (Bray *et al.*, 2018). A estimativa é de cerca de 570 mil novos casos, o que representa 3,2% de todos os cânceres (Ferlay *et al.*, 2019).

No Brasil, excetuando-se o câncer de pele não melanoma, o câncer de colo do útero ocupa a terceira colocação como um dos cânceres mais prevalentes na população feminina (7,4%). Segundo estimativas, são esperados no Brasil, para cada ano do triênio 2020-2022, cerca de 16.590 novos casos de câncer de colo do útero, com um risco estimado de 15,43 casos a cada 100 mil mulheres (Inca, 2019a). O câncer cervical é o segundo mais incidente nas regiões Norte (21,20/100 mil), Nordeste (17,62/100 mil) e Centro-Oeste (15,92/100 mil) e ocupa a quarta e quinta colocação na região Sul (17,48/100 mil), e na região Sudeste (12,01/100 mil), respectivamente (Inca, 2019a).

Denominadas de neoplasias intraepiteliais cervicais-NIC (cervical intraepithelial neoplasia-CIN) ou lesão intraepitelial escamosa (squamous intraepithelial lesions-SIL, as NICs são lesões pré-malignas não invasivas que antecedem o câncer cervical. A classificação das neoplasias intraepiteliais é feita de acordo com a sua morfologia e em qual estágio as células epiteliais se encontram, sendo classificadas em três graus: NIC I-displasia leve; NIC II-displasia moderada e NIC III-displasia severa, que pode progredir para o câncer invasivo (Schiffman *et al.*, 2007; Woodman; Collins; Young, 2007).

Através do Sistema de nomenclatura Bethesda, as lesões intraepiteliais são classificadas citologicamente e divididas em: ASC (células escamosas atípicas), LSIL (lesões intraepiteliais escamosas de baixo grau), que equivale a NIC I, HSIL (lesões intraepiteliais escamosas de alto grau high-grade SIL), que equivale a NIC II e NIC III, e carcinoma espinocelular (Figura 1). Além disso, ainda há uma categoria denominada ASC, que compreende “células atípicas de significância indeterminada (ASCUS)” na versão anterior do Sistema Bethesda. Essa categoria é utilizada no relato de resultados limítrofes ou ambíguos (Alrajjal *et al.*, 2021; Pangarkar, 2022).

Figura 1 – Ciclo de vida do HPV



Fonte: Adaptado de Woodman, Collins e Young (2007).

As células basais do epitélio cervical repousam sobre a membrana basal, que é sustentada pela derme. Supõe-se que o HPV entre nas células basais através de microabrasões no epitélio cervical. Após a infecção, os genes precoces do HPV E1, E2, E4, E5, E6 e E7 são expressos e o DNA viral se replica a partir do DNA episossomal (núcleos roxos). Nas zonas média e superficial (camadas superiores do epitélio) é onde o genoma viral é replicado ainda mais, e ocorre a expressão dos genes tardios L1 e L2 e E4. L1 e L2 encapsulam os genomas virais para formar virions descendentes no núcleo. O vírus eliminado pode então iniciar uma nova infecção. Lesões intraepiteliais de baixo grau suportam a replicação viral produtiva. Um número desconhecido de infecções por HPV de alto risco progride para neoplasia intraepitelial cervical de alto grau (HGCIN). A progressão de lesões não tratadas para câncer microinvasivo e invasivo está associada à integração do genoma do HPV nos cromossomos do hospedeiro (núcleos vermelhos), com perda ou ruptura associada de E2 e subsequente regulação positiva da expressão dos oncogenes E6 e E7. LCR, região de controle longa.

Para o rastreamento de lesões precursoras do câncer cervical, o exame mais comum realizado é o exame citopatológico (Papanicolaou), implementado de forma regular nos serviços públicos de saúde brasileiro na década de 1990, e atua como estratégia de detecção precoce (Inca, 2019b). O teste é um importante aliado no combate ao câncer cervical, visto que quando as lesões pré-neoplásicas são diagnosticadas precocemente, as chances de se evitar a progressão para o câncer invasivo são maiores (Peirson *et al.*, 2013).

A infecção pelo HPV é reconhecida como o principal fator que leva ao desenvolvimento do câncer do colo do útero. Estudos epidemiológicos demonstram que a taxa de infecção viral pode chegar a 80%, em mulheres sexualmente ativas (Chesson *et al.*, 2014; Hu; Ma, 2018; Zur Hausen, 2002). As infecções por HPV são

comumente combatidas pelo sistema imune do hospedeiro, sendo eliminadas espontaneamente, no entanto, em alguns casos, nas infecções ocasionadas por HPVs de alto risco oncogênico, o organismo não consegue combatê-las, tornando-se infecções persistentes e posteriormente contribuindo para o desenvolvimento do câncer cervical (Hu *et al.*, 2015; Woodman; Collins; Young, 2007). Outros cofatores podem contribuir para a persistência da infecção pelo HPV e progressão natural do câncer cervical, como por exemplo: nutrição, contraceptivos orais, infecção por *Chlamydia trachomatis*, fumo, imunossupressão e polimorfismos genéticos (Tota *et al.*, 2011).

O desenvolvimento de câncer cervical está diretamente relacionado ao ciclo viral do HPV, e depende de fatores, como, por exemplo, se a infecção é por um tipo de HPV de alto ou baixo risco e do período de replicação do vírus nas células epiteliais da zona de transformação (Burd, 2003; Moberg *et al.*, 2005; Schiffman *et al.*, 2007; Woodman; Collins; Young, 2007).

A relação entre as infecções genitais por HPV e câncer cervical foi demonstrada pela primeira vez, no início dos anos 80 e desde então, essa ligação tornou-se bem estabelecida (Burd, 2003). A presença do HPV foi implicada em 99,7% dos casos de câncer de células escamosas cervicais em todo o mundo e em mais de 90% das amostras de carcinoma cervical do tipo adenoescamoso (Franco, 1995; Waggoner, 2003; Walboomers *et al.*, 1999; Zur Hausen, 2002).

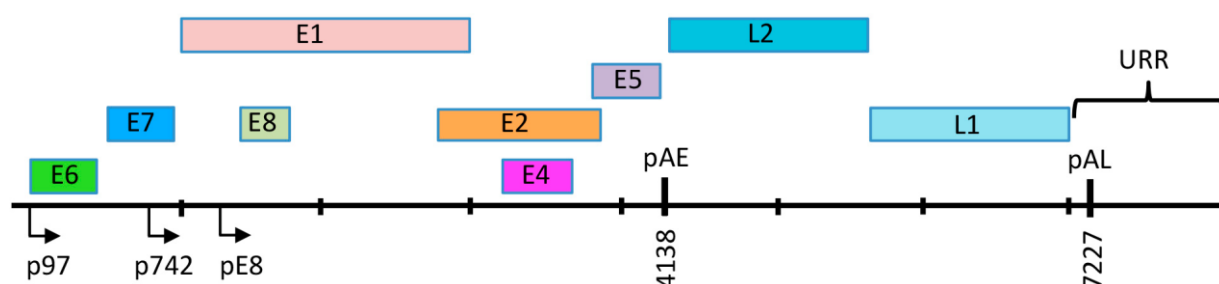
2.2 GENOMA E ESTRUTURA VIRAL DO HPV

O Papilomavirus é considerado um vírus pequeno de DNA circular, dupla fita, de cerca de 8 kb, não envelopado, com diâmetro medindo cerca de 55 nm. Seu capsídeo é icosaédrico e composto por 72 capsômeros, contêm duas proteínas do capsídeo, chamadas de L1 e L2. Cada capsômero do vírus é um pentâmero de L1, principal proteína do capsídeo, e cada capsídeo do virion contém várias cópias da proteína secundária (12 moléculas), L2 na qual sua extensão atravessa toda a estrutura da partícula viral e associa-se ao DNA viral em forma de nucleossomo (Burd, 2003; Magalhães *et al.*, 2021; Modis; Trus; Harrison, 2002).

Os genomas dos PVs são compostos por 8 genes (L1 e L2 que codificam proteínas do capsídeo e E1, E2, E4, E5, E6 e E7 que atuam codificando proteínas envolvidas na replicação, transcrição e transformação; e uma região de controle longo

regulatória, não codificante (*long control region*-LCR) como mostra a Figura 2 (Bernard; Calleja-Macias; Dunn, 2006; Burk; Harari; Chen, 2013; Moody, 2017). A transcrição e replicação são reguladas por meio de elementos cis- responsivos na região de LCR, entre os genes L1 e E6, e os demais elementos estão localizados dentro dos genes (Bernard; Calleja-Macias; Dunn, 2006).

Figura 2 – Representação linear do genoma do HPV31



Fonte: Moody (2017).

Os quadros de leitura aberta (ORF) são indicados pelos blocos de cores. O promotor inicial está localizado a montante da ORF E6 (p97) e o promotor tardio está localizado na ORF E7 (p742). E8~E2 é expresso a partir de um promotor localizado na ORF E1 (pE8). O local de poliadenilação precoce está localizado na extremidade 3' da ORF E5 (pAE) e o local de poliadenilação tardia (pAL) está localizado na URR (Região Reguladora a montante). A origem de replicação, bem como os sítios de ligação E1 e E2 também estão localizados na URR.

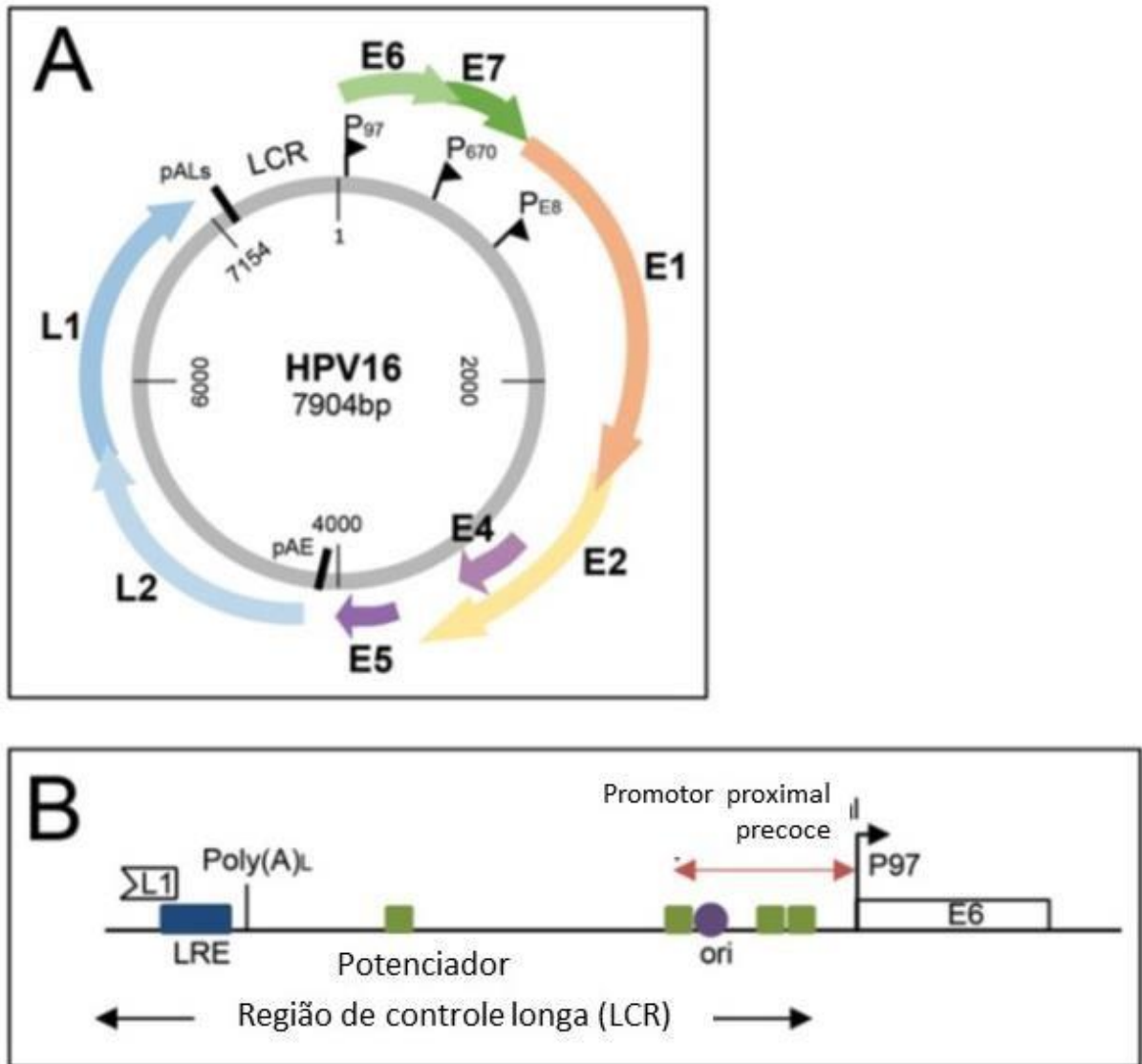
O genoma dos Papilomavírus contém sequências que são expressas de acordo com um padrão precoce e tardio, que varia de acordo com a diferenciação da célula hospedeira ao longo da infecção. Os genes são divididos em E (early) e L (late). Os genes E são expressos ainda nos primeiros estágios da infecção. Estes genes possuem funções regulatórias, atuando no controle da transcrição, replicação viral, e transformação celular. A expressão dos genes L se dá apenas nos estágios finais da infecção, e são responsáveis pela composição do capsídeo viral. A região LCR (*Long Control Region*), contém os sítios de interação cis com fatores transcricionais do vírus e da célula hospedeira, e também a origem de replicação (Burd, 2003; Brianti; De Flammineis; Mercuri, 2017).

Seguindo o mesmo padrão de morfologia dos outros Papilomavírus, o genoma do HPV pode variar no seu número de ORFs, além do tamanho e sequência dessas ORFs. O genoma do HPV existe como um círculo fechado covalentemente, de tamanho aproximado de 8 kb (Figura 3). Esses genomas do HPV são associados a histonas no virion, e nas células infectadas, exibindo um padrão nucleossômico

semelhante ao do DNA celular (McBride, 2017; Moody, 2017; Stünkel; Bernard, 1999). Os genomas do HPV contêm de seis a oito ORFs que são expressos como transcrições policistrônicas. Nos HPVs de alto risco, dois promotores principais estão ativos em diferentes estágios do ciclo de vida viral. Durante a infecção, nas células epiteliais indiferenciadas, sabe-se que, a expressão do gene viral é regulada pelo promotor precoce, localizado adjacente à ORF E6. O promotor precoce direciona a expressão das proteínas virais, sendo E1 uma helicase ATP-dependente que facilita o desenrolamento do DNA viral e recruta fatores celulares para a origem de replicação, enquanto a proteína E2 é uma proteína de ligação de DNA de sequência específica que possui vários locais de ligação na URR, e que age como um regulador transcricional. A expressão de E1 e E2 é necessária para a replicação viral. No caso da progressão da infecção produtiva, avanço do ciclo celular e o atraso na diferenciação dos queratinócitos, essa ação se dá através da participação das proteínas E5, E6 e E7 (Stünkel; Bernard, 1999; Zur Hausen, 2002; Steenbergen *et al.*, 2005; Van Doorslaer *et al.*, 2017).

Consideradas as principais oncoproteínas dos HPVs de alto risco, E5, E6 e E7 são expressos a partir do promotor precoce. E6 e E7 participam atuando nos processos de replicação viral, através de sua capacidade de modulação do ciclo celular, interrupção da apoptose, diferenciação celular, evasão do sistema imune, além de respostas a danos no DNA, sendo consideradas assim, como promotoras de oncogênese em queratinócitos primários (Moody; Laimins, 2010; Burk; Harari; Chen, 2013; Doorbar, 2013; Pol; Klingelhutz, 2013). A recomposição dos transcritos das ORFs E1/E4, conhecido como proteína E4, é responsável pela acilitação da replicação produtiva eficiente em células em diferenciação, e ao fim desta infecção produtiva, dá-se início ao processo de montagem do capsídeo viral, resultado da expressão tardia de L1 e L2, respectivamente (Buck *et al.*, 2008; Anacker; Moody, 2017).

Figura 3 – Genoma do HPV 16



Fonte: Adaptado de Graham (2017).

(A) Diagrama do genoma circular dupla fita de HPV16 (círculo cinza). As ORFs virais são indicadas com arcos coloridos acima do genoma. Os promotores são indicados com P e divisas (P₉₇, P₆₇₀, P_{E8}). Os locais de poliadenilação precoce (pAE) e tardio (pALs) são indicados com linhas retas acima do genoma circular. O LCR é indicado com uma linha azul. (B) Detalhes da LCR às vezes chamada de URR. O E6 ORF é mostrado com um retângulo aberto. A extremidade da ORF L1 é mostrada como um retângulo parcialmente aberto. O promotor inicial (P₉₇) é indicado com uma ponta de seta. A região do promotor proximal é indicada com uma linha vermelha com ponta de seta dupla. Quatro sítios de ligação E2 na LCR estão indicados com quadrados verdes. A origem de replicação (ori) para a qual as ligações E1 são mostradas como um círculo roxo. O local de poliadenilação tardia é indicado por Poly(A)_L e uma linha reta. O elemento regulador tardio que controla a expressão gênica tardia é indicado com uma caixa azul.

2.3 HPVS: GENÓTIPOS E VARIANTES

Os papilomavírus (PVs) pertencem à família *Papillomaviridae*, são pequenos vírus de DNA de fita dupla e espécie-específico. Os PVs infectam preferencialmente

o epitélio cutâneo e mucocutâneo, e são responsáveis por infectar répteis e algumas espécies de mamíferos, incluindo os humanos. Dessa maneira, os PVs são denominados de acordo com o organismo que infectam. Os CRPV (Cottontail Rabbit Papillomavirus) infectam coelhos, COPV (Canine Oral Papillomavirus), BPV (Bovine Papillomavirus) infectam bovinos e HPV (Human Papillomavirus) o qual infecta humanos (Zur Hausen, 2002; Scheurer; Tortolero-Luna; Adler-Storh, 2005; Bernard *et al.*, 2010; Burk; Harari; Chen, 2013).

Devido a sua alta conservação, o gene L1 é utilizado na classificação dos PVs, de acordo com a sua sequência nucleotídica. Os Pvs são agrupados em gêneros, quando possuem mais de 60% de homologia na sequência; classificado como espécie, quando a homologia da sequência apresenta entre 71-89%; classificado como cepa quando a sequência de L1 difere em mais de 10%; classificado como uma variante quando difere em 1% em relação a sequência de referência; e por fim, para ser classificado como sublinhagem, essa sequência deve variar entre 0,5 e 1%. Por sua utilidade, L1 é a principal ferramenta na construção de árvores filogenéticas (De Villiers *et al.*, 2004; Bernard *et al.*, 2010; Burk; Harari; Chen, 2013).

A família *Papillomaviridae* é composta por 49 gêneros (Figura 4). Com base na similaridade da sequência de DNA, mais de 200 tipos de HPVs já foram identificados, e estão divididos em cinco gêneros: Alphapapillomavirus (Alfa), Betapapillomavirus (Beta), Gammapapillomavirus (Gama), Mupapillomavirus (Mu) e Nupapillomavirus (Nu).

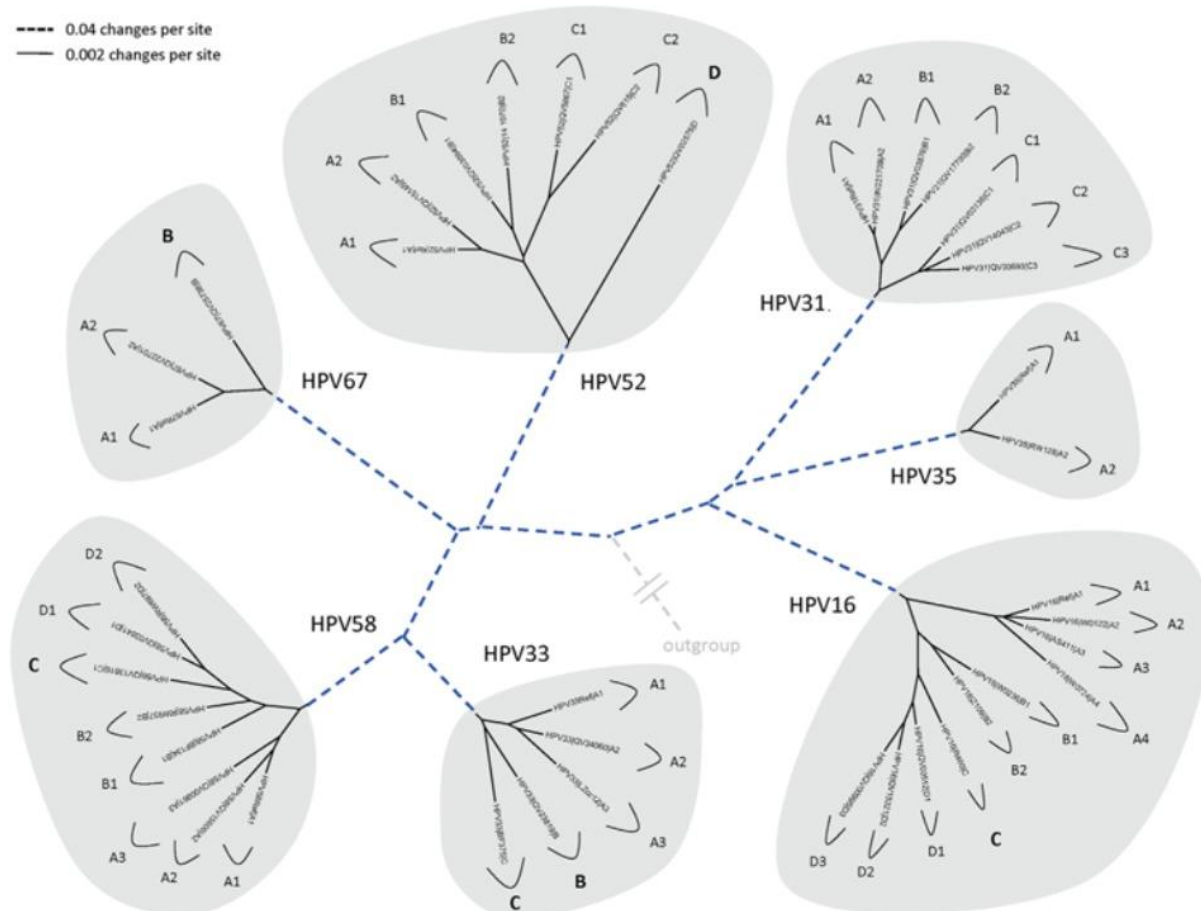
Os gêneros Alfa e Beta contêm cerca de 90% do total dos tipos virais de HPV, no qual, o gênero Alfa, contém cerca de 64 tipos de HPV, estando dividido de acordo com o seu tropismo pelo epitélio cutâneo ou mucoso (Bernard *et al.*, 2010; Moody, 2017; Van Doorslaer *et al.*, 2017).

Os HPVs estão classificados em HPVs de alto risco (HR-HPV) e HPVs de baixo risco (LR-HPV), são aproximadamente 40 tipos que tem a capacidade de infectar o trato genital humano. No grupo dos HPVs de alto risco estão os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82 e são responsáveis por causar lesões na vagina, vulva, colo do útero e pênis, com destaque para os tipos 16 e 18, presentes em cerca de 70% de todos os casos de câncer cervical, sendo assim os mais prevalentes.

Fazem parte do grupo de HPVs de baixo risco os tipos 6, 11, 42, 44, 51, 53, 83. Os HPVs de baixo risco são responsáveis por causar lesões benignas, como por

pelo desenvolvimento de verrugas e lesões papilomatosas cutâneas sem malignidade (De Villiers *et al.*, 2004; Burk; Harari; Chen, 2013).

Figura 5 – Árvores filogenéticas mostrando tipos representativos e linhagens/sublinhagens variantes de alfa-9



Fonte: Burk, Harari e Chen (2013).

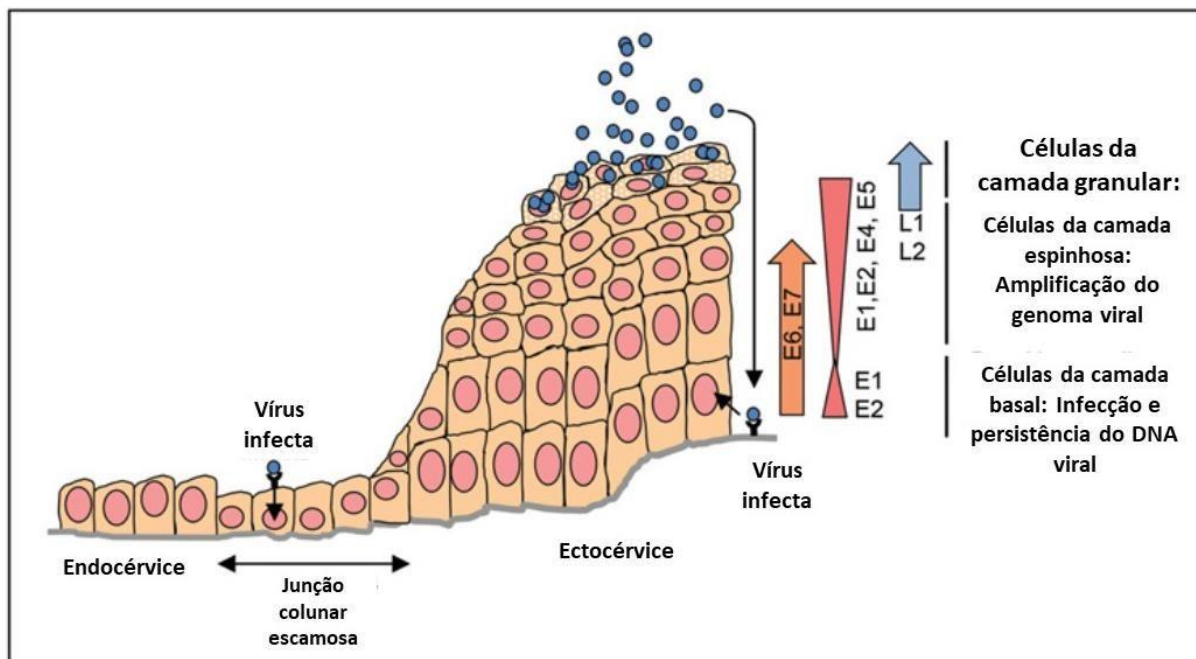
Vários estudos já foram realizados para identificar os tipos de HPVs mais prevalentes, existindo um padrão de prevalência, a distribuição dos genótipos dos HPVs varia de acordo com as áreas geográficas estudadas, no entanto, o HPV-16 até o momento, está consolidado como o mais prevalente mundialmente. Ocupando o segundo lugar entre os mais prevalentes, temos os HPVs 18 e 31, a depender da região (Europa, América Central e América do Sul) e do País estudado (Walboomers *et al.*, 1999; Clifford *et al.*, 2003; Baseman; Koutsky, 2005; Muñoz *et al.*, 2003; Woodman; Collins; Young, 2007; Baldez da Silva *et al.*, 2012; Rositch *et al.*, 2013). Na Ásia temos uma variação maior de tipos mais prevalentes (HPVs 33, 52, 53, 56 e 58). Seguindo o padrão de prevalência mundial, no Brasil temos o HPV-16 como o mais

prevalente, podendo sofrer leves alterações de frequência em algumas regiões quando comparado a outros tipos. Em Recife, capital do estado de Pernambuco, o HPV-16 segue o padrão mundial, sendo o tipo mais frequentemente detectado em amostras cervicais. Os HPVs 31, 33 e 58 são os demais tipos mais frequentes, ficando à frente do HPV-18 (Chagas *et al.*, 2011; Baldez da Silva *et al.*, 2012).

2.4 CICLO INFECCIOSO DO HPV E CARCINOGENESE VIRAL

Os queratinócitos são as células hospedeiras do HPV, e o seu ciclo viral está intimamente ligado com a diferenciação destas células. A entrada do HPV na célula ocorre através de microabrasões (Figura 6), no caso dos HPVs de alto risco, a infecção do epitélio cervical se dá nas células da junção escamocelular, entre a endo e ectocérvice (Doorbar, 2005; Herfs *et al.*, 2012; Graham, 2017). Para que essa infecção seja eficiente, é preciso que a infecção ocorra em células epiteliais basais ou tronco, em processo de divisão ativa. A proteína do capsídeo L1 se liga aos receptores celulares da membrana basal ou na superfície das células da camada basal. Os receptores primários para a ligação inicial são os proteoglicanos de sulfato de heparina (HSPGs). Quando ocorre a ligação do HPV a HSPGs, há uma mudança conformacional no capsídeo viral, mediada por ciclofilina B, e o terminal N do componente L2 acaba ficando exposto na superfície dos vírions (Bienkowska-Haba; Patel; Sapp, 2009; Richards *et al.*, 2006; Schiller; Day; Kines, 2010). Após este processo, a furina e/ou PC5/6 cliva uma região de L2, permitindo a ligação a um receptor secundário na membrana plasmática da célula alvo. Além disso, também ocorre a participação de receptores de fatores de crescimento epidérmico (EGF) (EGFRs), além de integrinas, microdomínios de membrana, lamininas e vimetinas, que atuam como receptores para a entrada de HPVs de alto risco, contribuindo para a internalização do vírus e no processo de transferência de genoma para o núcleo celular (Pyeon *et al.*, 2009; Schiller; Day; Kines, 2010; Raff *et al.*, 2013).

Figura 6 – Infecção viral em células do colo do útero, diferenciação de queratinócitos e expressão de proteínas do HPV



Fonte: Adaptado de Graham (2017).

O HPV se utiliza de receptores na camada basal, (linha cinza) através de microabrasões e infecta as células da camada basal do epitélio. De outra maneira, o HPV também pode infectar e entrar nas células na junção escamosa colunar. Nas camadas superiores ocorre a replicação do genoma viral, formando novas partículas virais, que poderão gerar novas infecções e consequente progressão para o câncer invasivo. As células (cor bege), os núcleos (cor rosa) e as partículas virais (azul). A membrana basal é mostrada como uma linha cinza. Os receptores de entrada são mostrados como uma linha marcada acima.

A entrada do HPV nas células se dá através de um mecanismo de endocitose, parecidos com a micropinocitose. O vírus circula através de componentes ligados a membrana e da rede trans-Golgi, além do envolvimento também do retículo endoplasmático nesse transporte. Desta maneira, ocorre a desencapsidação do genoma do vírus, e posterior migração para o núcleo da célula hospedeira, onde essa entrada pode ocorrer através de poros nucleares ou através da quebra da membrana nuclear durante o processo de mitose. O processo de entrada do HPV no núcleo leva cerca de 24 horas após a ligação celular. Em seguida, inicia-se a fase de replicação viral, onde serão expressos os genes precoces (E1, E1, E4, E5, E6 e E7) (Pyeon *et al.*, 2009; Day *et al.*, 2013; DiGiuseppe *et al.*, 2017).

Logo após a entrada nuclear do HPV nas células dos queratinócitos primários em divisão da camada basal ou ectocérvice, ocorre a ação das proteínas E1 e E2, que irão mediar em baixos níveis, a replicação do genoma viral (Hegde, 2002; Moody; Laimins, 2010; Maglennon; McIntosh; Doorbar, 2011). Desta maneira, a transcrição

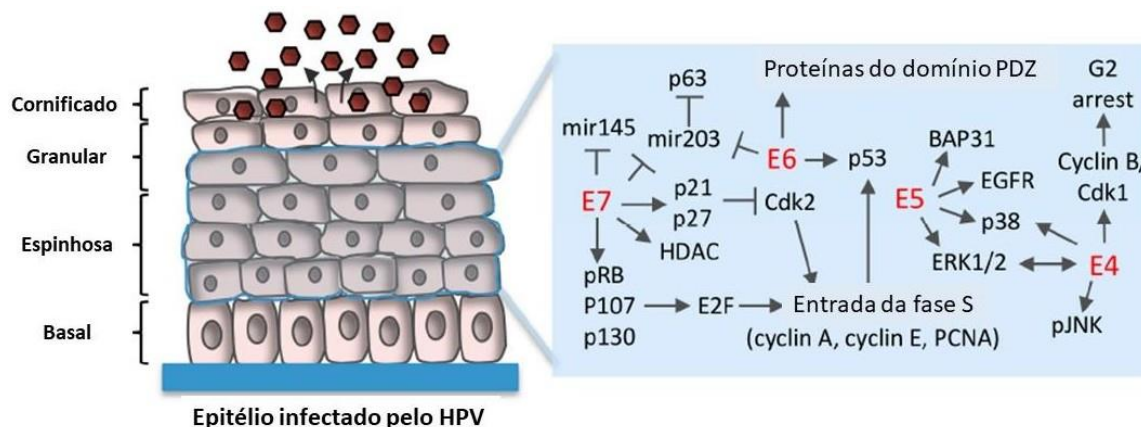
viral precoce se inicia. E2 se liga à região reguladora do HPV, a qual é necessária para a replicação do DNA viral, além de recrutar a DNA helicase E1 para a origem viral de replicação. Essa montagem do complexo de iniciação de E1/E2 na origem de replicação viral é semelhante ao que ocorre na formação do complexo entre proteínas de iniciação celular nas origens celulares, permitindo a replicação do genoma viral mesmo na ausência da síntese do DNA celular (Sanders; Stenlund, 2000; Maglennon; McIntosh; Doorbar, 2011; Dreer; Van De Poel; Stubenrauch, 2017). Ainda no estágio de diferenciação celular, o genoma do vírus dá início ao processo de transcrição dos genes da fase tardia do ciclo de infecção (L1 e L2), responsáveis pela formação dos capsídeos virais, estando aptos a iniciar uma nova infecção. A proteína E2 regula dois promotores no genoma viral, o p670 (localizado no gene E7) e o p97 (localizado na região 3' da LCR). E2 atua reprimindo transcricionalmente p97, evitando a ativação da resposta imune local. E2 também permite a expressão de E4, além de outros genes da fase tardia, e de L1 e L2 (Dreer; Van De Poel; Stubenrauch, 2017; McBride, 2017; Westrich; Warren; Pyeon, 2017).

É no processo de descamação do epitélio superior que irá ocorrer a liberação de novas partículas virais nos queratinócitos diferenciados. Esses queratinócitos primários, localizados na camada basal, servirão como um estoque de DNA viral, que será propagado no epitélio. Durante o processo de produção de novas partículas virais, o genoma viral irá se integrar ao hospedeiro, e assim se iniciará um dos principais eventos de carcinogênese, sendo mediado pelo HPV. Para que essa integração do DNA viral ocorra é necessária que haja a quebra na região de E1 e E2, acarretando na perda da expressão dos mesmos, e quando isso ocorre (perda de E2), há uma superexpressão dos genes E6 e E7, peças chave no processo de imortalização celular (Doorbar, 2005; Moody; Laimins, 2010).

Nas células das camadas inferiores e médias inferiores, com destaque para a camada basal, E6 e E7 são expressos, atuando na progressão do ciclo celular e apoptose. Acredita-se que E6 e E7 atuem em conjunto, em lesões causadas por HPVs de alto risco, no controle e associação de reguladores do ciclo celular (Figura 7). A oncoproteína E6 participa da transformação dos queratinócitos, interagindo com diversos alvos celulares, com destaque para a proteína p53 e proteínas da família PDZ, que são responsáveis pela supressão tumoral, sinalização celular e manutenção da polaridade celular. Outro importante alvo que pode ser citado é a TNF (fator de

necrose tumoral), que está relacionada a via de apoptose (Roman; Munger, 2013; Pol; Klingelutz, 2013).

Figura 7 – Fatores celulares direcionados por proteínas do HPV para manter a competência do ciclo celular em células suprabasais



Fonte: Adaptado de Moody (2017).

De forma a facilitar a amplificação do genoma viral nas células das camadas suprabasais, E6 e E7 atuam em conjunto. A oncoproteína E6 possui uma importante função no processo de carcinogênese viral, agindo na degradação e inativação de P53, através da interação com a ubiquitina ligase E6AP, que é codificada pelo gene UB3A (Patel, 1999). Essa degradação de P53 pelo complexo E6-E6AP resulta na redução dos níveis líquidos de p53. Além disso, E6 também pode interferir na função de p53 através de sua ligação às duas histonas acetiltransferases, a p300 e Proteína de ligação CREB -CBP (CREB bind Protein), interferindo na acetilação de p53 por esses fatores e consequentemente diminuindo sua estabilidade (Zimmermann *et al.*, 1999; Moody, 2017).

Em condições normais (células não infectadas), após deixarem a camada basal, o potencial proliferativo dessas células é perdido, iniciando um programa de diferenciação terminal. No caso do ciclo de vida do HPV, esse potencial de diferenciação celular de células epiteliais é fundamental para a manutenção dos fatores necessários à replicação produtiva do vírus (Graham, 2017). Nesse contexto, E7 desempenha um papel imprescindível nesse processo por meio da ligação e degradação de um importante supressor tumoral, a pRb (retinoblastoma), e das proteínas de bolso p107 e p130. A pRb atuam na regulação da transição da fase G1 para a fase S, o que permite o controle a atividade dos fatores de transcrição E2F

(Chen; Tsai; Leone, 2009; Graham, 2017; Moody, 2017). E7 se liga a pRb deslocando E2F, essa ligação ocorre independentemente da presença de fatores de crescimento externos, e resulta na expressão de proteínas necessárias para a replicação do DNA. Além de pRb, E7 também é capaz de se associar a outras proteínas atuantes na proliferação celular, como alguns componentes do complexo de transcrição AP-1, inibidores de quinase dependentes de ciclina (p21 e p27) e histonas desacetilases. E7 empurra as células em diferenciação de volta à fase S através da interrupção da interação de Rb/E2F e ativação constitutiva de genes que respondem a E2F. Como resultado, temos a interrupção da quiescência suprabasal e reativação da síntese de DNA celular (Cheng *et al.*, 1995; Jones; Alani; Münger, 1997; Longworth; Laimins, 2004; Chen; Tsai; Leone, 2009).

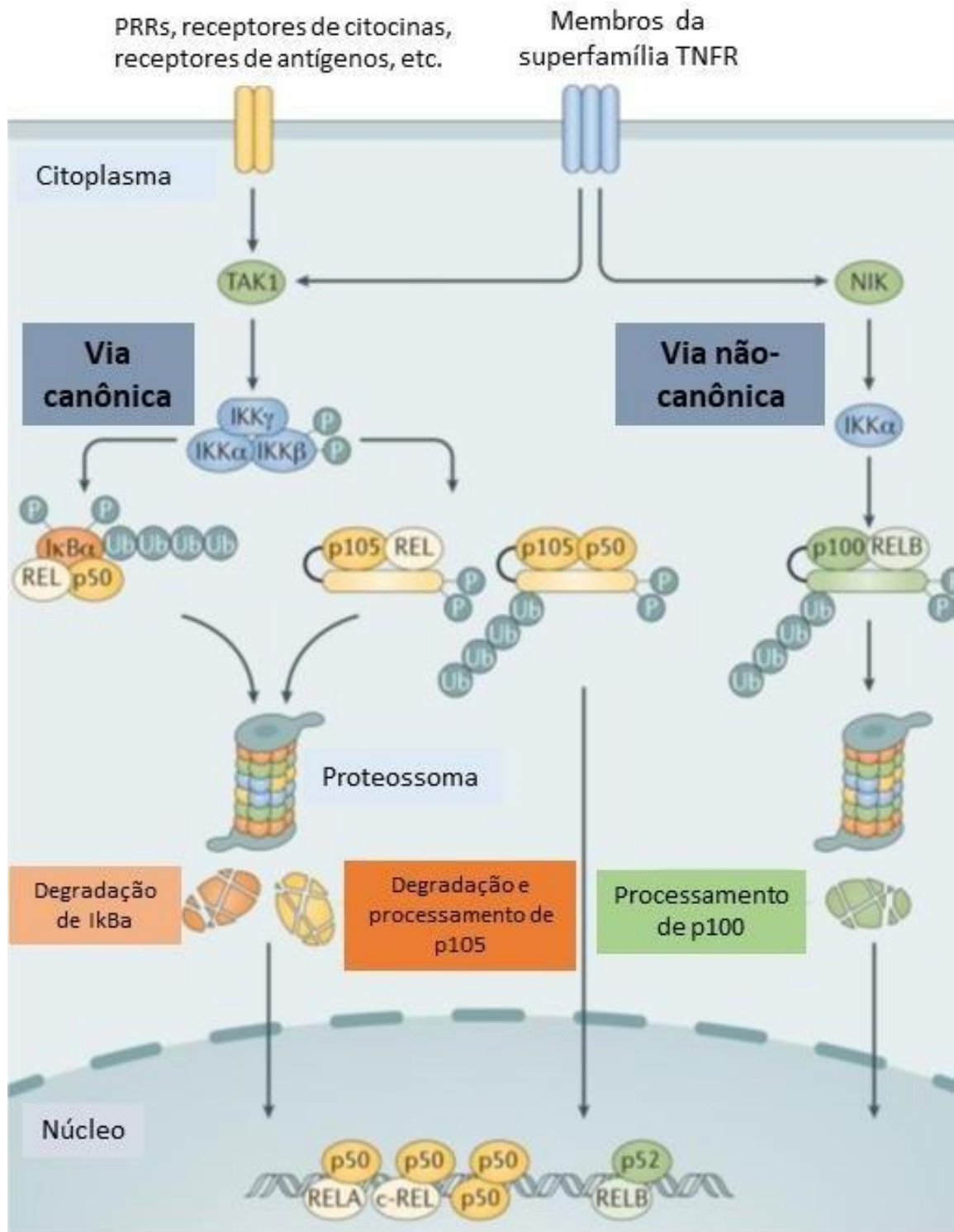
Estudos sobre polimorfismos nos oncogenes E6 e E7 são importantes, tanto para o auxílio no diagnóstico quanto na construção de métodos terapêuticos e de desenvolvimento de vacinas para o controle de infecções por HPVs de alto risco. Visto que E6 e E7 desempenham um papel fundamental no desenvolvimento da carcinogênese e manutenção da infecção, estudar essas variações nas sequências das proteínas E6 e E7 podem trazer esclarecimentos mais completos a respeito do processo de carcinogênese, isso porque essas mudanças podem alterar de alguma maneira a interação de E6 e E7 aos seus ligantes, que atuam sobre p53 e pRb por exemplo (Chagas *et al.*, 2011; Gurgel *et al.*, 2013).

2.5 VIA NF- κ B, HPV E CÂNCER CERVICAL

Descoberto em 1986, o fator de transcrição NF- κ B (fator nuclear-Kb) consiste em uma família de fatores que liga o elemento potencializador da cadeia leve de imunoglobulina kappa de células B ativadas (Shabab *et al.*, 2017). Esses fatores possuem papel essencial na imunidade inata, expressão de genes relacionados ao processo inflamatório, replicação viral, proliferação, adesão e apoptose que podem estar ligados à iniciação e progressão do câncer (Karin; Lin, 2002; Li *et al.*, 2015; Shabab *et al.*, 2017; Tilborghs *et al.*, 2017). Cinco membros da família NF- κ B foram identificados em mamíferos e podem formar uma variedade de homodímeros ou heterodímeros. Este sítio liga dímeros de cinco proteínas: NF- κ B1 (p105/p50), NF- κ B2 (p100/p52), Rel A (p65), Rel B e c-Rel que compartilham homologia N-terminal com o oncogene v-Rel (Zhang; Lenardo; Baltimore, 2017).

Apesar de ser essencial para o funcionamento imune adequado, a ativação excessiva de NF- κ B pode gerar quadros de inflamação crônica. O NF- κ B promove a expressão de mais de 150 genes, que participam da resposta à inflamação, seja ela viral, bacteriana ou em resposta a situações de estresse. Além da transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias como a classe das interleucinas (IL-1b, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-1) e TNF- α ; NF- κ B também regula moléculas de adesão (E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1), proteínas de fase aguda e enzimas (Oeckinghaus; Ghosh, 2009; Zhang; Lenardo; Baltimore, 2017).

NF- κ B é composta por duas vias distintas, uma canônica e uma não canônica, que são ativadas por meio de diferentes mecanismos (Figura 8). A via canônica é ativada com a finalidade de resposta a diferentes estímulos externos e que estão envolvidos no processo de regulação de inflamação, resposta imune, proliferação celular, diferenciação e apoptose. A ativação da via NF- κ B canônica acontece por meio da fosforilação de complexo IKKs (I κ B quinases). As I κ B quinases são uma família composta por três subunidades: dois componentes catalíticos chamados de IKK α e IKK β e um componente não catalítico regulatório, o NEMO/ IKK γ (Karin; Delhase, 2000; Moynagh, 2005; Gilmore, 2006; Baud; Jacque, 2008; Da Costa *et al.*, 2016; Zhang; Lenardo; Baltimore, 2017). A via canônica pode sofrer estímulos através de receptores Toll-like, citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1), fatores de crescimento, receptores de antígenos, estresse genotóxico ou estresse oxidativo e padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Após ativado, esse complexo liga-se e fosforila proteínas I κ B, levando a ubiquitinação e degradação proteossomal. Quando degradados, esses inibidores liberam dímeros de NF- κ B (p50/p65), fazendo com que se liguem ao DNA contendo o sítio κ B, e seguem para o núcleo, onde irão se acumular, atuando como fator transcricional de genes κ B responsivos (Hoffmann *et al.*, 2002; Werner; Barken; Hoffmann, 2005; Liu *et al.*, 2012a; Mitchell; Vargas; Hoffmann, 2016).

Figura 8 – Vias NF- κ B canônicas e não canônicas

Fonte: Adaptado de Sun (2017).

A via não-canônica é composta por sinais de ativação que são traduzidos de maneira independente do complexo NEMO, no entanto, é dependente de NIK e IKK α , que, quando ativado, fosforila a p100. Esses sinais de ativação, são sinais de desenvolvimento responsáveis pela ativação de receptores de TNF como, BAFFR, CD40, LT β R, RANK, TNFR2 e Fn14, onde alguns desses sinais também podem ativar a via canônica. A via não-canônica participa controlando uma ampla diversidade de fenótipos de desenvolvimento, que por meio da organogênese linfóide, maturação e manutenção da sobrevivência de células B, ativação de células dendríticas e metabolismo ósseo, garantem a montagem de uma resposta imune eficiente. Após a fosforilação e processamento de p100 para p52, o mesmo se torna ativo e liga-se a RelB, resultando em um dímero que irá até o núcleo, onde ocorrerá a ativação e expressão dos genes envolvidos na resposta imune (Claudio *et al.*, 2002; Wicovsky *et al.*, 2009; Mitchell; Vargas; Hoffmann, 2016).

A sinalização de NF- κ B atua no controle das repostas imune inata e adquirida, além disso, é reconhecida a sua grande importância em eventos celulares de adesão, proliferação, resposta celular ao estresse, diferenciação celular e apoptose (Tilborghs *et al.*, 2017).

A ativação da via NF- κ B, seja ela canônica ou não-canônica, já se mostrou presente em diversos tipos de câncer, essa ativação constitutiva está comumente associada a um mau prognóstico (Hoesel; Schmid, 2013). Algumas mutações nos genes de NF- κ B foram encontradas inicialmente em cânceres linfóides de células B, no entanto, apesar de serem raros, também podem ocorrer em tumores sólidos, como pulmão, mama, ovário e próstata (Xia; Shen; Verma, 2014). NF- κ B é ativado através de uma liberação permanente de citocinas no ambiente tumoral, de modo que, o efeito dessas moléculas sinalizadoras e citocinas presentes na sinalização de NF- κ B é altamente dependente do tipo de célula e microambiente. A partir desse processo, o sistema imunológico pode reagir de duas formas diferentes, causando o desenvolvimento do tumor, resultando em tumores maiores e mais agressivos, ou agindo de maneira protetiva, impedindo o desenvolvimento do tumor no indivíduo. A ativação da via NF- κ B, está relacionada com a expressão de genes como as Ciclinas D e E, que atuam na proliferação celular através da transição da fase G1 para S do ciclo celular e regulação negativa de proteínas também relacionadas ao controle do ciclo celular (GADD45) (Smyth; Dunn; Schreiber, 2006; Perkins; Gilmore, 2006; Chaturvedi *et al.*, 2011; Xia; Shen; Verma, 2014). Esse processo implica no aumento

da sobrevivência celular, inibindo a morte programada, através da ativação de genes antiapoptóticos que farão com que haja uma resistência ao estresse fisiológico durante a inflamação, atuando como cofator de iniciação de tumores (Kucharczak *et al.*, 2003; Tilborghs *et al.*, 2017).

Sabe-se que, após a perda de E2-HPV durante a integração do HPV no genoma do hospedeiro, ocorre a ativação constitutiva dos oncogenes virais E6 e E7. E2 atua inibindo a expressão do gene E6 endógeno e sensibiliza as células SiHa do câncer do colo do útero, ativando NF- κ B induzida por TNF-alfa, o que resulta no aumento da senescência e sobrevivência (Prabhavathy; Subramanian; Karunakaran, 2015). Estudos sugerem que as oncoproteínas dos HPVs de alto risco atuem na modulação da expressão de genes responsivos a NF- κ B. Segundo (James; Lee; Klingelutz, 2006), o E6 de HPV-16 ativa NF- κ B induzindo a expressão de cIAP2, um importante inibidor da apoptose. Ainda nesse estudo, os autores afirmam que esse efeito era dependente da presença do domínio de ligação PDZ da proteína E6, que faz a mediação e interage com outras proteínas contendo o domínio PDZ.

A ativação por meio da via não-canônica também já foi demonstrada, resultando em uma regulação positiva de cIAP2 e consequentemente anulação da apoptose induzida por TNF (James; Lee; Klingelutz, 2006; Hussain *et al.*, 2011; Nees *et al.*, 2001). No caso da proteína E7 do HPV-16, ocorre uma interferência com a via NF- κ B, de modo que E7 interage diretamente com as subunidades IKK α e IKK β (Prabhavathy; Subramanian; Karunakaran, 2015; Tilborghs *et al.*, 2017).

As oncoproteínas E6 e E7 se utilizam de diversos mecanismos para fugir da vigilância imunológica, causando uma persistência viral e desregulação do ciclo celular do hospedeiro, controlando dessa maneira a apoptose, transformação celular e gerando aumento dos danos ao DNA. A oncoproteína E6 de HPV-16 atua na degradação da proteína supressora tumoral p53, enquanto E7 de HPV-16 promove a degradação de pRb, por meio da via ubiquitina-proteassoma, causando uma progressão das células para a fase S do ciclo celular. Apesar de já ser entendido que NF- κ B pode ter sua expressão regulada por E6 e E7, ainda existe um conflito de dados a respeito se essa expressão é estimulada ou suprimida. Alguns fatores como, tipo de célula e taxa de crescimento, são importantes para que se possa determinar esses detalhes (Nees *et al.*, 2001; Garner-Hamrick *et al.*, 2004; James; Lee; Klingelutz, 2006; Ghittoni *et al.*, 2015; Da Costa *et al.*, 2016).

Estes estudos são muito significantes, visto que servem como um guia que apontam para um mecanismo geral que pode ser aplicado a diversos tipos de HPV, além de sugerir que NF- κ B é ativada também em eventos precoces logo após a infecção pelo HPV, não estando estrito apenas a lesões de alto grau. Já foi visto que as proteínas E6 e E7 de HPV-38 cutâneo ativam a via de sinalização canônica de NF- κ B, de forma que, regula positivamente a expressão de gene antiapoptóticos como CIAP1, CIAP2 e XIAP além de inibir TNF, conferindo resistência a agentes de danos ao DNA (Hussain *et al.*, 2011; James; Lee; Klingelutz, 2006; Da Costa *et al.*, 2016; Tilborghs *et al.*, 2017).

Os mecanismos pelos quais o NF- κ B age inibindo o crescimento celular e a imortalização de células cervicais ainda não foi totalmente esclarecido, no entanto esses achados sugerem que contornar a ativação de NF- κ B, pode ser uma estratégia para promover a replicação e persistência viral. Mais estudos são necessários para melhor compreensão dessa via tão complexa (Da Costa *et al.*, 2016).

Estudos têm demonstrado que, variações de nucleotídeos no oncogene E7 desempenham um papel significativo no processo de desenvolvimento do câncer do colo do útero, isso acontece devido principalmente à sua capacidade de controle da progressão do ciclo celular e apoptose, promovendo a proliferação celular. Grande maioria desses estudos investigaram as variantes do E7 HPV-16, considerado o mais prevalente, no entanto, pouco ainda se sabe a respeito das variantes de E7 do HPV-58, que também é um tipo de alto risco oncogênico, mas ainda é pouco estudado, principalmente no Brasil. Seus estudos se concentram principalmente na Ásia (Ho *et al.*, 2006; Chan *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2017b; Law *et al.*, 2019).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a avaliação funcional das variantes do oncogene E7 do HPV-58 circulantes no Brasil, em particular na região Nordeste e dessa forma auxiliar a compreensão de fatores que possam contribuir para o desenvolvimento do câncer cervical.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar variações de E7 do HPV-58 por meio de sequenciamento e análise das variantes.
- Realizar a análise filogenética de E7 do HPV-58.
- Avaliar o efeito das mutações na estabilidade proteica de E7 do HPV-58.
- Avaliar o impacto das mutações na função imunológica de E7 do HPV-58 por meio da predição de epítomos de células B e T.
- Avaliar os efeitos destes polimorfismos do gene E7 do HPV-58 por meio de ensaios de RT-qPCR.
- Avaliar a função biológica das variantes de E7 do HPV-58 circulantes na região Nordeste do Brasil por meio de ensaios de atividade da luciferase, na via NF- κ B.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS E BIOSSEGURANÇA

O presente projeto já foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), número CAAE: 03606212.7.0000.5208. Todas as pacientes participantes do estudo, provenientes do Hospital das Clínicas da UFPE, Hospital Oswaldo Cruz (Recife) e Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (Aracaju, SE) assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

4.2 GRUPOS DE ESTUDO E ISOLAMENTO DE DNA

Foram incluídas 319 mulheres com idades entre 18 e 77 anos, com idade média de 37,5 anos, atendidas na Unidade de Ginecologia do Hospital das Clínicas (n=81) e Hospital Universitário Oswaldo Cruz (n=156) em Recife, Pernambuco, Nordeste do Brasil, e no Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (n=82) em Aracaju, Sergipe, Nordeste do Brasil. Os pacientes provinham de demanda espontânea em exames de rotina. Obteve-se a aprovação do Comitê de Ética (CEP/CCS/UFPE N° 49/11), CAAE (03606212.7.0000.5208) e consentimento informado de todos os pacientes incluídos no estudo.

As amostras selecionadas para análise foram provenientes de raspado cervical, coletadas por meio de escova ginecológica (cytobrush) que chega até a endocérvice. A escova contendo o material ginecológico coletado foi transferida para um tubo estéril contendo solução de PBS (pH 7,4) para preservar as células até a extração do DNA. As células cervicais foram armazenadas a -80°C e o DNA foi extraído usando o DNeasy Blood Tissue Kit (Qiagen) de acordo com o manual do fabricante.

4.3 TRIAGEM DE HPV (DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DO HPV)

O DNA extraído foi amplificado por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) do gene MDM2 humano (primer direto: 5'-GATTTCGGACGGCTCTCGCGGC-3'; primer reverso: 5'-GATTTCGGACGGCTCTCGCGGC-3') para avaliar a qualidade do DNA, a fim de evitar resultados falsos negativos (Ma *et al.*, 2006). A reação de PCR

foi realizada em volume de 20µL, contendo 2µL (50 ng/µL) do DNA extraído, 10µL de GoTaq Green PCR Master Mix (Promega), 1,2µL de cada primer (12,2 pM/µL) e 5,6µL de Água livre de Nuclease (Promega). A condição da reação foi de 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 66,5°C por 40 segundos, 72°C por 45 segundos e, em seguida, 72°C por 10 minutos.

O DNA do HPV foi detectado por PCR com base na amplificação do fragmento do gene L1 viral usando primers de consenso e degenerados MY09 (5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3') e MY11 (5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3') (Manos *et al.*, 1989). A reação de PCR foi realizada em volume de 25µL, contendo 2µL (50ng/µL) do DNA extraído, 12,5µL de GoTaq Green PCR Master Mix (Promega), 1,5µL de cada primer (10pM/µL) e 7,5µL de Nuclease-Free Água (Promega). A condição da reação foi de 94°C por 1 minuto, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e depois 72°C por 10 minutos.

A genotipagem do DNA do HPV também foi realizada pela técnica de PCR utilizando primers específicos para o HPV-58 (primer direto: 5'-CCGTTTTGGGTACATTGTTCATGT-3' localizado nas posições 7781-7805; primer reverso: 5'-AAGCCTATTTTCATCCTCGTCTGAG-3' localizado nas posições 666-689). A reação de PCR foi realizada em volume de 25 µL, contendo 2 µL (50 ng/µL) do DNA extraído, 12,5 µL de GoTaq Green PCR Master Mix, (Promega), 1,5 µL de cada iniciador (10 pM/µL) e 7,5 µL de Água Livre de Nuclease (Promega). A condição da reação foi de 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 10 segundos, 59°C por 20 segundos, 72°C por 1 minuto e depois 72°C por 5 minutos.

Todas as amostras foram amplificadas na presença de controle negativo (água milli-Q). Os produtos de PCR obtidos foram examinados no gel de agarose 2% corado com brometo de etídio.

4.4 SEQUENCIAMENTO DO ONCOGENE 47 E ANÁLISE DE VARIANTES

Todas as amostras de HPV-58 foram testadas quanto à variabilidade genética E7 usando primers específicos (primer direto E7: 5'-ATTTGTCAAAGACAATTGTGTCCAC-3' localizado nas posições 488-509, primer reverso E7: 5'-TTAAATCTGTACCACTATCGTCTGC-3' localizado nas posições 1000-1024). As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 50 µL, contendo 4 µL do DNA extraído (50 ng/µL), 2 mM MgSO₄ (Invitrogen), 0,2 mM dNTP mix

(Promega), 10 pmols de cada primer e 1U Platinum Taq DNA polimerase de alta fidelidade (Invitrogen). A condição da reação foi de 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 10 segundos, 58°C por 20 segundos, 72°C por 1 minuto e, em seguida, 72°C por 5 minutos.

Os fragmentos positivos foram sequenciados (ambas as fitas) usando o kit ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing V.3.1 (Applied Biosystems) com os mesmos primers reverso e direto usados na reação de amplificação. As sequências obtidas foram verificadas quanto à qualidade e montadas usando o pacote Staden (Staden, 1996). As sequências E7 do HPV-58 foram comparadas com as sequências do GenBank usando BLAST (Altschul *et al.*, 1990). Posteriormente, as sequências foram alinhadas com a sequência protótipo do HPV-58 (GenBank: D90400.1) usando MEGA (versão 7.0) (Kumar; Stecher; Tamura, 2016).

4.5 ANÁLISE FILOGENÉTICA

Uma árvore filogenética de Máxima Verossimilhança foi reconstruída com base nas sequências do gene E7 usando MEGA11 (Tamura; Stecher; Kumar, 2021). Foi utilizado o modelo evolucionário que melhor se ajusta aos dados (K80+I), o qual foi selecionado com base no Bayesian Information Criteria (BIC) utilizando jModelTest 2 (Darriba *et al.*, 2012). SPR foi usado como método heurístico ML e filtro moderado de troca de ramificação. O suporte do ramo foi avaliado com 1000 réplicas bootstrap.

As sequências foram classificadas filogeneticamente em linhagens A, B, C e D, e sublinhagens A1, A2, A3, B1, B2, C1, D1 e D2. Os genomas de referência usados para esta classificação foram recuperados do PaVE: D90400 (A1), HQ537752 (A2), HQ537758 (A3), HQ537762 (B1), HQ537764 (B2), HQ537774 (C1), HQ537768 (D1) e HQ537770 (D2). Outras sequências do isolado HPV-58 com genoma completo foram obtidas no link NCBI Variant Search, disponível no PaVE (https://pave.niaid.nih.gov/explore/variants/variant_searches), e foram utilizadas na análise filogenética e exibidos na árvore com seu número de acesso GenBank.

4.6 ANÁLISE DE PRESSÕES SELETIVAS

Para avaliar a pressão seletiva que afeta o oncogene HPV-58 E7, foram analisadas estimativas de Máxima verossimilhança usando o CODEML, incorporado

no PAML versão 4.9c (Yang, 2007). A detecção da seleção positiva foi realizada através do cálculo de seis parâmetros dos modelos de substituição de códons, M0, M1, M2, M3, M7 e M8, que utiliza $\omega = dN/dS$. O modelo básico usa o $\omega = dN/dS$, que significa a razão de taxas de substituição não sinônimas/sinônimas; os modelos de ramificação permitem que a razão ω varie entre as ramificações na filogenia e são úteis para detectar a seleção positiva atuando em linhagens particulares (Yang, 1998; Yang; Nielsen, 1998); e os modelos de sítios permitem que a razão ω varie entre sítios (entre códons ou aminoácidos na proteína) (Yang; Nielsen, 1998; Yang, 2000). O Teste da Razão de Verossimilhança (LRT) foi utilizado para avaliar qual modelo melhor se ajusta aos dados.

4.7 MODELAGEM DE PREDIÇÃO DE ESTRUTURA DA PROTEÍNA

A estrutura 3D da proteína E7 de referência e mutada do HPV-58 foi modelada *in silico*. A sequência de aminoácidos da proteína de referência HPV-58 E7 (BAA31846) foi utilizada para a determinação de sua estrutura 3D prevista. Uma busca blast foi realizada no Banco de Dados de Proteínas (PDB) usando o algoritmo blastp para seleção de modelo. A busca do molde para a proteína E7 do HPV-58 mostrou que havia apenas o C-terminal da proteína (PDB id: 2F8B) no PDB. Portanto, o modelo de estrutura da proteína HPV58 E7 foi previsto usando um método combinado comparativo e *ab initio* no servidor Robetta (Kim; Chivian; Baker, 2004). Os modelos selecionados foram refinados por minimização de energia usando o servidor 3Drefine (Bhattacharya *et al.*, 2016). Os modelos previstos foram avaliados por PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993), MolProbity (Chen *et al.*, 2010), QMEAN (Benkert; Biasini; Schwede, 2011) e TM-align (Zhang, 2005). De acordo com esses parâmetros, o melhor modelo foi escolhido para avaliar a variabilidade estrutural.

As mutações não sinônimas identificadas foram inseridas na estrutura de referência do HPV-58 E7 usando o serviço Point Mutation no servidor RosettaBackrub (Lauck *et al.*, 2010). Os modelos mutados com a menor pontuação ponderada foram selecionados. O método Site Directed Mutator (SDM) (Worth; Preissner; Blundell, 2011) foi usado para prever o efeito de mutações na estabilidade da estrutura da proteína HPV58 E7.

4.8 PREDIÇÃO DE EPÍTOPOS DE CÉLULAS T E CÉLULAS B

A predição de epítomos de células T e B nas sequências E7 HPV-58 foi realizada usando servidor ProPred-1 (MHC classe I) (Singh; Raghava, 2003) e servidor ProPred (MHC classe II) (Singh; Raghava, 2001) e servidor ABCpred (Saha; Raghava, 2006), respectivamente.

4.9 CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEOS E CLONAGEM

Após a análise da variabilidade nas sequências do oncogene E7 (297 pb), três isolados (HPV58/UFPE-54PE, HPV58/UFPE-58S e HPV58/UFPE-60M) foram escolhidos por serem mais relevantes epidemiologicamente e apresentarem mais alterações, pertencentes às variantes A, C e D, respectivamente, como pode ser observado no Quadro 1. Esses isolados/variantes e o protótipo (sequência do gene de referência sem alterações) do E7 HPV58 foram amplificados por PCR e clonados no vetor para produtos de PCR (pGEM-T easy-Promega) seguindo as instruções do fabricante. Posteriormente, eles foram subclonados em um vetor de expressão de célula de mamífero pCDNA 3.1 (+). Os clones foram submetidos a sequenciamento automatizado usando o kit de sequenciamento de ciclo ABI PRISM BigDye™ Terminator v3.1 Ready Reaction (Applied Biosystems®) usando o sequenciador de DNA automatizado ABI Prism 3100 (Applied Biosystem®).

Quadro 1 – Variabilidade genética de E7 dos isolados de HPV-58 detectados em Pernambuco

Isolados	Posição das substituições nucleotídicas em E7										Linhagem variante	Lesão
	694	744	756	761	763	793	798	801	840	852		
Referência	G	T	T	G	A	A	C	C	C	T		
58SE	*	G	*	*	*	G	T	A	T	C	C	LSIL
54PE	A	G	C	A	*	*	*	*	*	*	A	HSIL
60M	*	G	*	A	G	G	T	A	T	*	D	LSIL
Posição de códon alterado	41	57	61	63	64	74	75	76	89	93		
Referência	G	T	T	G	T	T	T	D	T	P		
Aminoácido alterado	R	T	T	D	A	A	T	E	T	P		

Fonte: Dados da pesquisa (2023).

Os nucleotídeos conservados em relação à sequência de referência (D90400.1) estão marcados com asterisco (*). Referência: sequência protótipo do HPV-58.

4.10 ISOLAMENTO DE DNA DE VETORES RECOMBINANTES E TRANSFEÇÃO DO C33A

Após confirmação dos resultados por sequenciamento, o DNA dos vetores recombinantes contendo as sequências variantes do gene HPV-58 E7 e o protótipo foram isolados por maxipreparação com o kit Plasmid Plus Maxi (Qiagen) conforme instruções. Para avaliar a atividade do oncogene E7 usando a via NF- κ B como modelo de funcionalidade por luminescência, foi feita uma co-transfecção em queratinócitos resultantes de carcinoma cervical (C33A). As transfecções foram realizadas em placas de cultura celular de 6 poços, onde 5×10^5 células foram semeadas em 3 ml de Meio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM-Invitrogen®) mais 10% de soro bovino fetal (Gibco®); 1% L-Glutamina (Sigma®) - DMEM completo. As células foram transfectadas com as construções do vetor recombinante usando o reagente de transfecção Polyfect (Qiagen). Os grupos de células foram transfectados utilizando o plasmídeo pcDNA3.1 (+) contendo 1,5 μ g da variante E7, ou o protótipo (gene de referência sem nenhuma das variações estudadas), ou ainda com o vetor pcDNA3.1 (+) vazio (controle negativo). Além disso, todos os grupos de células foram cotransfectados com um repórter de luciferase dependente de NF- κ B, que é construído com três sítios de ligação do fator κ B sendo nomeados (κ B) 3-Luc (1 μ g) (BCCMTM/LMBP, Gent, Bélgica) e um plasmídeo expressando Renilla luciferase (1 ng) como um normalizador de luminescência. Após 24 horas de transfecção, TNF α (10 ng/ml) foi adicionado às placas por 6 horas para estimular a via. A estimulação foi interrompida com a substituição do meio por PBS frio, seguido de lise celular com Tampão de Lise Passiva (Promega, Madison, WI, EUA) e armazenado a -80°C . Todos os experimentos foram realizados em três repetições experimentais em triplicatas.

4.11 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO CONDUZIDA POR E7 DE HPV-58

O ensaio de luminescência foi realizado com o material do extrato celular utilizando o kit Nanoluc (Promega). As leituras foram realizadas no GloMax® 96 Microplate Luminometer c/Dual Injectors (Promega). Para garantir a eficiência da transfecção, os resultados foram normalizados por Renilla juntamente com a quantificação das proteínas.

4.12 qPCR EM TEMPO REAL

O RNA total foi obtido pelo mini kit RNeasy (Qiagen) e o cDNA foi sintetizado pelo kit Improm® Reverse Transcription (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. As reações de qPCR foram realizadas pelo kit QuantiTect SYBR Green® PCR (Qiagen) e as concentrações de primers e cDNA foram as mesmas descritas por (Leitão *et al.*, 2014). O protocolo do ciclo foi de 95°C por 15min, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 10s e hibridização de genes de referência a 55°C por 30s, enquanto o gene E7 hibridizou a 60°C. O protocolo da curva de fusão variou gradualmente de 65 a 95°C. A normalização da expressão gênica adotou os genes de referência GAPDH e ACT. Cada reação foi realizada em três réplicas biológicas, incluindo um controle negativo para cada gene. A expressão do gene foi calculada de acordo com Livak e Schmittgen (2001).

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) unilateral seguida de pós-teste de correção de Bonferroni usando o software GraphPad Prism. $p < 0,05$ foi considerado significativo.

5 RESULTADOS

5.1 DETECÇÃO E TIPAGEM DE HPV

Das 319 amostras coletadas, 227 (71,2%) eram HPV positivas. A partir daí a genotipagem revelou que 55 (24,2%) amostras foram positivas para HPV-16, 36 (15,9%) foram positivas para HPV-31 e 18 (7,9%) foram positivas para HPV-58. Considerando as 227 amostras positivas para HPV, 59 amostras apresentam coinfeção com mais de um tipo de HPV: os resultados indicaram que o HPV-16 + HPV-31 foi o mais frequente (48, 20,8%), seguido do HPV16 + HPV58 (6, 2,6%) e HPV- 16 + HPV-31 + HPV-58 (5, 2,2%).

As amostras de HPV58 foram identificadas como HPV-58/UFPE-58S, -30S, -31S, -54PE, -88S, -60M, -59M, -1M, -29M, -35P, -45M, -79M, -92M, -28M, -28S e -48S. Para essas amostras, o diagnóstico patológico foi obtido conforme especificado no Quadro 2. Somente amostras com uma única infecção por HPV58 foram selecionadas para análise. Um total de duas amostras positivas para HPV58 foram excluídas devido à ausência de diagnóstico patológico.

Quadro 2 – Grau de lesões de amostras positivas para HPV-58

Amostras	Grau da lesão
HPV58/UFPE-58S	LSIL
HPV58/UFPE-30S	HSIL
HPV58/UFPE-31S	HSIL
HPV58/UFPE-54PE	HSIL
HPV58/UFPE-88S	LSIL
HPV58/UFPE-60M	LSIL
HPV58/UFPE-59M	HSIL
HPV58/UFPE-1M	HSIL
HPV58/UFPE-29M	Sem lesão
HPV58/UFPE-35P	Sem lesão
HPV58/UFPE-45M	HSIL
HPV58/UFPE-79M	HSIL
HPV58/UFPE-92M	HSIL
HPV58/UFPE-28M	LSIL
HPV58/UFPE-28S	HSIL
HPV58/UFPE-48S	HSIL

Fonte: Dados da pesquisa (2023).

LSIL: lesão intraepitelial escamosa de baixo grau. HSIL: lesão intraepitelial escamosa de alto grau.

5.2 VARIAÇÕES NA SEQUÊNCIA DE E7 HPV-58

As sequências de nucleotídeos do oncogene E7 completo foram comparadas com a sequência de referência do HPV-58 (D90400.1). A análise comparativa do oncogene E7 revelou que dezesseis sequências (100%) apresentavam 10 sítios variáveis. Cinco mutações foram missense nos códons 41 (G41R), 63 (G63D), 64 (T64A), 74 (T74A) e 76 (D76E) (Quadro 3). As cinco mutações restantes foram silenciosas (Quadro 3). Os sítios que apresentaram as mutações mais frequentes foram 744 (100%, 16 de 16), 761 (93,8%, 15 de 16) e 694 (81,3%, 13 de 16). Outras mutações (mutações silenciosas) foram T756C (6,3%, 1 de 16), A763G (12,5%, 2 de 16), A793G (18,8%, 3 de 16), C798T (18,8%, 3 de 16), C801A (18,8 %, 3 de 16), C840T (18,8%, 3 de 16) e T852C (6,3%, 1 de 16). Substituições de nucleotídeos resultando em códons de parada prematuros ou mudanças de quadro (frameshift) não foram detectadas.

Quadro 3 – Variabilidade de nucleotídeos e aminoácidos da região E7 do HPV-58 e a suposta função biológica afetada

E7										
Nt	694	744	756	761	763	793	798	801	840	852
Referência	G	T	T	G	A	A	C	C	C	T
HPV58/UFPE-58S	.	G	.	.	.	G	T	A	T	C
HPV58/UFPE-30S	A	G	.	A	.	.	.	.	.	.
HPV58/UFPE-31S	A	G	.	A	.	.	.	.	.	.
HPV58/UFPE-54PE	A	G	C	A	.	.	.	.	.	.
HPV58/UFPE-88S	A	G	.	A	.	.	.	.	.	.
HPV58/UFPE-60M	.	G	.	A	G	G	T	A	T	.
HPV58/UFPE-59M	A	G	.	A	.	.	.	.	.	.
HPV58/UFPE-1M	A	G	.	A	.	.	.	.	.	.
HPV58/UFPE-29M	A	G	.	A	.	.	.	.	.	.
HPV58/UFPE-35P	A	G	.	A	.	.	.	.	.	.
HPV58/UFPE-45M	A	G	.	A	.	.	.	.	.	.
HPV58/UFPE-79M	A	G	.	A	.	.	.	.	.	.
HPV58/UFPE-92M	A	G	.	A	.	.	.	.	.	.
HPV58/UFPE-28M	A	G	.	A	.	.	.	.	.	.
HPV58/UFPE-28S	.	G	.	A	G	G	T	A	T	.
HPV58/UFPE-48S	A	G	.	A	.	.	.	.	.	.
Aminoácido de referência	G			G	T	T		D		
Posição do aminoácido	41			63	64	74		76		
Aminoácido alterado	R			D	A	A		E		

Fonte: Dados da pesquisa (2023).

Os nucleotídeos conservadores em relação à sequência de referência (D90400.1) são marcados com um ponto (.). Referência: sequência protótipo do HPV-58. Nt: nucleotídeo. T: treonina, D: ácido aspártico, E: glutamato, R: arginina, G: glicina, A: alanina.

Fonte: Dados da pesquisa (2023).

5.4 ANÁLISE DE PRESSÃO SELETIVA

A região genômica que inclui o gene E7 do HPV-58 apresentou razões ω menores que 1, o que indica seleção purificadora, atuando na conservação da função da proteína. O modelo que melhor se ajusta aos dados é aquele que apresenta maiores valores de log-verossimilhança (lnL). Para esta região genômica, o melhor modelo é o M3, com $\omega = 0,87940$ (Tabela 1).

Tabela 1 – Resultados do teste LRT para detecção de locais sob seleção positiva (diversificadora)

Modelo 1	Modelo 2	LRT	Sites selecionados positivamente
M0	M3	48.63069	-
M1	M2	31.954069	41G (0.979*) 63G (1.000**) 64T (0.826) 74T (0.976*) 76D (0.997**)
M1	M3	31.954662	41G (0.997**) 63G (1.000**) 64T (0.893) 74T (0.997**) 76D (1.000**)
M7	M8	32.308663	41G (0.987*) 63G (1.000**) 64T (0.857) 74T (0.985*) 76D (0.999**)

Fonte: Dados da pesquisa (2023).

Os valores entre parênteses indicam a probabilidade posterior do local ser selecionado positivamente. * indica $P > 95\%$ e ** indica $P > 99\%$.

Embora a região genômica E7 do HPV-58 tenha apresentado seleção negativa ou purificadora, o teste LRT indicou a presença de sítios proteicos selecionados positivamente (diversificando), o que representa mutações com alta probabilidade de serem fixadas na população viral (Quadro 3). No total, cinco locais selecionados positivamente foram identificados (41G, 63G, 64T, 74T e 76D). Destes, quatro sítios (41G, 63G, 74T e 76D) foram identificados como positivamente selecionados com significância estatística ($P > 95\%$ e $P > 99\%$) (Tabela 2).

Tabela 2 – Impacto previsto de mutações na estabilidade estrutural da proteína HPV58 E7, conforme determinado pelo Site Directed Mutator

Proteína	Mutação	Previsão $\Delta\Delta G$	Resultado
E7	G41R	-0.14	Estabilidade reduzida
	G63D	-2.48	Estabilidade reduzida
	T64A	-0.12	Estabilidade reduzida
	T74A	1.26	Maior estabilidade
	D76E	1.25	Maior estabilidade

Fonte: Dados da pesquisa (2023).

Valores positivos de $\Delta\Delta G$ estão associados ao aumento da estabilidade da proteína. Valores negativos de $\Delta\Delta G$ estão associados com diminuição da estabilidade da proteína.

5.5 ANÁLISE ESTRUTURAL DE MUTAÇÕES E7

Foi possível modelar a proteína E7 do HPV-58. A proteína E7 foi modelada com base em um método híbrido, a C-terminal com um método comparativo e a A-terminal com um método ab initio. O melhor modelo de proteína E7 do HPV58 apresentou 92,9% de resíduos nas regiões mais favorecidas no gráfico de Ramachandran, MolProbity Score de 0,79, QMEAN score de -1,16 e TM-align score de 0,61714, o que representa um modelo de estrutura bem resolvido. Todos esses parâmetros de qualidade confirmam a confiabilidade dos modelos de estrutura de proteínas.

A estrutura do HPV-58 E7 possui um total de 98 resíduos de aminoácidos, com um domínio de ligação ao zinco, composto por dois motivos CXXC separados por 29 resíduos de aminoácidos. A estrutura da proteína apresenta quatro domínios de hélice alfa e dois domínios de folha beta, conectados com regiões de loop (Figura 10). O motivo 22LXCXE26 consiste em parte de uma hélice alfa e uma região de loop. Nenhuma mutação não sinônima encontrada neste estudo afeta diretamente esses motivos. No entanto, duas mutações não sinônimas (G63D e T64A) estão localizadas na região do loop logo após um motivo CXXC (Figura 2). A mutação G41R está localizada na segunda região da alfa-hélice, e as mutações T74A e D76E estão localizadas na terceira alfa-hélice (Figura 2). Avaliando o impacto dessas mutações na estabilidade proteica para a proteína HPV-58 E7, observamos que as mutações G41R, G63D e T64A apresentaram valores preditos negativos de $\Delta\Delta G$, levando à instabilidade e mau funcionamento da proteína (Tabela 2).

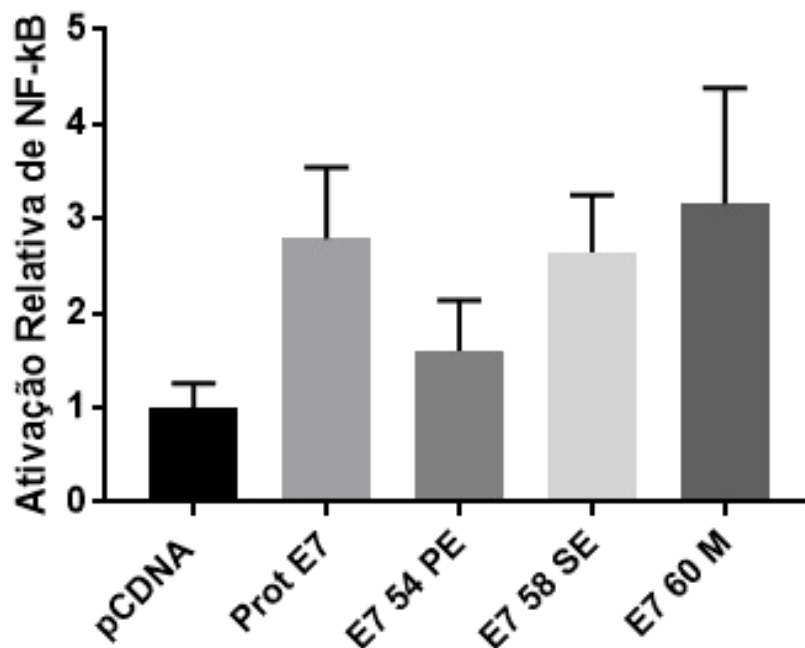
5.7 EFEITO DAS VARIANTES POLIMÓRFICAS E7 NA VIA NF-KB

O estudo funcional das variantes do oncogene HPV-58 E7 foi desenvolvido utilizando ensaios de luminescência tendo como modelo a via NF-kB. As variantes estudadas foram transfectadas e seus efeitos na via do NF-kB foram comparados com aqueles encontrados em células que expressam o HPV-58 referência E7 (protótipo). As variantes estudadas HPV58/UFPE-54PE, HPV58/UFPE-58S e HPV58/UFPE-60M pertencem às sublinhagens A2, C1 e D2, respectivamente.

Todas as variantes apresentaram alterações de nucleotídeos do protótipo, algumas resultando em alterações de códons e aminoácidos. A cepa HPV58/UFPE-54PE apresentou alterações nas posições: 694 (G694A), 744 (T744G), 756 (T756C) e 761 (G761A); HPV58/UFPE-58S nas posições: 744 (T744G), 793 (A793G), 798 (C798T), 801 (C801A), 840 (C840T) e 852 (T852C); e a variante HPV58/UFPE-60M nas posições: 744 (T744G), 761 (G761A), 763 (A763G), 793 (A793G), 798 (C798T), 801 (C801A) e 840 (C840T) (Quadro 3). As amostras contendo a variante HPV58/UFPE-54PE apresentou lesão classificada como HSIL e as outras amostras contendo as demais variantes como LSIL.

A Figura 12 mostra a atividade relativa da via NF-kB mediada pelo oncogene E7 HPV58. Optou-se por avaliar o efeito da via NF-kB, por ser um componente crítico da resposta celular antiviral e da inflamação. Pode-se observar que na primeira coluna o vetor pcDNA vazio funciona como um controle negativo da reação. De acordo com a mesma figura, a presença do protótipo estimulou a atividade da via quando comparada ao vetor vazio. As variantes E7 devem ser comparadas ao protótipo (segunda coluna), observa-se que os isolados HPV58/UFPE-58S e HPV58/UFPE-60M se comportaram de forma semelhante ao protótipo, porém a variante HPV58/UFPE-54PE diminuiu a atividade do NF via -kB. A diferença entre as médias dos grupos analisados foi significativa com valor de p : 0,0046. As comparações entre o pcDNA e o protótipo, assim como entre o pcDNA e a variante HPV58/UFPE-54PE, foram significativas com valor de p : 0,001 para todas as comparações.

Figura 12 – Efeito de E7 (HPV-58) e suas variantes na atividade de NF- κ B

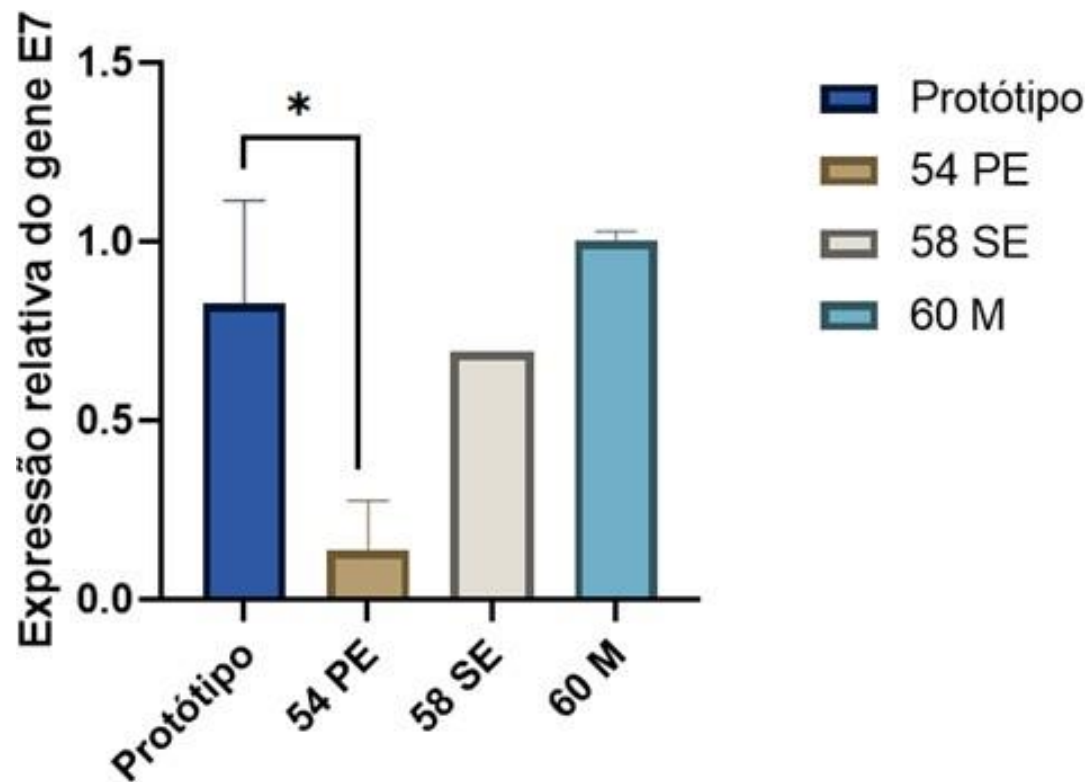


Fonte: Dados da pesquisa (2023).

5.8 VARIANTE 54PE DE E7 DE HPV-58 APRESENTOU A MENOR EXPRESSÃO DE mRNA E7

As células C33A foram transfectadas com quatro variantes de E7 (Referência, 54PE, 58SE e 60M). Na avaliação da expressão do mRNA E7, a expressão do gene contendo 54PE era 1,5 ~ 2,0 vezes menor do que a expressão de referência E7 do HPV-58 (Figura 13). As demais variantes de E7 (58SE e 60M), não apresentaram variação significativa de expressão, em relação à referência.

Figura 13 – Expressão de E7 de HPV-58 e suas variantes



Fonte: Dados da pesquisa (2023).

6 DISCUSSÃO

Neste estudo, foram investigadas as variantes do oncogene E7 HPV-58 em amostras cervicais em pacientes do Nordeste do Brasil, com o objetivo de avaliar os efeitos funcionais.

A maioria dos estudos de variantes intratipo de HPVs tem se concentrado principalmente no HPV-16 e HPV-18. No entanto, outros tipos relevantes, de alto risco e com prevalências significantes em diferentes países e continentes foram pouco ou ainda não foram estudados, como é o caso do HPV-58 e suas variantes. Seus principais estudos estão concentrados na Ásia, onde possuem maior prevalência (Chan *et al.*, 2002; Luk, 2009; Chan *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012b; Li *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014).

O E7 é considerado um dos principais oncogenes e as variações de nucleotídeos neste oncogene desempenham uma função crucial no câncer cervical devido à sua capacidade de induzir transformação e imortalização celular (Roman; Munger, 2013). Neste estudo, as alterações de nucleotídeos descritas anteriormente no oncogene E7 do HPV-58 foram detectadas nas posições G694A (Xi *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2019), T744G (Tenjimbayashi *et al.*, 2017; Xi *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2019), T756C (Yu *et al.*, 2019), G761A (Xi *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2019), A763G (Chan *et al.*, 2013) e A793G, C798T, C801A, C840T e T852C (Tenjimbayashi *et al.*, 2017).

Estudos funcionais envolvendo oncogenes e promotores de HPV estão crescendo, por isso, análises envolvendo as variantes e a via NF- κ B foram realizadas. Alguns estudos mostraram que as variantes do oncogene E7 suprimiram a atividade da via NF- κ B (Spitkovsky *et al.*, 2002; Vandermark *et al.*, 2012). A proteína E7 do HPV-16 interfere na sinalização do NF- κ B, interagindo diretamente com as subunidades IKK α e IKK β , causando uma redução na atividade relacionada à sinalização do NF- κ B nas células U2OS (Spitkovsky *et al.*, 2002). Mesmo sob estimulação de citocina TNF- α , as células U2OS transfectadas com o gene HPV-16 E7 foram menos responsivas, exibindo sinalização atenuada de NF- κ B (Byg *et al.*, 2012).

O HPV-58 é composto em quatro linhagens variantes (A, B, C e D) e oito sublinhagens (A1, A2, A3, B1, B2, C, D1 e D2) (Burk; Harari; Chen, 2013). No presente estudo, identificamos as variantes do HPV-58 compostos pelas sublinhagens A2, C1 e D2. Chan *et al.* (2002) realizaram um estudo em que sugere a associação entre linhagem variante e risco oncogênico. A linhagem A representou a maioria das

amostras de HSIL/carcinoma (Chan *et al.*, 2002). No presente estudo, a maior parte da linhagem A2 é representada por amostras HSIL. No entanto, mais estudos são necessários para avaliar a associação de linhagens variantes e risco de câncer cervical. Para confirmar a classificação da linhagem neste estudo, uma comparação completa da sequência do genoma e análise filogenética foram realizadas com as sequências completas do genoma do HPV-58 de referência. Uma vez confirmada a classificação da linhagem para as sequências do genoma de referência, a análise filogenética realizada com as sequências do gene E7 (Figura 9) mostrou uma topologia semelhante, o que indica a provável linhagem dos isolados.

Os dados de identificação de variantes de E7 HPV-58 corroboram com um estudo realizado por Chan *et al.* (2011), no qual o padrão de identificação de variantes ao redor do mundo demonstra que a linhagem A2 foi mais prevalente na América e Europa 76% e 78%, e demonstra uma proporção maior de variantes não A em relação a Ásia. Outro estudo que pode ser citado é o de Basto *et al.* (2017) que identificou o HPV-58 em 14 amostras de pacientes do Rio de Janeiro e Belém do Pará. Dessas 14 amostras, 10 eram da sublinhagem A2, e as demais foram da sublinhagem A3 e C. É sabido que o HPV-58 é o terceiro papilomavírus mais frequente que infecta mulheres com câncer cervical na Ásia Oriental e o quarto tipo mais frequente em algumas regiões do Brasil (Chagas *et al.*, 2011). A frequência do HPV-58 varia em todo o mundo e é mais frequente no leste da Ásia, onde a linhagem A é a mais frequente, seguida pela linhagem C. Neste estudo, foi demonstrada a presença das sublinhagens A2, C1 e D2.

A análise indicou que a região genômica variante E7 do HPV-58 apresentou seleção negativa ou purificadora. No entanto, resíduos de aminoácidos selecionados de diversificação evolutiva foram identificados neste estudo. A seleção diversificada está associada a mutações com alta probabilidade de serem fixadas na população viral, estando relacionada à resposta adaptativa do hospedeiro (Dearlove *et al.*, 2020).

Neste estudo, foram identificadas quatro mutações não sinônimas sob seleção diversificada na proteína E7 (41G, 63G, 74T e 76D). Essas mutações são consistentemente encontradas em outros estudos em todo o mundo, o que destaca sua relevância evolutiva para o vírus (Chen *et al.*, 2017a; Xi *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2022). Embora mais evidências experimentais devam ser encontradas, esses achados são relevantes, porque essas mutações podem estar relacionadas à

adaptação ao hospedeiro humano, aumentando a capacidade dessas oncoproteínas de interagir com as proteínas do hospedeiro.

Na análise estrutural para E7, sabe-se que o motivo LXCXE está relacionado com a interação de E7 com pRB. No entanto, as mutações não sinônimas detectadas neste estudo não alteraram o motivo LXCXE. Duas mutações (G63D e T64A) estão localizadas no loop logo após o motivo CXXC, um importante motivo de ligação ao zinco. Foi relatado que G63D tem uma associação de risco significativamente menor com neoplasia cervical (Chan *et al.*, 2013). Outras mutações detectadas neste estudo (G41R, T74A e D76E) estão localizadas na segunda e terceira alfa-hélices, respectivamente. Em um estudo anterior, foi relatado que G63D e G41R apresentam uma associação de risco significativamente menor com neoplasia cervical (Chan *et al.*, 2013).

Previu-se que as mutações G41R, G63D e T64A em E7 apresentadas levassem à instabilidade e mau funcionamento da proteína. Até onde sabemos, esta é a primeira vez que essas mutações foram caracterizadas estruturalmente. No entanto, o impacto dessas mutações na interação dessas oncoproteínas do HPV e moléculas do hospedeiro ainda precisa ser avaliado em estudos experimentais posteriores.

Em relação à imunidade inata, um possível parâmetro envolvido com variantes E7 do HPV-58 e oncogenicidade é a resposta imune celular. Em nosso estudo, observou-se que as substituições não sinônimas estavam em sítios pertencentes a epítopos de células T (MHC classe I e classe II) e/ou células B. Essas alterações de aminoácidos na oncoproteína E7 HPV-58 podem influenciar o reconhecimento imunológico de células infectadas pelo HPV (Chagas *et al.*, 2011). Embora o HPV-58 faça parte do terceiro grupo no ranking da associação de câncer (Muñoz *et al.*, 2004), os estudos sobre as variações do HPV-58 E7 e a resposta imune são limitados. Além disso, o conhecimento dos epítopos é importante para o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra o HPV (Kumar *et al.*, 2015).

Apesar de estudos funcionais envolvendo oncogenes e promotores de HPV estarem crescendo, a maioria desses estudos está focado no HPV-16 e HPV-18, enquanto o HPV-58 ainda é pouco estudado. Assim, nesse estudo foram realizadas análises envolvendo as variantes e a sua ação na via NF- κ B. Variantes do oncogene E7 podem suprimir a atividade da via NF- κ B (Spitkovsky *et al.*, 2002; Vandermark *et al.*, 2012). A proteína E7 do HPV16 interfere na sinalização de NF- κ B, interagindo

diretamente com as subunidades IKK α e IKK β , causando redução na atividade relacionada à sinalização de NF- κ B em células U2OS (Spitkovsky *et al.*, 2002).

Neste trabalho, observou-se que a variante HPV58/UFPE-54PE diminuiu a atividade da via, enquanto as demais variantes se comportaram de forma semelhante a Referência. Vale ressaltar que as variantes que tiveram atividade semelhante ao protótipo foram as que apresentaram mais alterações de nucleotídeos e alterações de aminoácidos. Esses dados corroboram com os resultados existentes na literatura (Spitkovsky *et al.*, 2002).

As variantes HPV58/UFPE-58SE e HPV58/UFPE-60M apresentaram atividade de ativação da via NF- κ B semelhante ao protótipo. Segundo Xia, Shen e Verma (2014), quando se tem uma maior atividade da via NF- κ B, ocorre um acúmulo de citocinas pró- inflamatórias que contribuem diretamente e que são facilitadoras de um ambiente protumorgênico, o que favorece a iniciação e progressão do tumor. Segundo Hoesel e Schmid (2013), a atividade de NF- κ B em níveis moderadamente elevados são frequentemente observados em condições inflamatórias crônicas. A ativação constitutiva do NF- κ B exerce efeito pró-tumorgênico, isso é observado em pacientes com doenças inflamatórias crônicas, apresentando maior risco de desenvolver câncer, fato semelhante que ocorre em pacientes imunossuprimidos. Os autores ainda afirmam que, independentemente da maneira que o NF- κ B é ativado, seja através da via clássica ou alternativa, e em diferentes níveis, o NF- κ B está ativada em muitos tipos de câncer, e na maioria dos casos está associado a um mau prognóstico.

Outros autores já demonstraram que a ativação do NF- κ B é capaz de aumentar a sobrevivência celular, inibindo a morte celular programada através do estímulo de transcrição de genes antiapoptóticos. Esses genes fornecem mecanismos que são capazes de suportar o estresse fisiológico durante a inflamação, desempenhando um papel importante como cofator na iniciação de tumores. Outro fato importante é que, o NF- κ B é capaz de estimular a transcrição de genes reguladores da proliferação como a ciclina D1, por exemplo; genes envolvidos na metástase; angiogênese e imortalidade celular por telomerase (Perkins; Gilmore, 2006; Hussain *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013; Hoesel; Schmid, 2013; Xia; Shen; Verma, 2014; Tilborghs *et al.*, 2017; Zhang; Lenardo; Baltimore, 2017).

Neste estudo, observamos que a variante HPV58/UFPE-54PE apresentou uma menor ativação da via NF- κ B em relação as demais variantes e a referência E7.

Através dessa inibição da ativação de NF- κ B, podemos sugerir que, a variante HPV58/UFPE- 54PE é menos agressiva.

A variante HPV58/UFPE-54PE apresentou a menor expressão gênica em relação as demais variantes analisadas, representando o mesmo padrão em relação a análise de ativação da via NF- κ B. Esses dados trazem o questionamento a respeito da relação entre a expressão gênica HPV58/UFPE-54PE de E7 e a ativação da via NF- κ B. Apesar de apresentarem diferentes valores de expressão e de atividade da via, todas as variantes do estudo estão sob a regulação do mesmo promotor, estas diferenças sugerem que, de alguma maneira, os níveis disponibilidade de RNAm de E7 está sendo regulado. Mais estudos são necessários para avaliar e investigar a função biológica de polimorfismos em relação a estabilidade/meia vida do RNAm de E7 de HPV-58. É possível que haja alguma relação entre a expressão do mRNA E7 com a ativação de NF- κ B, ou que uma menor ativação de NF- κ B possa influenciar na expressão de mRNA de E7 de HPV-58.

Estudos nas variações de nucleotídeos presentes no oncogene E7 do HPV são importantíssimos, visto que, E7 desempenha um papel primordial no desenvolvimento do câncer do colo do útero, devido à sua capacidade de inativar produtos de importantes genes supressores de tumor, como o pRb, controle e transformação maligna de células infectadas por vírus (Moody; Laimins, 2010; Roman; Munger, 2013; Zhang; Chen; Roman, 2006). A ativação da via NF- κ B é um evento frequente no carcinoma de células escamosas, além de importante evidência de modificação de células epiteliais (Tilborghs *et al.*, 2017). Desta maneira, investigar a atuação das variantes de E7 de HPV-58 é fundamental para o entendimento do processo de carcinogênese viral, e embora o HPV-58 ainda seja pouco estudado, ele faz parte do grupo de HPVs de alto risco e é um tipo muito prevalente em alguns países do mundo, incluindo algumas regiões do Brasil, a exemplo da região Nordeste.

7 CONCLUSÕES

As variantes estudadas HPV58/UFPE-54PE, HPV58/UFPE-58S e HPV58/UFPE-60M pertencem às sublinhagens A2, C1 e D2, respectivamente.

A variante HPV58/UFPE-54PE se comportou de modo diferente das demais variantes, observando-se a diminuição da atividade da via NF- κ B, quando comparada a referência E7.

Na avaliação da expressão do mRNA E7, observou-se que a expressão da variante 54PE era 1,5 ~ 2,0 vezes menor do que a expressão de referência E7 do HPV- 58.

A variante HPV58/UFPE-54PE apresentou a menor ativação de NF- κ B.

A variante HPV58/UFPE-54PE foi a que apresentou a menor expressão de mRNA, correlacionando com o nível de ativação da via NF- κ B.

REFERÊNCIAS

- ALRAJJAL, A. *et al.* Squamous intraepithelial lesions (SIL: LSIL, HSIL, ASCUS, ASC-H, LSIL-H) of uterine cervix and Bethesda system. **Cytojournal**, v. 18, p. 16, 2021. https://doi.org/10.25259/cytojournal_24_2021
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- ANACKER, D. C.; MOODY, C. A. Modulation of the DNA damage response during the life cycle of human papillomaviruses. **Virus Research**, v. 231, p. 41-49, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.11.006>
- BALDEZ DA SILVA, M. F. P. T. *et al.* Frequency of human papillomavirus types 16, 18, 31, and 33 and sites of cervical lesions in gynecological patients from Recife, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n. 1, p. 462-466, 2012. <https://doi.org/10.4238/2012.march.1.3>
- BASEMAN, J. G.; KOUTSKY, L. A. The epidemiology of human papillomavirus infections. **Journal of Clinical Virology**, v. 32, p. 16-24, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.12.008>
- BASTO, D. L. *et al.* Genetic diversity of human papillomavirus types 35, 45 and 58 in cervical cancer in Brazil. **Archives of Virology**, v. 162, n. 9, p. 2855-2860, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3439-5>
- BAUD, V.; JACQUE, E. Voie alternative d'activation de NF- κ B et cancer: amis ou ennemis? **Médecine Sciences**, v. 24, n. 12, p. 1083-1088, 2008. <https://doi.org/10.1051/medsci/200824121083>
- BENKERT, P.; BIASINI, M.; SCHWEDE, T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. **Bioinformatics**, v. 27, n. 3, p. 343-350, 2011. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq662>
- BERNARD, H.-U.; CALLEJA-MACIAS, I. E.; DUNN, S. T. Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. **International Journal of Cancer**, v. 118, n. 5, p. 1071-1076, 2006. <https://doi.org/10.1002/ijc.21655>
- BERNARD, H.-U. *et al.* Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**, v. 401, n. 1, p. 70-79, 2010. <https://doi.org/10.1016%2Fj.virol.2010.02.002>
- BHATTACHARYA, D. *et al.* 3Drefine: an interactive web server for efficient protein structure refinement. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. W1, p. W406-W409, 2016. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw336>

- BIENKOWSKA-HABA, M.; PATEL, H. D.; SAPP, M. Target cell cyclophilins facilitate human papillomavirus type 16 infection. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 7, e1000524, 2009. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000524>
- BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- BRIANTI, P.; DE FLAMMINEIS, E.; MERCURI, S. R. Review of HPV-related diseases and cancers. **New Microbiologica**, v. 40, n. 2, p. 80-85, 2017.
- BUCK, C. B. *et al.* Arrangement of L2 within the papillomavirus capsid. **Journal of Virology**, v. 82, n. 11, p. 5190-5197, 2008. <https://doi.org/10.1128%2FJVI.02726-07>
- BURD, E. M. Human papillomavirus and cervical cancer. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 1, p. 1-17, 2003. <https://doi.org/10.1128%2FCMR.16.1.1-17.2003>
- BURK, R. D.; HARARI, A.; CHEN, Z. Human papillomavirus genome variants. **Virology**, v. 445, n. 0, p. 232-243, 2013. <https://doi.org/10.1016%2Fj.virol.2013.07.018>
- BYG, L. M.; VIDLUND, J.; VASILJEVIC, N.; CLAUSEN, D.; FORSLUND, O.; NORRILD, B. NF- κ B signalling is attenuated by the E7 protein from cutaneous human papillomaviruses. **Virus Research**, v. 169, n. 1, p. 48-53, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.06.028>
- 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, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2011.07.008>
- CHAN, P. K. S. *et al.* Association of human papillomavirus type 58 variant with the risk of cervical cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 94, n. 16, p. 1249-1253, 2002. <https://doi.org/10.1093/jnci/94.16.1249>
- CHAN, P. K. S. *et al.* Identification of human papillomavirus type 58 lineages and the distribution worldwide. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 203, n. 11, p. 1565-1573, 2011. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir157>
- CHAN, P. K. S. *et al.* Geographical distribution and oncogenic risk association of human papillomavirus type 58 E6 and E7 sequence variations. **International Journal of Cancer**, v. 132, n. 11, p. 2528-2536, 2013. <https://doi.org/10.1002/ijc.27932>
- CHATURVEDI, M. M. *et al.* NF- κ B addiction and its role in cancer: 'one size does not fit all'. **Oncogene**, v. 30, n. 14, p. 1615-1630, 2011. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.566>
- CHEN, H.-Z.; TSAI, S.-Y.; LEONE, G. Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 11, p. 785-797, 2009. <https://doi.org/10.1038/nrc2696>

- CHEN, V. B. *et al.* MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 66, n. 1, p. 12-21, 2010. <https://doi.org/10.1107/s0907444909042073>
- CHEN, Z. *et al.* E6 and E7 gene polymorphisms in human papillomavirus types-58 and 33 identified in Southwest China. **Plos One**, v. 12, n. 1, e0171140, 2017a. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171140>
- CHEN, Z. *et al.* Ancient evolution and dispersion of human papillomavirus 58 variants. **Journal of Virology**, v. 91, n. 21, e01285-17, 2017b. <https://doi.org/10.1128/jvi.01285-17>
- CHENG, S. *et al.* Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. **Genes & Development**, v. 9, n. 19, p. 2335-2349, 1995. <https://doi.org/10.1101/gad.9.19.2335>
- CHESSON, H. W. *et al.* The estimated lifetime probability of acquiring human papillomavirus in the United States. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 41, n. 11, p. 660-664, 2014. <https://doi.org/10.1097/olq.0000000000000193>
- CLAUDIO, E. *et al.* BAFF-induced NEMO-independent processing of NF- κ B2 in maturing B cells. **Nature Immunology**, v. 3, n. 10, p. 958-965, 2002. <https://doi.org/10.1038/ni842>
- CLIFFORD, G. M. *et al.* Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. **British Journal of Cancer**, v. 88, n. 1, p. 63-73, 2003. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600688>
- CROSBIE, E. J. *et al.* Human papillomavirus and cervical cancer. **The Lancet**, v. 382, n. 9895, p. 889-899, 2013. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60022-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60022-7)
- DA COSTA, R. M. G. *et al.* The NF κ B signaling pathway in papillomavirus-induced lesions: friend or foe? **Anticancer Research**, v. 36, n. 5, p. 2073-2083, 2016.
- DARRIBA, D. *et al.* jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, v. 9, n. 8, p. 772-772, 2012. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- DAY, P. M. *et al.* Identification of a role for the *trans*-Golgi network in human papillomavirus 16 pseudovirus infection. **Journal of Virology**, v. 87, n. 7, p. 3862-3870, 2013. <https://doi.org/10.1128/jvi.03222-12>
- DE VILLIERS, E.-M. *et al.* Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17-27, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.033>

DEARLOVE, B. *et al.* A SARS-CoV-2 vaccine candidate would likely match all currently circulating variants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 38, p. 23652-23662, 2020. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.2008281117>

DiGIUSEPPE, S. *et al.* Cruising the cellular highways: how human papillomavirus travels from the surface to the nucleus. **Virus Research**, v. 231, p. 1-9, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.10.015>

DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. *Journal of Clinical Virology*, v. 32, p. 7–15, mar. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.10.015>

DOORBAR, J. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. **Virology**, v. 445, n. 1-2, p. 80-98, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.07.008>

DREER, M.; VAN DE POEL, S.; STUBENRAUCH, F. Control of viral replication and transcription by the papillomavirus E8^{E2} protein. **Virus Research**, v. 231, p. 96-102, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.11.005>

FERLAY, J. *et al.* Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. **International Journal of Cancer**, v. 144, n. 8, p. 1941-1953, 2019. <https://doi.org/10.1002/ijc.31937>

FRANCO, E. L. Cancer causes revisited: human papillomavirus and cervical neoplasia. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 87, n. 11, p. 779-780, 1995. <https://doi.org/10.1093/jnci/87.11.779>

FREITAS, A. C. *et al.* Susceptibility to cervical cancer: an overview. **Gynecologic Oncology**, v. 126, n. 2, p. 304-311, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2012.03.047>

GARNER-HAMRICK, P. A. *et al.* Global effects of human papillomavirus type 18 E6/E7 in an organotypic keratinocyte culture system. **Journal of Virology**, v. 78, n. 17, p. 9041-9050, 2004. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.17.9041-9050.2004>

GHITTONI, R. *et al.* Role of human papillomaviruses in carcinogenesis. **Ecancermedicalscience**, v. 9, p. 526, 2015. <https://doi.org/10.3332/Ecancer.2015.526>

GILMORE, T. D. Introduction to NF-κB: players, pathways, perspectives. **Oncogene**, v. 25, n. 51, p. 6680-6684, 2006. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209954>

GRAHAM, S. V. The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. **Clinical Science**, v. 131, n. 17, p. 2201-2221, 2017. <https://doi.org/10.1042/cs20160786>

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, 546354, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/546354>

HEGDE, R. S. The papillomavirus E2 proteins: structure, function, and biology. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 31, n. 1, p. 343-360, 2002. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.31.100901.142129>

HERFS, M. *et al.* A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 26, p. 10516-10521, 2012. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202684109>

HO, C.-M. *et al.* Integrated human papillomavirus types 52 and 58 are infrequently found in cervical cancer, and high viral loads predict risk of cervical cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 102, n. 1, p. 54-60, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2005.11.035>

HOESEL, B.; SCHMID, J. A. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. **Molecular Cancer**, v. 12, 86, 2013. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-86>

HOFFMANN, A. *et al.* The I κ B-NF- κ B signaling module: temporal control and selective gene activation. **Science**, v. 298, n. 5596, p. 1241-1245, 2002. <https://doi.org/10.1126/science.1071914>

HU, Z.; MA, D. The precision prevention and therapy of HPV-related cervical cancer: new concepts and clinical implications. **Cancer Medicine**, v. 7, n. 10, p. 5217-5236, 2018. <https://doi.org/10.1002/cam4.1501>

HU, Z. *et al.* TALEN-mediated targeting of HPV oncogenes ameliorates HPV-related cervical malignancy. **Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 1, p. 425-436, 2015. <https://doi.org/10.1172/jci78206>

HUSSAIN, I. *et al.* NF- κ B protects human papillomavirus type 38 E6/E7-immortalized human keratinocytes against tumor necrosis factor alpha and UV-mediated apoptosis. **Journal of Virology**, v. 85, n. 17, p. 9013-9022, 2011. <https://doi.org/10.1128/jvi.00002-11>

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA.
Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2019a.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA.
Parâmetros técnicos para o rastreamento do câncer do colo do útero. Rio de Janeiro: INCA, 2019b.

JAMES, M. A.; LEE, J. H.; KLINGELHUTZ, A. J. Human papillomavirus type 16 E6 activates NF- κ B, induces cIAP-2 expression, and protects against apoptosis in a PDZ binding motif-dependent manner. **Journal of Virology**, v. 80, n. 11, p. 5301-5307, 2006. <https://doi.org/10.1128/jvi.01942-05>

JONES, D. L.; ALANI, R. M.; MÜNGER, K. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. **Genes & Development**, v. 11, n. 16, p. 2101-2111, 1997.

<https://doi.org/10.1101/gad.11.16.2101>

KARIN, M.; DELHASE, M. The I κ B kinase (IKK) and NF- κ B: key elements of proinflammatory signalling. **Seminars in Immunology**, v. 12, n. 1, p. 85-98, 2000.

<https://doi.org/10.1006/smim.2000.0210>

KARIN, M.; LIN, A. NF- κ B at the crossroads of life and death. **Nature Immunology**, v. 3, n. 3, p. 221-227, 2002. <https://doi.org/10.1038/ni0302-221>

KIM, D. E.; CHIVIAN, D.; BAKER, D. Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. Web Server, p. W526-W531, 2004. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh468>

KUCHARCZAK, J. *et al.* To be, or not to be: NF- κ B is the answer – role of Rel/NF- κ B in the regulation of apoptosis. **Oncogene**, v. 22, n. 56, p. 8961-8982, 2003.

<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207230>

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016. <https://doi.org/10.1093/molbev%2Fmsw054>

KUMAR, A. *et al.* Identification of human papillomavirus-16 E6 variation in cervical cancer and their impact on T and B cell epitopes. **Journal of Virological Methods**, v. 218, p. 51-58, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.03.008>

LASKOWSKI, R. A. *et al.* PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283-291, 1993. <https://doi.org/10.1107/S0021889892009944>

LAUCK, F. *et al.* RosettaBackrub-a web server for flexible backbone protein structure modeling and design. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. Web Server, p. W569-W575, 2010. <https://doi.org/10.1093%2Fnar%2Fgkq369>

LAW, P. T. Y. *et al.* Oncogenic comparison of human papillomavirus type 58 E7 variants. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 23, n. 2, p. 1517-1527, 2019. <https://doi.org/10.1111%2Fjcmm.14059>

LEITÃO, M. C. G. *et al.* Quantifying mRNA and MicroRNA with qPCR in cervical carcinogenesis: a validation of reference genes to ensure accurate data. **Plos One**, v. 9, n. 11, e111021, 2014. <https://doi.org/10.1371%2Fjournal.pone.0111021>

LI, Y. *et al.* Human papillomavirus type 58 genome variations and RNA expression in cervical lesions. **Journal of Virology**, v. 87, n. 16, p. 9313-9322, 2013. <https://doi.org/10.1128%2FJVI.01154-13>

LI, F. *et al.* NF- κ B in cancer therapy. **Archives of Toxicology**, v. 89, n. 5, p. 711-731, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1470-4>

LIU, F. *et al.* IKK biology. **Immunological Reviews**, v. 246, n. 1, p. 239-253, 2012a. <https://doi.org/10.1111%2Fj.1600-065X.2012.01107.x>

LIU, J. *et al.* Variations of human papillomavirus type 58 E6, E7, L1 genes and long control region in strains from women with cervical lesions in Liaoning province, China. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 7, p. 1466-1472, 2012b. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.05.004>

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

LONGWORTH, M. S.; LAIMINS, L. A. The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc finger-like motifs of the E7 protein are essential for the life cycle of human papillomavirus type 31. **Journal of Virology**, v. 78, n. 7, p. 3533-3541, 2004. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.7.3533-3541.2004>

LUK, C. S. **Sequence variation of human papillomavirus type 58 across the world**. 2009. 189f. Thesis (Master of Philosophy in Microbiology) – The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong, 2009.

MA, H. *et al.* Polymorphisms in the MDM2 promoter and risk of breast cancer: a case-control analysis in a Chinese population. **Cancer Letters**, v. 240, n. 2, p. 261-267, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.09.019>

MAGALHÃES, G. M. *et al.* Update on human papilloma virus - part I: epidemiology, pathogenesis, and clinical spectrum. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 96, n. 1, p. 1-16, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.abd.2020.11.003>

MAGLENNON, G. A.; McINTOSH, P.; DOORBAR, J. Persistence of viral DNA in the epithelial basal layer suggests a model for papillomavirus latency following immune regression. **Virology**, v. 414, n. 2, p. 153-163, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.03.019>

MANOS, M. M. *et al.* The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. **Cancer Cells Mol. Diagnost. Hum. Cancer**, v. 7, p. 209-214, 1989.

McBRIDE, A. A. Mechanisms and strategies of papillomavirus replication. **Biological Chemistry**, v. 398, n. 8, p. 919-927, 2017. <https://doi.org/10.1515/hsz-2017-0113>

MITCHELL, S.; VARGAS, J.; HOFFMANN, A. Signaling via the NF κ B system. **Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine**, v. 8, n. 3, p. 227-241, 2016. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1331>

MOBERG, M. *et al.* High viral loads of human papillomavirus predict risk of invasive cervical carcinoma. **British Journal of Cancer**, v. 92, n. 5, p. 891-894, 2005.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602436>

MODIS, Y.; TRUS, B. L.; HARRISON, S. C. Atomic model of the papillomavirus capsid. **The Embo Journal**, v. 21, n. 18, p. 4754-4762, 2002.
<https://doi.org/10.1093%2Femboj%2Fcdf494>

MOODY, C. Mechanisms by which HPV induces a replication competent environment in differentiating keratinocytes. **Viruses**, v. 9, n. 9, 261, 2017.
<https://doi.org/10.3390/v9090261>

MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 8, p. 550-560, 2010.
<https://doi.org/10.1038/nrc2886>

MOYNAGH, P. N. The NF- κ B pathway. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. 20, p. 4589-4592, 2005. <https://doi.org/10.1242/jcs.02579>

MUÑOZ, N. *et al.* Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 6, p. 518-527, 2003. <https://doi.org/10.1056/nejmoa021641>

MUÑOZ, N. *et al.* Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. **International Journal of Cancer**, v. 111, n. 2, p. 278-285, 2004. <https://doi.org/10.1002/ijc.20244>

NEES, M. *et al.* Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation-associated and NF- κ B-responsive genes in cervical keratinocytes. **Journal of Virology**, v. 75, n. 9, p. 4283-4296, 2001. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.9.4283-4296.2001>

OECKINGHAUS, A.; GHOSH, S. The NF- κ B family of transcription factors and its regulation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 1, n. 4, a000034, 2009.
<https://doi.org/10.1101%2Fcshperspect.a000034>

PANGARKAR, M. A. The Bethesda System for reporting cervical cytology. **Cytojournal**, v. 19, 28, 2022. https://doi.org/10.25259%2FCMAS_03_07_2021

PATEL, D. The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300. **The EMBO Journal**, v. 18, n. 18, p. 5061-5072, 1999.
<https://doi.org/10.1093%2Femboj%2F18.18.5061>

PEIRSON, L. *et al.* Screening for cervical cancer: a systematic review and meta-analysis. **Systematic Reviews**, v. 2, 35, 2013. <https://doi.org/10.1186/2046-4053-2-35>

PERKINS, N. D.; GILMORE, T. D. Good cop, bad cop: the different faces of NF- κ B. **Cell Death and Differentiation**, v. 13, n. 5, p. 759-772, 2006.
<https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401838>

POL, S. B. V.; KLINGELHUTZ, A. J. Papillomavirus E6 oncoproteins. **Virology**, v. 445, n. 0, p. 115-137, 2013. <https://doi.org/10.1016%2Fj.virol.2013.04.026>

PRABHAVATHY, D.; SUBRAMANIAN, C. K.; KARUNAGARAN, D. Re-expression of HPV16 E2 in SiHa (human cervical cancer) cells potentiates NF- κ B activation induced by TNF- α concurrently increasing senescence and survival. **Bioscience Reports**, v. 35, n. 1, e00175, 2015. <https://doi.org/10.1042%2FBRSR20140160>

PYEON, D. *et al.* Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 2, e1000318, 2009. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000318>

RAFF, A. B. *et al.* The evolving field of human papillomavirus receptor research: a review of binding and entry. **Journal of Virology**, v. 87, n. 11, p. 6062-6072, 2013. <https://doi.org/10.1128/jvi.00330-13>

RICHARDS, R. M. *et al.* Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 5, p. 1522-1527, 2006. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508815103>

ROMAN, A.; MUNGER, K. The papillomavirus E7 proteins. **Virology**, v. 445, n. 1-2, p. 138-168, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.04.013>

ROSITCH, A. F. *et al.* Patterns of persistent genital human papillomavirus infection among women worldwide: a literature review and meta-analysis. **International Journal of Cancer**, v. 133, n. 6, p. 1271-1285, 2013. <https://doi.org/10.1002%2Fijc.27828>

SAHA, S.; RAGHAVA, G.P.S. AlgPred: prediction of allergenic proteins and mapping of IgE epitopes. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. Web Server, p. W202-W209, 2006. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl343>

SANDERS, C. M.; STENLUND, A. Transcription factor-dependent loading of the E1 initiator reveals modular assembly of the papillomavirus origin melting complex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 5, p. 3522-3534, 2000. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.5.3522>

SCHEURER, M. E.; TORTOLERO-LUNA, G.; ADLER-STORTHZ, K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 15, n. 5, p. 727-746, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1438.2005.00246.x>

SCHIFFMAN, M. *et al.* Human papillomavirus and cervical cancer. **Lancet (London, England)**, v. 370, n. 9590, p. 890-907, 2007. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(07\)61416-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(07)61416-0)

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, 2010. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-09-4179>

SCHILLER, J. T.; DAY, P. M.; KINES, R. C. Current understanding of the mechanism of HPV infection. **Gynecologic Oncology**, v. 118, n. 1, p. S12-S17, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2010.04.004>

SCHULTE-FROHLINDE, R. *et al.* Predicting cohort-specific cervical cancer incidence from population-based surveys of human papilloma virus prevalence: a worldwide study. **American Journal of Epidemiology**, v. 191, n. 3, p. 402-412, 2022. <https://doi.org/10.1093/aje/kwab254>

SHABAB, T. *et al.* Neuroinflammation pathways: a general review. **International Journal of Neuroscience**, v. 127, n. 7, p. 624-633, 2017. <https://doi.org/10.1080/00207454.2016.1212854>

SINGH, H.; RAGHAVA, G. P. S. ProPred: prediction of HLA-DR binding sites. **Bioinformatics**, v. 17, n. 12, p. 1236-1237, 2001. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.12.1236>

SINGH, H.; RAGHAVA, G. P. S. ProPred1: prediction of promiscuous MHC Class-I binding sites. **Bioinformatics**, v. 19, n. 8, p. 1009-1014, 2003. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg108>

SMYTH, M. J.; DUNN, G. P.; SCHREIBER, R. D. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. **Advances in Immunology**, v. 90, p. 1-50, 2006. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(06\)90001-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(06)90001-7)

SONG, J. S. *et al.* Significance of HPV-58 infection in women who are HPV-positive, cytology-negative and living in a country with a high prevalence of HPV-58 infection. **Plos One**, v. 8, n. 3, e58678, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058678>

SPITKOVSKY, D. *et al.* The human papillomavirus oncoprotein E7 attenuates NF- κ B activation by targeting the I κ B kinase complex. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 28, p. 25576-25582, 2002. <https://doi.org/10.1074/jbc.m201884200>

STADEN, R. The staden sequence analysis package. **Molecular Biotechnology**, v. 5, p. 233-241, 1996. <https://doi.org/10.1007/BF02900361>

STANLEY, M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. **Gynecologic Oncology**, v. 117, n. 2, p. S5-S10, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2010.01.024>

STEENBERGEN, R. D. M. *et al.* HPV-mediated transformation of the anogenital tract. **Journal of Clinical Virology**, v. 32, p. 25-33, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.11.019>

STÜNKEL, W.; BERNARD, H.-U. The chromatin structure of the long control region of human papillomavirus type 16 represses viral oncoprotein expression. **Journal of Virology**, v. 73, n. 3, p. 1918-1930, 1999. <https://doi.org/10.1128/jvi.73.3.1918-1930.1999>

SUN, S.-C. The non-canonical NF- κ B pathway in immunity and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 9, p. 545-558, 2017. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.52>

TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. **Molecular Biology and Evolution**, v. 38, n. 7, p. 3022-3027, 2021. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>

TENJIMBAYASHI, Y. *et al.* Whole-genome analysis of human papillomavirus genotypes 52 and 58 isolated from Japanese women with cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical cancer. **Infectious Agents and Cancer**, v. 12, 44, 2017. <https://doi.org/10.1186/s13027-017-0155-4>

TILBORGHS, S. *et al.* The role of Nuclear Factor-kappa B signaling in human cervical cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 120, p. 141-150, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.11.001>

TOTA, J. E. *et al.* Epidemiology and burden of HPV infection and related diseases: implications for prevention strategies. **Preventive Medicine**, v. 53, n. 1, p. S12-S21, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ypmed.2011.08.017>

VAN DOORSLAER, K. *et al.* The papillomavirus episteme: a major update to the papillomavirus sequence database. **Nucleic Acids Research**, v. 45, p. D499-D506, 2017. <https://doi.org/10.1093%2Fnar%2Fgkw879>

VANDERMARK, E. R. *et al.* Human papillomavirus type 16 E6 and E 7 proteins alter NF- κ B in cultured cervical epithelial cells and inhibition of NF- κ B promotes cell growth and immortalization. **Virology**, v. 425, n. 1, p. 53-60, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.12.023>

WAGGONER, S. E. Cervical cancer. **Lancet (London, England)**, v. 361, n. 9376, p. 2217-2225, 2003. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(03\)13778-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(03)13778-6)

WALBOOMERS, J. M. M. *et al.* Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **The Journal of Pathology**, v. 189, n. 1, p. 12–19, 1999. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9896\(199909\)189:1%3C12::aid-path431%3E3.0.co;2-f](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9896(199909)189:1%3C12::aid-path431%3E3.0.co;2-f)

WERNER, S. L.; BARKEN, D.; HOFFMANN, A. Stimulus specificity of gene expression programs determined by temporal control of IKK activity. **Science**, v. 309, n. 5742, p. 1857-1861, 2005. <https://doi.org/10.1126/science.1113319>

WESTRICH, J. A.; WARREN, C. J.; PYEON, D. Evasion of host immune defenses by human papillomavirus. **Virus Research**, v. 231, p. 21-33, 2017. <https://doi.org/10.1016%2Fj.virusres.2016.11.023>

- WICOVSKY, A. *et al.* TNF-like weak inducer of apoptosis inhibits proinflammatory TNF receptor-1 signaling. **Cell Death & Differentiation**, v. 16, n. 11, p. 1445-1459, 2009. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.80>
- 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. <https://doi.org/10.1038/nrc2050>
- WORTH, C. L.; PREISSNER, R.; BLUNDELL, T. L. SDM-a server for predicting effects of mutations on protein stability and malfunction. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. Web Server, p. W215-W222, 2011. <https://doi.org/10.1093%2Fnar%2Fgkr363>
- XI, J. *et al.* The polymorphisms of LCR, E6, and E7 of HPV-58 isolates in Yunnan, Southwest China. **Virology Journal**, v. 15, n. 1, 76, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12985-018-0986-7>
- XIA, Y.; SHEN, S.; VERMA, I. M. NF- κ B, an active player in human cancers. **Cancer Immunology Research**, v. 2, n. 9, p. 823-830, 2014. <https://doi.org/10.1158%2F2326-6066.CIR-14-0112>
- YANG, Z. Likelihood ratio tests for detecting positive selection and application to primate lysozyme evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v. 15, n. 5, p. 568-573, 1998. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025957>
- YANG, Z. Complexity of the simplest phylogenetic estimation problem. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 267, n. 1439, p. 109-116, 2000. <https://doi.org/10.1098%2Frspsb.2000.0974>
- YANG, Z. PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 8, p. 1586-1591, 2007. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm088>
- YANG, Z.; NIELSEN, R. Synonymous and nonsynonymous rate variation in nuclear genes of mammals. **Journal of Molecular Evolution**, v. 46, n. 4, p. 409-418, 1998. <https://doi.org/10.1007/pl00006320>
- YANG, L. *et al.* Genetic variability of HPV-58 E6 and E7 genes in Southwest China. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 21, p. 395-400, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.12.009>
- YANG, Z. *et al.* Genetic variability of E6 and E7 genes of human papillomavirus type 58 in Jingzhou, Hubei Province of central China. **Virology Journal**, v. 19, n. 1, 71, 2022. <https://doi.org/10.1186/s12985-022-01801-6>
- YU, J.-H. *et al.* Genetic variability and oncogenic risk association of human papillomavirus type 58 E6 and E7 genes in Taizhou area, China. **Gene**, v. 686, p. 171-176, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.11.066>

ZHANG, Y. TM-align: a protein structure alignment algorithm based on the TM-score. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 7, p. 2302-2309, 2005.

<https://doi.org/10.1093%2Fnar%2Fgki524>

ZHANG, B.; CHEN, W.; ROMAN, A. The E7 proteins of low- and high-risk human papillomaviruses share the ability to target the pRB family member p130 for degradation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 2, p. 437- 442, 2006. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510012103>

ZHANG, Q.; LENARDO, M. J.; BALTIMORE, D. 30 years of NF- κ B: a blossoming of relevance to human pathobiology. **Cell**, v. 168, n. 1-2, p. 37-57, 2017.

<https://doi.org/10.1016%2Fj.cell.2016.12.012>

ZHOU, Z. *et al.* Human papillomavirus type 16 E6 and E7 gene variations associated with cervical cancer in a Han Chinese population. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 73, p. 13-20, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.04.008>

ZIMMERMANN, H. *et al.* The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. **Journal of Virology**, v. 73, n. 8, p. 6209-6219, 1999.

<https://doi.org/10.1128/jvi.73.8.6209-6219.1999>

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

<https://doi.org/10.1038/nrc798>

APÊNDICE A – ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA

71



microorganisms



Type of the Paper (Article.)

E7 oncogene HPV 58 variants detected in Northeast Brazil: genetic and functional analysis

Bárbara Chagas[†], Elias Tibúrcio Júnior[†], Ruany Cristyne de Oliveira Silva¹, Daffany Luana dos Santos¹, Marconi Rego Barros-Junior¹, Rita de Cássia Pereira de Lima¹, Maria da Conceição Viana-Invenção¹, Pedro-Luiz França Neto¹, Vanessa Emanuelle Pereira Santos¹, Antônio Humberto Silva-Júnior², Jacinto Costa Silva-Neto³, Marcus Vinícius de Aragão Batista⁴, Antonio Carlos de Freitas^{1*}

Citation: To be added by editorial staff during production.

Academic Editor: Firstname Lastname

Received: date

Revised: date

Accepted: date

Published: date



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

¹ Laboratory of Molecular Studies and Experimental Therapy (LEMTE), Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Pernambuco, Brazil,

² Center for Biological and Health Sciences, Federal University of Campina Grande, Campina Grande, Brazil. ³ Laboratory of Molecular and Cytological Research, Department of Histology, Federal University of Pernambuco, Pernambuco, Brazil

⁴ Laboratory of Molecular Genetics and Biotechnology, Department of Biology, Federal University of Sergipe, Sergipe, Brazil

[†] These authors contributed equally to the article

* Dr. Antonio Carlos de Freitas, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, 50670-901, Recife-PE, Brazil. Fax: +55 81 21268522. E-mail: acf_ufpe@yahoo.com.br

Abstract: Cervical cancer is associated with persistent infections by high-risk HPV types that may have nucleotide polymorphisms and, consequently, different oncogenic potentials. Therefore, the objective of this study was to evaluate the genetic variability and structural effects of E7 oncogene of HPV58 in cervical scraping samples from Brazilian women. The study was carried out with patients from hospitals in metropolitan area of Recife, PE, Brazil. The most frequent HPV type was HPV16, 18 and 58, respectively. Phylogenetic analysis showed that the isolates were classified as sublineages A2, C1 and D2. Two positively selected mutations were found in E7: 63G and 64T. The mutations G41R, G63D and T64A in E7 protein were predicted to reduce the stability of the protein structure. Regarding the interaction of the E7 variant of HPV58 with the signaling of the NF-κB pathway, we observed that the variant HPV58/UFPE-54S decreased the activity of the pathway when compared to the prototype and the other variants behaved similarly to the prototype and the prototype increased the activity of the pathway when compared to pcDNA. In this study, it was possible to identify mutations that may interfere in the molecular interaction between the viral oncoproteins and host proteins.

Keywords: human papillomavirus 58; E7 oncogene; variants; phylogenetic analysis; gene expression

1. Introduction

It is well established that cervical cancer is caused by the infection of high-risk HPVs (hrHPVs), which include genotypes of high carcinogenic potential [1]. In Brazil, the most frequent hrHPVs are 16, 31, and 58 [2]. Together, they reach the third position in tumor frequency (about 16,340 new cases were reported in 2016) and the fourth in cause of deaths in the female population of this country, constituting a serious public health issue, as it occurs in other developing countries [3]. It was estimated by the World Health Organization (WHO) that 84% of cervical cancer cases occurred in developing countries in 2018, with about 311,000 women deaths. This issue is mainly due to failures in the execution of public health programs for the screening of this cancer [4].

In Northeast of Brazil, HPV58 appears again as one of the most frequent genotypes in cervical lesions (the second most frequent), together with HPVs 16 (1st) and 31 (3rd) [5]. In CIN3 lesions, HPV58 was also the second most frequent and the third in invasive cancer lesions [6]. As hrHPVs 16 and 31, HPV58 is an Alpha papillomavirus, constituting an important cause of cervical cancer and plays a key role in cervical carcinogenesis by the expression of its oncogenes, especially E6 and E7 [7].

The impact of different genetics variants on carcinogenesis varies widely, due to their influence in host immune response, cell proliferation and the expression of specific molecules which modify cell signaling and communication as well as proinflammatory and apoptosis activities [8,9]. It is known, for example, that variants established by part of LCR region and entire E6 from HPVs 16 and 18 showed different predispositions for lesion progression to CIN3 [10]. In other study, E6 and E7 oncogenes variations of HPV18 have been associated with different histological forms of cervical cancer [11]. Variants produced by differences in nucleotide sequences of these regions produce effects on viral replication and transcription, and the presence of specific epitopes [2,5]. Therefore, these and other data have established that different variant have different oncogenic potentials.

Regarding HPV58, several studies have found different clinical implications for its oncogene variants, such as E7. For example, a specific variant of this oncogene, T20I/G63S, was associated with an increased immortalizing potential (higher than the prototype), transforming ability, capacity of degrading pRb [12] and risk of cervical cancer due to the induced activation of AKT and K-Ras/ERK signaling pathways [9]. Also, the evaluation of gene variants is important for identification of epitopes for the development more efficient vaccines which would be directed to specific populations [13,14].

In unpublished data, our group has found that different variants of E7 oncogene presented different effects on NF- κ B gene expression when compared the variants with each other and with the wild gene. It is well established this transcription factor plays a central role in carcinogenesis of cervical and other cancers due to its effects on transduction signaling (e.g. of TLRs and IFNs), stromal environment, proinflammatory response and immune surveillance [15,16].

In addition, specific variants correlate with specific clinical and epidemiological attributes, with risk of cervical cancer and thus, with disease prognosis [8,10,17]. Therefore, the evaluation of hrHPV oncogenes variants is important to assess disease progression, establish patient prognosis and choose the best therapeutic strategy according to clinical presentation.

In this context, this study aimed to evaluate the genetic variability and structural effects of E7 oncogene of HPV58 in cervical scraping samples from Brazilian women in order to identify the possible impact of these mutations in the carcinogenic process.

2. Materials and Methods

2.1 Study groups and DNA isolation

We enrolled 319 women aging from 18 to 77 years old, with a mean age of 37,5 (s.d.11.9) attended at the Gynecology Unit at the Clinical Hospital (n=81) and Oswaldo Cruz University Hospital (n=156) at Recife, Pernambuco State, Northeastern Brazil, and at the Center for Integral Attention to Women's Health (n=82) at Aracaju, Sergipe State, Northeastern Brazil. The patients came from spontaneous demand and routine examinations. Approval of the Ethical Committee (CEP/CCS/UFPE N° 49/11) and informed consent from all patients enrolled for the study were obtained.

The samples selected for analysis came from cervical scraping, collected through a gynecological brush (cytobrush) which reaches the endocervix. The brush containing the collected gynecological material was transferred to a sterile tube containing PBS solution (pH 7.4) to preserve the cells until DNA extraction. Cervical cells were stored at -80°C and the DNA was extracted using DNeasy Blood Tissue Kit (Qiagen) according to the manufacturer manual.

2.2 HPV: detection and genotyping

The extracted DNA was amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR) of human MDM2 gene (forward primer: 5'-GATTTTCGGACGGCTCTCGCGGC-3'; reverse primer: 5'-GATTTTCGGACGGCTCTCGCGGC-3') to evaluate the quality of DNA, in order to avoid false negative results [Ma et al., 2006]. The PCR reaction was performed in 20 µL volume, containing 2 µL (50 ng/µL) of the extracted DNA, 10 µL of GoTaq Green PCR Master Mix (Promega), 1.2 µL of each primer (12.2 pM/µL) and 5.6 µL of Nuclease-Free Water (Promega). The reaction condition was 95°C for 5 minutes, followed by 35 cycles of 94°C for 30 seconds, 66.5°C for 40 seconds, 72°C for 45 seconds, and then 72°C for 10 minutes.

HPV DNA was detected by PCR based on the amplification of the viral L1 gene fragment using consensus and degenerate primers MY09 (5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3') and MY11 (5'-GCMCAGGGWCATAAAYAATGG-3')

[Manos et al., 1989]. The PCR reaction was performed in 25 µL volume, containing 2 µL (50 ng/µL) of the extracted DNA, 12.5 µL of GoTaq Green PCR Master Mix (Promega), 1.5 µL of each primer (10 pM/µL) and 7.5 µL of Nuclease-Free Water (Promega). The reaction condition was 94°C for 1 minute, followed by 35 cycles of 94°C for 30 seconds, 55°C for 1 minute, 72°C for 1 minute, and then 72°C for 10 minutes.

HPV DNA genotyping was also performed by PCR technique using specific primers for HPV-58 (forward primer: 5'-CCGTTTGGGTACATTGTCATGT-3' located at positions 7781-7805; reverse primer: 5'-AAGCCTATTTATCCTCGTCTGAG-3' located at positions 666-689). The PCR reaction was performed in 25 µL volume, containing 2 µL (50 ng/µL) of the extracted DNA, 12.5 µL of GoTaq Green PCR Master Mix (Promega), 1.5 µL of each primer (10 pM/µL) and 7.5 µL of Nuclease-Free Water (Promega). The reaction condition was 94°C for 2 minutes, followed by 35 cycles of 94°C for 10 seconds, 59°C for 20 seconds, 72°C for 1 minute, and then 72°C for 5 minutes. All samples were amplified in the presence of negative control (milli-Q water). The PCR products obtained were examined on the 2% agarose gel stained with ethidium bromide.

All HPV58 samples were tested for E7 genetic variability using specific primers (E7 forward primer: 5'-ATTTGTCAAAGACAATTGTGTCCAC-3' located at positions 488509, E7 reverse primer: 5'-TTAAATCTGTACCACTATCGTCTGC-3' located at positions 1000-1024). PCR reactions were performed in a final volume of 50 µL, containing 4 µL of the extracted DNA (50 ng/µL), 2 mM MgSO₄ (Invitrogen), 0.2 mM dNTP mix (Promega), 10 pM of each primer and 1U Platinum Taq DNA polymerase High Fidelity (Invitrogen). The reaction condition was 94°C for 2 minutes, followed by 35 cycles of 94°C for 10 seconds, 58°C for 20 seconds, 72°C for 1 minute, and then 72°C for 5 minutes. The positive fragments were sequenced (both strands) using ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing

V.3.1 kit (Applied Biosystems) with the same reverse and forward primers used in the amplification reaction. The obtained sequences were checked for quality and assembled using the Staden package [18]. HPV58 E7 sequences were compared to sequences from GenBank using BLAST [19]. Subsequently, the sequences were aligned with the HPV58 prototype sequence (GenBank: D90400.1) using MEGA (version 7.0) [20].

2.3 Phylogenetic analysis

A Maximum Likelihood phylogenetic tree was reconstructed based on the sequences of E7 gene by using MEGA11 [21]. The evolutionary model that best fits the data was used (K80+I), which was selected based on the Bayesian Information Criteria (BIC) using jModelTest 2 [22]. SPR was used as ML heuristic method and moderate branch swap filter. Branch support was assessed with 1000 bootstrap replicates.

The sequences were phylogenetically classified as lineages A, B, C and D, and sublineages A1, A2, A3, B1, B2, C1, D1 and D2. The reference genomes used for this

classification were retrieved from PaVE: D90400 (A1), HQ537752 (A2), HQ537758 (A3), HQ537762 (B1), HQ537764 (B2), HQ537774 (C1), HQ537768 (D1) and HQ537770 (D2).

Other HPV58 isolate sequences with complete genome were obtained from the NCBI Variant Search link, which was available at PaVE (https://pave.niaid.nih.gov/explore/variants/variant_searches), and they were used in the phylogenetic analysis and displayed in the tree with their GenBank Accession Number.

2.4 Analysis of selective pressures

To evaluate the selective pressure that affects the HPV58 E7 oncogene, estimates of Maximum likelihood were analyzed using the CODEML, incorporated on PAML version 4.9c [Yang, 2007]. The detection of positive selection was performed through the calculation of six codon substitution models parameters, M0, M1, M2, M3, M7 and M8, which uses $\omega = dN/dS$. The basic model uses the $\omega = dN/dS$, that means the ratio of nonsynonymous/synonymous substitution rates; the branch models allow the ω ratio to vary among branches in the phylogeny and are useful for detecting positive selection acting on particular lineages [23,24]; and the site models allow the ω ratio to vary among sites (among codons or amino acids in the protein) [24,25]. The Likelihood Ratio Test (LRT) was used to evaluate which model best fits the data.

2.5 Predicted protein structure modeling

The 3D structure of the reference and mutated E7 protein of HPV58 was in silico modeled. The amino acid sequence of HPV 58 E7 reference protein (BAA31846) was used for the determination of its predicted 3D structure. A blast search was carried out in Protein Data Bank (PDB) using blastp algorithm for template selection. The template search for HPV58 E7 protein showed that there was only the C-terminal of the protein (PDB id: 2F8B) in PDB.

Therefore, the structure model of HPV58 E7 protein was predicted using a combined comparative and ab initio method in Robetta server [26]. The selected models were refined by energy minimization using the 3Drefine server [27]. The predicted models were evaluated by PROCHECK [28], MolProbity [29], QMEAN [30] and TM-align [31]. According to these parameters, the best model was chosen in order to assess the structural variability.

The non-synonymous mutations identified were inserted on the HPV58 E7 reference structure using the Point Mutation service in RosettaBackrub server [32]. The mutated models with the lowest weighted score were selected. The Site Directed Mutator (SDM) method [33] was used to predict the effect of mutations on HPV58 E7 protein structure stability.

2.6 T-cell and B-cell epitopes prediction

The prediction of T and B cell epitopes in the E7 HPV58 sequences was performed using ProPred-1 server (MHC class-I) [34] and ProPred server (MHC class-II) [35] and ABCpred server [36], respectively.

2.7 Plasmid constructs

After the analysis of variability in the E7 oncogene sequences (297 bp), three isolates (HPV58/UFPE-54S, HPV58/UFPE-58S and HPV58/UFPE-60M) were chosen because they are more epidemiologically relevant and present more non-synonymous alterations, belonging to variants A, C and D, respectively. These isolates/variants and the prototype (reference gene sequence without changes) of E7 HPV58 were amplified by PCR and cloned into the vector for PCR products (pGEM-T easy - Promega) following the manufacturer's instructions. Subsequently, they were subcloned into a pCDNA 3.1 (+) mammalian cell expression vector. Clones were subjected to automated sequencing using the ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 Ready Reaction (Applied Biosystems®) using the ABI Prism 3100 automated DNA sequencer (Applied Biosystem®).

2.8 Transfection of the C33A cells with recombinant expression vectors

After confirming the results by sequencing, the DNA of the recombinant vectors containing the variant sequences of the HPV58 E7 gene and the prototype were isolated by maxi-preparation using the Plasmid Plus Maxi kit (Qiagen) according to instructions. To evaluate the activity of the E7 oncogene using the NF- κ B pathway as a model of functionality through luminescence, it was made a co-transfection into keratinocytes resulting from cervical carcinoma (C33A). Transfections were performed in 6-well cell culture plates, where 5×10^5 cells were plated in 3 ml of culture Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM-Invitrogen®) plus 10% fetal bovine serum (Gibco®); 1% L-Glutamine (Sigma®) - Complete DMEM. Cells were transfected with the recombinant vector constructs using Polyfect transfection reagent (Qiagen). The groups of cells were transfected using the pcDNA3.1 (+) plasmid containing 1.5 μ g of the E7 variant, or the prototype (reference gene without any of the studied variations), or even with the empty pcDNA3.1 (+) vector (control negative). Furthermore, all cell groups were co-transfected with an NF- κ B dependent firefly luciferase reporter, which is constructed with three κ B factor binding sites being Named (kB) 3-Luc (1 μ g) (BCCMTM/LMBP, Gent, Belgium) and a plasmid expressing Renilla luciferase (1 ng) as a luminescence normalizer. After 24 hours of transfection, TNF α (10 ng/ml) was added to the plates for 6 hours to stimulate the pathway. All experiments were performed in three experimental replicates in triplicates. Luminescence measurement was performed by the Dual-Luciferase® Reporter Assay System according to the manufacturer's instructions. Relative Luciferase unit readings were performed on the GloMax® 96 Microplate Luminometer w/Dual Injectors (Promega).

2.9 Evaluation of E7 gene expression in transfected C33A cells

Total RNA was obtained from C33A cells transfected with expression vectors for the E7 variants evaluated in this study by the RNeasy mini kit (Qiagen). The cDNA was synthesized using the Improm® Reverse Transcription kit (Promega), according to the manufacturer's instructions. The qPCR reactions were performed using the QuantiTect SYBR Green® PCR kit (Qiagen) and the concentrations of primers and cDNA were the same as those described by LEITÃO et al. 2014. Normalization of gene expression adopted the reference genes GAPDH and ACT. The protocol for qPCR was: i) denaturation at 95°C for 5 min; ii) 40 cycles of denaturation at 95°C for 10 s, annealing at 55°C for 30 s (reference genes) or at 60°C (E7, prototype and variants), extension at 72°C for 30 s; iii) extension at 72°C for 10 min. Each reaction was performed in three biological replicates, including a negative control for each gene. Gene expression was calculated according to LIVAK; SCHMITTGEN, 2001[37].

2.10 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni correction post-test using GraphPad Prism software. $P < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1 HPV detection and typing

Among the 319 collected samples, 227 (71.2 %) were HPV positive. Thereafter the genotyping revealed that 55 (24.2%) samples were positive for HPV16, 36 (15.9%) were positive for HPV31 and 18 (7.9%) were positive for HPV58. Considering the 227 HPV positive samples, 59 samples present a coinfection with more than one HPV type: the results indicated that HPV16 + HPV31 was the most frequent (48, 20.8%), followed by HPV16 + HPV58 (6, 2.6%) and HPV16 + HPV31 + HPV58 (5, 2.2%).

The HPV58 samples were identified as HPV58/UFPE-58S, -30S, -31S, -54S, -88S, -60M, 59M, -1M, -29M, -35P, -45M, -79M, -92M, -28M, -28S and -48S. For these samples the pathological diagnosis was obtained as specified in Table 1. Only samples with a single HPV58 infection were selected for analysis. A total of two samples positive for HPV58 were excluded due to the absence of a pathological diagnosis.

Table 1. Pathological diagnosis of HPV58 positive samples.

Samples	Pathological diagnosis
HPV58/UFPE-58S	LSIL
HPV58/UFPE-30S	HSIL
HPV58/UFPE-31S	HSIL
HPV58/UFPE-54S	HSIL
HPV58/UFPE-88S	LSIL
HPV58/UFPE-60M	LSIL
HPV58/UFPE-59M	HSIL
HPV58/UFPE-1M	HSIL
HPV58/UFPE-29M	Without lesion
HPV58/UFPE-35P	Without lesion
HPV58/UFPE-45M	HSIL
HPV58/UFPE-79M	HSIL
HPV58/UFPE-92M	HSIL
HPV58/UFPE-28M	LSIL
HPV58/UFPE-28S	HSIL
HPV58/UFPE-48S	HSIL

LSIL: low-grade squamous intraepithelial lesion.

HSIL: high-grade squamous intraepithelial lesion

3.2. E7 HPV58 sequence

variations

All E7 variants showed nucleotide changes from the prototype, some resulting in codon and amino acid changes. The HPV58/UFPE-54S variant was pathologically classified and the other variants as LSIL.

Nucleotide sequences of the complete E7 oncogene were compared with the HPV58 reference sequence (D90400.1). The comparative analysis of E7 oncogene revealed that sixteen sequences (100%) presented 10 variable sites. Five mutations were missense at codons 41 (G41R), 63 (G63D), 64 (T64A), 74 (T74A) and 76 (D76E) (Table 2). The remaining five mutations were silent (Table 2). The sites that presented the most frequent mutations were 744 (100%, 16 of 16), 761 (93.8%, 15 of 16) and 694 (81.3%, 13 of 16). Other mutations

(silent mutations) were T756C (6.3%, 1 of 16), A763G (12.5%, 2 of 16), A793G (18.8%, 3 of 16), C798T (18.8%, 3 of 16), C801A (18.8%, 3 of 16), C840T (18.8%, 3 of 16) and T852C (6.3%, 1 of 16). Nucleotide substitutions resulting in premature stop codons or frameshift changes were not detected.

Table 2. Nucleotide and amino acid variability of HPV58 E7 region and the putative biological function affected. Conservative nucleotides with respect to the reference sequence (D90400.1) are marked with a dot (.). Reference: prototype sequence of HPV58.

Nt	E7									
	694	744	756	761	763	793	798	801	840	852
Reference	G	T	T	G	A	A	C	C	C	T
HPV58/UFPE-58S	.	G	.	.	.	G	T	A	T	C
HPV58/UFPE-30S	A	G	.	A	.	.	.	.	.	.
HPV58/UFPE-31S	A	G	.	A	.	.	.	.	.	.
HPV58/UFPE-54S	A	G	C	A	.	.	.	.	.	.
HPV58/UFPE-88S	A	G	.	A	.	.	.	.	.	.
HPV58/UFPE-60M	.	G	.	A	G	G	T	A	T	.
HPV58/UFPE-59M	A	G	.	A	.	.	.	.	.	.
HPV58/UFPE-1M	A	G	.	A	.	.	.	.	.	.
HPV58/UFPE-29M	A	G	.	A	.	.	.	.	.	.
HPV58/UFPE-35P	A	G	.	A	.	.	.	.	.	.
HPV58/UFPE-45M	A	G	.	A	.	.	.	.	.	.

HPV58/UFPE-79M	A	G	.	A	.	.	.	.	.	.
HPV58/UFPE-92M	A	G	.	A	.	.	.	.	.	.
HPV58/UFPE-28M	A	G	.	A	.	.	.	.	.	.
HPV58/UFPE-28S	.	G	.	A	G	G	T	A	T	.
HPV58/UFPE-48S	A	G	.	A	.	.	.	.	.	.
Reference amino acid	G			G	T	T		D		
Amino acid position	41			63	64	74		76		
Amino changed	R			D	A	A		E		

Nt: Nucleotide. T: threonine, D: Aspartic acid, E: glutamate, R: arginine, G: glycine, A: alanine.

3.3 Phylogenetic analysis

The evolutionary relationships among HPV58 E7 sequences were analyzed. The phylogenetic tree has shown a lineage and sublineage based clustering of the isolates, which groups HPV 58 E7 variants into four different lineages and eight sublineages (Figure 1). The phylogenetic tree presents well-supported clusters, making the HPV58 E7 variants genotyping possible. Thirteen isolates could be classified as sublineage A2, one as sublineage C1, and two as sublineage D2.

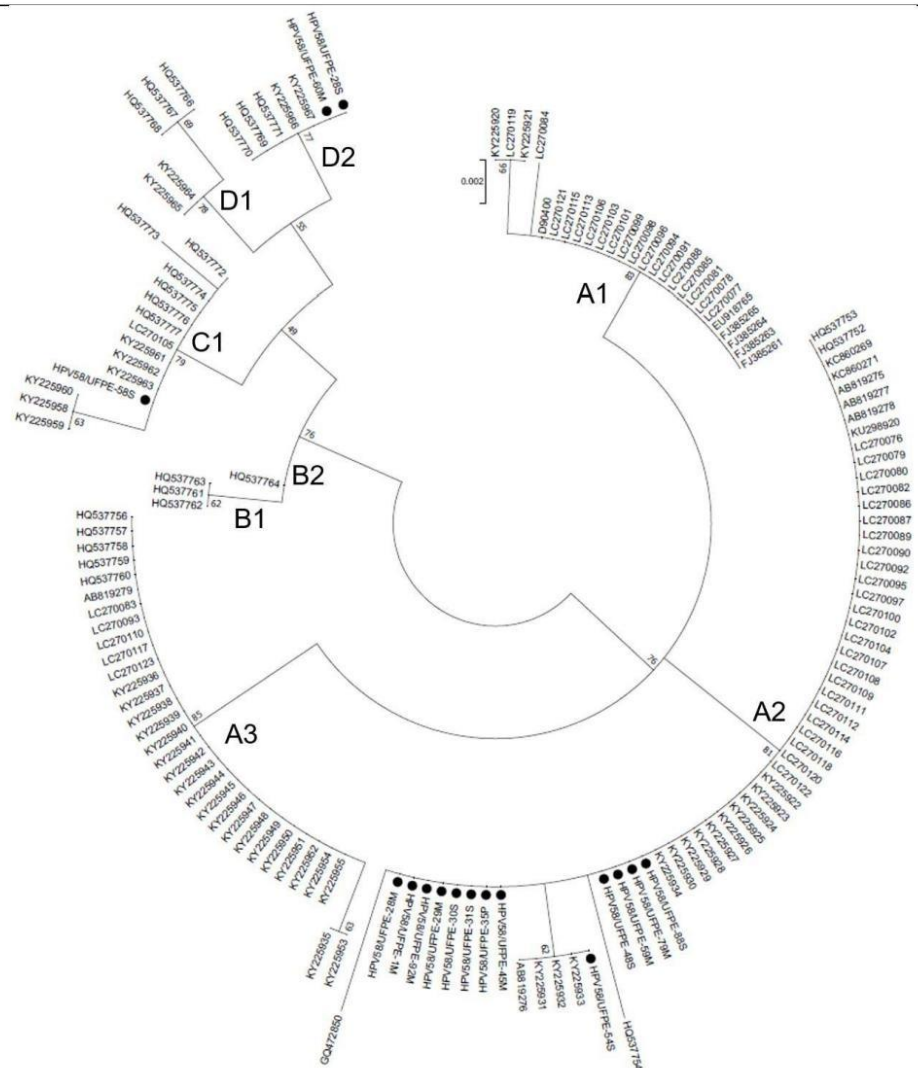


Figure 1. Midpoint-rooted Maximum Likelihood phylogenetic tree of HPV 58 strains based on E7 gene sequences. Four clusters were identified as lineages A, B, C and D, and eight sub-clusters are identified as sublineages. Bootstrap replicates are represented as branch support.

3.4 Selective pressure analysis

The genomic region that includes the E7 gene of HPV58 presented ω ratios less than 1, which indicates purifying selection, acting to conserve the protein function. The model that best fits the data is the one that shows higher values of log-likelihood (lnL). For this genomic region, the best model is the M3, with $\omega = 0.87940$ (Supplementary Table S1). Although the genomic region E7 of HPV58 presented negative or purifying selection, the LRT test indicated the presence of positively (diversifying) selected protein sites, which represents mutations with high probability of being fixed in the viral population (Table 3). In total, five positively selected sites were identified, 41G, 63G, 64T, 74T and 76D. Of these, four sites (41G, 63G, 74T and 76D) were identified to be positively selected with statistical significance ($P > 95\%$ and $P > 99\%$) (Table 3).

Table 3. LRT test results for the detection of sites under positive (diversifying) selection. Values in between parenthesis indicate the posterior probability of the site to be positively selected. * indicates $P > 95\%$, and ** indicates $P > 99\%$.

Model 1	Model 2	LRT	Positively selected sites
M0	M3	48.63069	-
M1	M2	31.954069	41G (0.979*) 63G (1.000**) 64T (0.826) 74T (0.976*) 76D (0.997**)
M1	M3	31.954662	41G (0.997**) 63G (1.000**) 64T (0.893) 74T (0.997**) 76D (1.000**)
M7	M8	32.308663	41G (0.987*) 63G (1.000**) 64T (0.857) 74T (0.985*) 76D (0.999**)

3.5 Structural analysis of E7 mutations

The E7 protein was modelled based on a hybrid method, the C-terminal with a comparative method and the A-terminal with an ab initio method. The best HPV58 E7 protein model presented 92.9% residues in most favored regions in the Ramachandran plot, MolProbity Score of 0.79, QMEAN score of -1.16, and TM-align score of 0.61714, which represents a well-resolved structure model. All these quality parameters confirm the reliability of the protein structure models.

The HPV58 E7 structure has a total of 98 amino acid residues, with one zinc-binding domain, consisting of two CXXC motifs separated by 29 amino acid residues. The protein structure presents four alpha helix domains and two beta sheet domains, connected with loop regions (Figure 2). The motif 22LXCXE26 consists in part of an alpha helix and a loop region. No non-synonymous mutations found in this study affect directly these motifs. However, two non-synonymous mutations (G63D and T64A) are located in the loop region right after one CXXC motif (Figure 2). The mutation G41R is located in the second alpha helix region, and the mutations T74A and D76E are located in the third alpha helix. Evaluating the impact of these mutations on the protein stability for the HPV58 E7 protein, we observed that the mutations G41R, G63D and T64A presented negative predicted values of $\Delta\Delta G$, leading to protein instability and malfunction (Table 4).

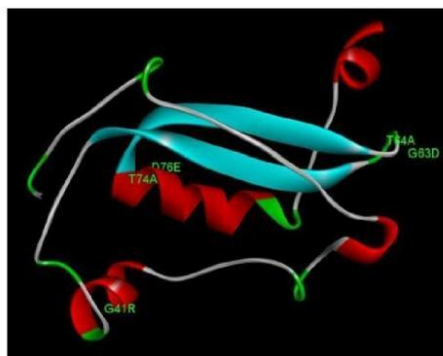


Figure 2. Representation of HPV58 E7 protein model as displayed in Discovery Studio Visualizer. Non-synonymous mutations found in this study are represented in the structure. Four alpha helices are represented in red, beta sheets in blue, and loops in gray and green.

Table 4. Predicted impact of mutations on the structural stability of HPV58 E7 protein, as determined by Site Directed Mutator. Positive values of $\Delta\Delta G$ are associated with increased protein stability. Negative values of $\Delta\Delta G$ are associated with decreased protein stability.

Protein	Mutation	Predicted $\Delta\Delta G$	Outcome
E7	G41R	-0.14	Reduced stability
	G63D	-2.48	Reduced stability
	T64A	-0.12	Reduced stability
	T74A	1.26	Increased stability
	D76E	1.25	Increased stability

3.6 T-cell and B-cell epitopes prediction

We performed B-cell epitope predictions in order to evaluate the impact of these mutations on the immune function of the E7 transforming protein. We observed amino acid changes in sites belonging to T-cell (MHC class-I and class-II) and/or B-cell epitopes as reported in Figure 3 which shows the consensus of T-cell and B-cell epitopes obtained for E7 oncoproteins.

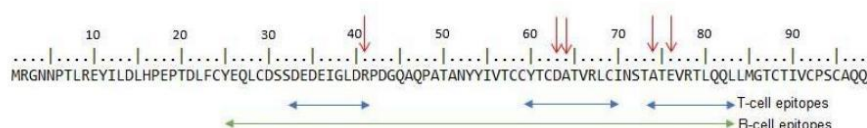


Figure 3. Predicted T-cell and B-cell epitopes. Epitopes within the E7 oncoprotein of HPV58 variants. In blue, a consensus of the predicted T-cell epitopes. In green, a consensus of the predicted B-cell epitopes. Red arrows indicate mutations sites presented in E7 HPV58 isolates

3.7 Effect of E7 polymorphic variants on the NF- κ B pathway

The functional study of the HPV-58 E7 oncogene variants were developed using luminescence assays having the NF- κ B pathway as a model. Initially, the effect on NF- κ B activity of the E7 prototype both HPV-16 and HPV-58 was evaluated (Figure 4A and 4B). The results obtained he showed that the E7 prototype of HPV-16 reduced NF- κ B activity the action of each variants on NF- κ B activity was verify (Figure 4C). The results showed that all variants induced NF- κ B compared to the empty vector. However, when compared to the E7 HPV-58 prototype, the 58S and 60M variants were similar NF- κ B induction compared to the E7 prototype. with the E7 prototype of HPV-58 The studied variants were transfected and their effects on the NF- κ B pathway were compared with those found in cells expressing the HPV-58 reference E7 (prototype). The difference between the means of the analyzed groups was significant with P-value: 0.0046. However, there was no statistically significant result when comparing the prototype with each variant. Now, the comparisons between pcDNA and the prototype, as well as pcDNA and the HPV58/UFPE-54S variant, were significant with P-value: 0.001 for all comparisons.

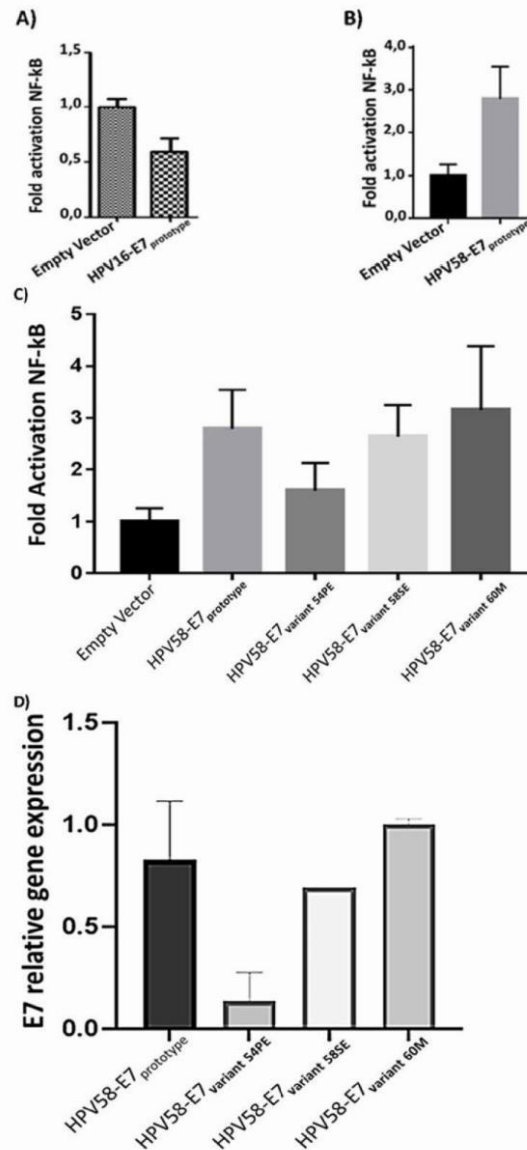


Figure 4. Effect of the E7 oncoprotein from HPV 16 (A) and HPV 58 (B) on NF- κ B activity. The E7 oncoprotein from HPV16 reduces NF- κ B activity, while the E7 from HPV58 increases it. (C) Effect of the HPV58 prototype and variants on NF- κ B activity. The 58S and 60M variants do not exhibit a statistically significant difference compared to the prototype. However, the 54S variant, while lacking statistical significance, appears to demonstrate a lower activity in the NF- κ B pathway. (D) Comparison of gene expression among different HPV58 variants and the prototype. While the 58S and 60M variants did not exhibit a significant difference in expression compared to the prototype, the 54S variant showed a notably reduced expression level.

3.8. E7 oncoprotein gene expression in C33A transfected cells with HPV-58 E7 variants

The reduction in NF- κ B activity caused by the E7-54S variant could be due to a low amount of E7 mRNA. In this way, the E7 expression levels of the different variants were evaluated (Figure 4D). The results showed that the relative expression levels of the HPV58/E7- prototype. However, the relative expression level of the 54S variant was significantly lower than HPV58/e7-prototype. Therefore, this result indicates that the low NF- κ B activity presented by the HPV58/E7-54S variants may be due to a low mRNA availability.

4. Discussion

Cervical cancer is a serious public health issue and it is strongly linked to high-risk HPVs infections [1]. In Brazil, HPVs 16, 31 and 58 are the most prevalent high-risk subtypes [2]. E7 is considered one of the main oncogenes and nucleotide variations in this oncogene play a crucial function in cervical cancer due to their ability to induce cellular transformation and immortalization [38]. Studies have investigated HPV16 E7 variants [39,40], however the HPV58 E7 variant, which is considered as a high-risk oncogenic type, have been scarcely studied in Brazil.

Therefore, our study has investigated sequence variations of HPV58 E7 oncogene in cervical scraping samples from Brazilian women to evaluate their structural effects in order to identify the possible impact of these mutations in the carcinogenic process.

In this study, nucleotide changes previously described in HPV58 E7 oncogene were detected at positions G694A [41–43], T744G [40–42,44], T756C [40], G761A [40–42,44], A763G [7], A793G, C798T, C801A, C840T and T852C [41,45].

From the phylogenetic point of view, HPV lineages have been associated with different risks for cervical cancer development as observed for some HPV16 lineages [46–48]. With respect to HPV58 phylogeny, sequence variants are associated with the risk for CIN3 (cervical intraepithelial neoplasia grade 3) and invasive cervical cancer [7]. HPV58 consists of four variant lineages (A, B, C, and D) and eight sublineages (A1, A2, A3, B1, B2, C, D1, and D2) [49]. In this study, our analysis on the E7 sequences of HPV58 variants identified the presence of the sublineages A2 (the majority), C1 and D2. It is important to point out that the lineage determination of HPV rely on complete genome sequences and a possible bias might occur. Therefore, in order to confirm the lineage classification in this study, a complete genome sequence comparison and phylogenetic analysis were performed with the reference HPV58 complete genome sequences. Once the lineage classification was confirmed for the reference genome sequences, the phylogenetic analysis performed with the E7 gene sequences (Figure 1) showed a similar topology, which indicates the probable lineage of the isolates.

In a study performed by Chan et al. (2011) an association between oncogenic risk and variant lineage was analysed. Lineage A represented the majority of HSIL/carcinoma samples, however there was no significant association [50]. In the present study, most of the A2 line is represented by HSIL samples. Nevertheless, further studies are necessary to evaluate the association of variant lineages and cancer cervical risk.

The analysis indicated that the variant E7 genomic region of HPV58 presented negative or purifying selection. However, evolutionary diversifying selected amino acid residues have been identified in this study. The diversifying selection is associated with mutations with high probability of being fixed in the viral population, being related to the host adaptive response [51]. In this study, we have identified four non-synonymous mutations under diversifying selection in E7 protein: 41G, 63G, 74T and 76D. These mutations are consistently being found in other studies worldwide, which highlights their evolutionary relevance for the virus [52][42,53]. Although more experimental evidences must be found, these findings are relevant because these mutations might be related to adaptation to the human host, increasing the ability of these oncoproteins to interact with the host proteins.

It is widely known that the E7 gene interact with various biological pathways and plays an important role in oncogenesis [54–56]. Therefore, genetics variants of E7 may exert impacts in these pathways both by altering protein-protein interaction than affect their stability [57,58]. Some studies showed that E7 oncogene variants suppressed the activity of the NF- κ B pathway [59,60]. The HPV16 E7 protein interferes with NF- κ B signaling, interacting directly with the IKK α and IKK β subunits, causing a reduction in the activity related to NF- κ B signaling in U2OS cells [60]. Even under TNF- α cytokine stimulation, U2OS cells transfected with the HPV-16 E7 gene were less responsive, exhibiting attenuated NF- κ B signaling [61].

In a study by Silva et al. (2020), which evaluated the activity of the NF- κ B pathway mediated by variants of the E5 HPV-31 gene, it was reported that all variants increased activity of the pathway [62]. Nucleotide variations present in the HPV E7 oncogene play an important role in the development of cervical cancer, this is due to its ability to inactivate products of important tumor suppressor genes, such as pRb. and malignant transformation of virus-infected cells [63]. The NF- κ B pathway and its activation are a frequent event in squamous cell carcinoma, as well as important evidence of epithelial cell modification [64]. Several studies have been carried out investigating variants of HPV 16 E5, for example [65–67], while variants of HPV 58 E7 are poorly studied, although HPV 58 is part of the high-risk group of HPVs and is a very prevalent type in some countries of the world, including some regions of Brazil.

In this study, the E7 prototype was shown to activate the pathway in about 2x when compared to pcDNA. Albeit all the tested variants activate the NF- κ B pathways, we observed that the HPV58/UFPE-54S variant seems exhibit a decreased level of activation in comparison to prototype and the other tested variants. It is likely that this difference is due to the lower E7 expression observed in HPV58/UFPE-54S compared both prototype and the other tested variants. Although we did not test the stability, bioavailability, or decay rate of the analyzed variant sequences, it is possible that this reduced expression level may be attributed to some of these mechanisms [68–70].

Furthermore, in the structural analysis for E7, LXCXE motif is known to be related with the interaction of E7 with pRB. However, the non-synonymous mutations detected in this study did not alter the LXCXE motif. Two mutations (G63D and T64A) are located in the loop right after the CXXC motif, an important zinc-binding motif. G63D has been reported to have a significantly lower risk association with cervical neoplasia [7]. Other mutations detected in this study (G41R, T74A and D76E) are located in the second and third α helices, respectively. In a previous study, G63D and G41R have been reported to show a significantly lower risk association with cervical neoplasia [7]. Moreover, the mutations G41R, G63D and T64A in E7 presented were predicted to lead to protein instability and malfunction. Interestingly, the variant with below NF- κ B activation (HPV58/UFPE-54S) exhibits two mutations that lead to decreased stability (G41R, G63D).

To the best of our knowledge, this is the first time that these mutations have been structurally characterized. However, the impact of these mutations on the interaction of these HPV oncoprotein and host molecules still needs to be assessed in further experimental studies.

5. Conclusions

In this study, nucleotide changes previously described in HPV58 oncogene E7 were detected. It was observed that these alterations may alter the molecular interaction between viral oncoproteins and host proteins. These amino acid changes in the HPV58 E7 oncoprotein may influence the immune recognition of cells infected by HPV. However, further studies are needed in order to confirm the relationship between these changes and the risk of cervical cancer. The interaction of the E7 oncogene with NF- κ B signaling provides important information for a better understanding of how variants can interfere in the carcinogenesis process.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: www.mdpi.com/xxx/s1, Figure S1: title; Table S1: title; Video S1: title.

Author Contributions: Bárbara S Chagas and Elias T Júnior carried out the main axis of the experiments. Bárbara S Chagas and Ruany C O Silva wrote the manuscript; Ruany C O Silva, Marconi R Barros Junior, Rita C P Lima and Antônio H P Silva Júnior participated in some of the experiments; Maria C V Invenção and Pedro L F Neto contributes with final revision of this manuscript, Jacinto C Silva Neto gave support in obtaining biological samples; Marcus V A Batistaperformed all bioinformatics analysis and was responsible for by the final revision of this manuscript; Antonio C Freitas was responsible for experimental design, supervision of all experimental steps, and by the final revision of this manuscript.

Funding: This research was funded by Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE/PRONEM - APQ-0562-2.02/14; FACEPE/PPSUS - APQ-0748-2.02/17), FAPITEC/SE (00941/2018-5), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ 401202/2020-8; CNPq 401305/2014-7; CNPq 447978/2014-4), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Estágio Pós-Doutoral do Programa Nacional de PósDoutorado/Capes – PNPD/CAPES 2020-2021 – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia; CAPES 23038.010050/2013-04; CNPq Bolsa de Produtividade 2020-2023).

Data Availability Statement:

Acknowledgments:

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- zur Hausen, H. Papillomaviruses in the Causation of Human Cancers - a Brief Historical Account. *Virology* **2009**, *384*, 260–265, doi:10.1016/j.virol.2008.11.046.
- Raiol, T.; Wyant, P.S.; de Amorim, R.M.S.; Cerqueira, D.M.; Milanezi, N. von G.; Brígido, M. de M.; Sichero, L.; Martins, C.R.F. Genetic Variability and Phylogeny of the High-Risk {HPV}-31, -33, -35, -52, and -58 in Central {Brazil}. *J. Med. Virol.* **2009**, *81*, 685–692, doi:10.1002/jmv.21432.
- Arbyn, M.; Weiderpass, E.; Bruni, L.; de Sanjosé, S.; Saraiya, M.; Ferlay, J.; Bray, F. Estimates of Incidence and Mortality of Cervical Cancer in 2018: A Worldwide Analysis. *Lancet. Glob. Heal.* **2020**, *8*, e191–e203, doi:10.1016/S2214-109X(19)30482-6.
- Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global Cancer Statistics 2018: {GLOBOCAN} Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 394–424, doi:10.3322/caac.21492.
- Gurgel, A.P.A.D.; Chagas, B.S.; do Amaral, C.M.; Nascimento, K.C.G.; Leal, L.R.S.; Silva Neto, J. da 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 {HPV16}, {HPV31}, and {HPV58} Found in {North}-{East} {Brazil}. *Biomed Res. Int.* **2015**, *2015*, 130828, doi:10.1155/2015/130828.
- Fernandes, J.; Carvalho, M.; de Fernandes, T.; Araújo, J.; Azevedo, P.; Azevedo, J.; Meissner, R. Prevalence of Human Papillomavirus Type 58 in Women with or without Cervical Lesions in Northeast {Brazil}. *Ann. Med. Health Sci. Res.* **2013**, *3*, 504–510, doi:10.4103/2141-9248.122060.
- Chan, P.K.S.; Zhang, C.; Park, J.-S.; Smith-McCune, K.K.; Palefsky, J.M.; Giovannelli, L.; Coutlée, F.; Hibbitts, S.; Konno, R.; Settheetham-Ishida, W.; et al. Geographical Distribution and Oncogenic Risk Association of Human Papillomavirus Type 58 {E6} and {E7} Sequence Variations. *Int. J. Cancer* **2013**, *132*, 2528–2536, doi:10.1002/ijc.27932.
- Chagas, B.S.; Batista, M.V.A.; Guimarães, V.; Balbino, V.Q.; Crovella, S.; Freitas, A.C. New Variants of {E6} and {E7} Oncogenes of Human Papillomavirus Type 31 Identified in {Northeastern} {Brazil}. *Gynecol. Oncol.* **2011**, *123*, 284–288, doi:10.1016/j.ygyno.2011.07.008.
- Boon, S.S.; Xia, C.; Lim, J.Y.; Chen, Z.; Law, P.T.Y.; Yeung, A.C.M.; Thomas, M.; Banks, L.; Chan, P.K.S. Human {Papillomavirus} 58 {E7} {T201}/{G63S} {Variant} {Isolated} from an {East} {Asian} {Population} {Possesses} {High} {Oncogenicity}. *J. Virol.* **2020**, *94*, e00090–20, doi:10.1128/JVI.00090-20.
- Xi, L.F.; Koutsky, L.A.; Hildesheim, A.; Galloway, D.A.; Wheeler, C.M.; Winer, R.L.; Ho, J.; Kiviat, N.B. Risk for High-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia Associated with Variants of Human Papillomavirus Types 16 and 18. *Cancer Epidemiol. Biomarkers & Prev. A Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored by Am. Soc. Prev. Oncol.* **2007**, *16*, 4–10, doi:10.1158/10559965.EPI-06-0670.
- De Boer, M.A.; Peters, L.A.W.; Aziz, M.F.; Siregar, B.; Cornain, S.; Vrede, M.A.; Jordanova, E.S.; Fleuren, G.J. Human Papillomavirus Type 18 Variants: Histopathology and {E6}/{E7} Polymorphisms in Three Countries. *Int. J. Cancer* **2005**, *114*, 422–425, doi:10.1002/ijc.20727.
- Law, P.T.; Boon, S.S.; Hu, C.; Lung, R.W.; Cheung, G.P.; Ho, W.C.; Chen, Z.; Massimi, P.; Thomas, M.; Pim, D.; et al. Oncogenic Comparison of Human Papillomavirus Type 58 {E7} Variants. *J. Cell. Mol. Med.* **2019**, *23*, 1517–1527, doi:10.1111/jcmm.14059.
- Ding, T.; Wang, X.; Ye, F.; Cheng, X.; Lu, W.; Xie, X. Distribution of Human Papillomavirus 16 {E6}/{E7} Variants in Cervical Cancer and Intraepithelial Neoplasia in {Chinese} Women. *Int. J. Gynecol. Cancer Off. J. Int. Gynecol. Cancer Soc.* **2010**, *20*, 1391–1398, doi:10.1111/IGC.0b013e3181eced04.

14. He, J.; Yang, Y.; Chen, Z.; Liu, Y.; Bao, S.; Zhao, Y.; Ding, X. Identification of Variants and Therapeutic Epitopes in [HPV]33/[HPV]-58 [E6] and [E7] in [Southwest] [China]. *Viol. J.* **2019**, *16*, 72, doi:10.1186/s12985-019-1168-y.
15. Barros, M.R.; de Oliveira, T.H.A.; de Melo, C.M.L.; Venuti, A.; de Freitas, A.C. Viral [Modulation] of [TLRs] and [Cytokines] and the [Related] [Immunotherapies] for [HPV]-[Associated] [Cancers]. *J. Immunol. Res.* **2018**, *2018*, 2912671, doi:10.1155/2018/2912671.
16. Barros, M.R.; de Melo, C.M.L.; Barros, M.L.C.M.G.R.; de Cássia Pereira de Lima, R.; de Freitas, A.C.; Venuti, A. Activities of Stromal and Immune Cells in [HPV]-Related Cancers. *J. Exp. & Clin. cancer Res. CR* **2018**, *37*, 137, doi:10.1186/s13046-0180802-7.
17. de Freitas, A.C.; Gurgel, A.P.A.D.; Chagas, B.S.; Coimbra, E.C.; do Amaral, C.M.M. Susceptibility to Cervical Cancer: An Overview. *Gynecol. Oncol.* **2012**, *126*, 304–311, doi:10.1016/j.ygyno.2012.03.047.
18. Staden, R. The [Staden] Sequence Analysis Package. *Mol. Biotechnol.* **1996**, *5*, 233–241, doi:10.1007/BF02900361.
19. Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 403–410, doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
20. Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. [MEGA7]: [Molecular] [Evolutionary] [Genetics] [Analysis] [Version] 7.0 for [Bigger] [Datasets]. *Mol. Biol. Evol.* **2016**, *33*, 1870–1874, doi:10.1093/molbev/msw054.
21. Tamura, K.; Stecher, G.; Kumar, S. [MEGA11]: [Molecular] [Evolutionary] [Genetics] [Analysis] [Version] 11. *Mol. Biol. Evol.* **2021**, *38*, 3022–3027, doi:10.1093/molbev/msab120.
22. Darriba, D.; Taboada, G.L.; Doallo, R.; Posada, D. [jModelTest] 2: More Models, New Heuristics and Parallel Computing. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 772, doi:10.1038/nmeth.2109.
23. Yang, Z. Likelihood Ratio Tests for Detecting Positive Selection and Application to Primate Lysozyme Evolution. *Mol. Biol. Evol.* **1998**, *15*, 568–573, doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a025957.
24. Yang, Z.; Nielsen, R. Synonymous and Nonsynonymous Rate Variation in Nuclear Genes of Mammals. *J. Mol. Evol.* **1998**, *46*, 409–418, doi:10.1007/pl00006320.
25. Yang, Z. Complexity of the Simplest Phylogenetic Estimation Problem. *Proceedings. Biol. Sci.* **2000**, *267*, 109–116, doi:10.1098/rspb.2000.0974.
26. Kim, D.E.; Chivian, D.; Baker, D. Protein Structure Prediction and Analysis Using the [Robetta] Server. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, W526–531, doi:10.1093/nar/gkh468.
27. Bhattacharya, D.; Nowotny, J.; Cao, R.; Cheng, J. [3Drefine]: An Interactive Web Server for Efficient Protein Structure Refinement. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, W406–409, doi:10.1093/nar/gkw336.
28. Laskowski, R.A.; MacArthur, M.W.; Moss, D.S.; Thornton, J.M. [PROCHECK]: A Program to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures. *J. Appl. Crystallogr.* **1993**, *26*, 283–291, doi:10.1107/S0021889892009944.
29. Chen, V.B.; Arendall, W.B.; Headd, J.J.; Keedy, D.A.; Immormino, R.M.; Kapral, G.J.; Murray, L.W.; Richardson, J.S.; Richardson, D.C. [MolProbity]: All-Atom Structure Validation for Macromolecular Crystallography. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 12–21, doi:10.1107/S0907444909042073.
30. Benkert, P.; Biasini, M.; Schwede, T. Toward the Estimation of the Absolute Quality of Individual Protein Structure Models. *Bioinformatics* **2011**, *27*, 343–350, doi:10.1093/bioinformatics/btq662.
31. Zhang, Y.; Skolnick, J. [TM]-Align: A Protein Structure Alignment Algorithm Based on the [TM]-Score. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 2302–2309, doi:10.1093/nar/gki524.
32. Lauck, F.; Smith, C.A.; Friedland, G.F.; Humphris, E.L.; Kortemme, T. [RosettaBackrub]—a Web Server for Flexible Backbone Protein Structure Modeling and Design. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, W569–575, doi:10.1093/nar/gkq369.
33. Worth, C.L.; Preissner, R.; Blundell, T.L. [SDM]—a Server for Predicting Effects of Mutations on Protein Stability and Malfunction. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, W215–222, doi:10.1093/nar/gkr363.
34. Singh, H.; Raghava, G.P.S. [ProPred1]: Prediction of Promiscuous [MHC] [Class]-[I] Binding Sites. *Bioinformatics* **2003**, *19*, 1009–1014, doi:10.1093/bioinformatics/btg108.
35. Singh, H.; Raghava, G.P. [ProPred]: Prediction of [HLA]-[DR] Binding Sites. *Bioinformatics* **2001**, *17*, 1236–1237, doi:10.1093/bioinformatics/17.12.1236.
36. Saha, S.; Raghava, G.P.S. [AlgPred]: Prediction of Allergenic Proteins and Mapping of [IgE] Epitopes. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, W202–209, doi:10.1093/nar/gkl343.
37. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408, doi:10.1006/meth.2001.1262.
38. Roman, A.; Munger, K. The Papillomavirus [E7] Proteins. *Virology* **2013**, *445*, 138–168, doi:10.1016/j.virol.2013.04.013.
39. Ramas, V.; Mirazo, S.; Bonilla, S.; Ruchansky, D.; Arbiza, J. Analysis of Human Papillomavirus 16 [E6], [E7] Genes and [Long] [Control] [Region] in Cervical Samples from [Uruguayan] Women. *Gene* **2018**, *654*, 103–109, doi:10.1016/j.gene.2018.02.023.
40. Yu, J.-H.; Shi, W.-W.; Zhou, M.-Y.; Liu, J.-M.; Han, Q.-Y.; Xu, H.-H. Genetic Variability and Oncogenic Risk Association of Human Papillomavirus Type 58 [E6] and [E7] Genes in [Taizhou] Area, [China]. *Gene* **2019**, *686*, 171–176, doi:10.1016/j.gene.2018.11.066.
41. Molano, M.; Buitrago, O.; Moreno-Acosta, P.; Garland, S.M.; Morales, N.; Huertas, A.; Martinez, T.; Gamboa, O.; Tabrizi, S.N.; Cornell, A.; et al. Follow-up Study of [HPV58] Variants in Women with Incident [HPV58] Infection from a [Colombian] Cohort. *Oncol. Lett.* **2018**, *16*, 2511–2516, doi:10.3892/ol.2018.8928.
42. Xi, J.; Chen, J.; Xu, M.; Yang, H.; Wen, S.; Pan, Y.; Wang, X.; Ye, C.; Qiu, L.; Sun, Q. The Polymorphisms of [LCR], [E6], and [E7] of [HPV]-58 Isolates in [Yunnan], [Southwest] [China]. *Viol. J.* **2018**, *15*, 76, doi:10.1186/s12985-018-0986-7.

43. Zhou, Z.; Yang, H.; Yang, L.; Yao, Y.; Dai, S.; Shi, L.; Li, C.; Yang, L.; Yan, Z.; Yao, Y. Human Papillomavirus Type 16 [E6] and [E7] Gene Variations Associated with Cervical Cancer in a [Han] [Chinese] Population. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* **2019**, *73*, 13–20, doi:10.1016/j.meegid.2019.04.008.
44. Conde-Ferraz, L.; Pacheco-Arjona, R.; Novelo Canul, C.; Gomez-Carballo, J.; Ramirez-Prado, J.H.; Ayora-Talavera, G.; González-Losa, M.D.R. Genetic [Variability] in [E6] and [E7] [Oncogenes] from [Human] [Papillomavirus] [Type] 58 in [Mexican] [Women]. *Intervirology* **2017**, *60*, 235–246, doi:10.1159/000489306.
45. Tenjimbayashi, Y.; Onuki, M.; Hirose, Y.; Mori, S.; Ishii, Y.; Takeuchi, T.; Tasaka, N.; Satoh, T.; Morisada, T.; Iwata, T.; et al. Whole-Genome Analysis of Human Papillomavirus Genotypes 52 and 58 Isolated from [Japanese] Women with Cervical Intraepithelial Neoplasia and Invasive Cervical Cancer. *Infect. Agent. Cancer* **2017**, *12*, 44, doi:10.1186/s13027-017-0155-4.
46. Berumen, J.; Ordoñez, R.M.; Lazcano, E.; Salmeron, J.; Galvan, S.C.; Estrada, R.A.; Yunes, E.; Garcia-Carranca, A.; Gonzalez-Lira, G.; la Campa, A. Asian-[American] Variants of Human Papillomavirus 16 and Risk for Cervical Cancer: A Case-Control Study. *J. Natl. Cancer Inst.* **2001**, *93*, 1325–1330, doi:10.1093/jnci/93.17.1325.
47. Zuna, R.E.; Moore, W.E.; Shanesmith, R.P.; Dunn, S.T.; Wang, S.S.; Schiffman, M.; Blakey, G.L.; Teel, T. Association of [HPV16] [E6] Variants with Diagnostic Severity in Cervical Cytology Samples of 354 Women in a [US] Population. *Int. J. Cancer* **2009**, *125*, 2609–2613, doi:10.1002/ijc.24706.
48. Cornet, I.; Gheit, T.; Iannacone, M.R.; Vignat, J.; Sylla, B.S.; Del Mistro, A.; Franceschi, S.; Tommasino, M.; Clifford, G.M. [HPV16] Genetic Variation and the Development of Cervical Cancer Worldwide. *Br. J. Cancer* **2013**, *108*, 240–244, doi:10.1038/bjc.2012.508.
49. Burk, R.D.; Harari, A.; Chen, Z. Human Papillomavirus Genome Variants. *Virology* **2013**, *445*, 232–243, doi:10.1016/j.virol.2013.07.018.
50. Chan, P.K.S.; Luk, A.C.S.; Park, J.-S.; Smith-McCune, K.K.; Palefsky, J.M.; Konno, R.; Giovannelli, L.; Coutlée, F.; Hibbitts, S.; Chu, T.-Y.; et al. Identification of Human Papillomavirus Type 58 Lineages and the Distribution Worldwide. *J. Infect. Dis.* **2011**, *203*, 1565–1573, doi:10.1093/infdis/jir157.
51. Dearlove, B.; Lewitus, E.; Bai, H.; Li, Y.; Reeves, D.B.; Joyce, M.G.; Scott, P.T.; Amare, M.F.; Vasan, S.; Michael, N.L.; et al. A [SARS]-[CoV]-2 Vaccine Candidate Would Likely Match All Currently Circulating Variants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2020**, *117*, 23652–23662, doi:10.1073/pnas.2008281117.
52. Bao, E.L.; Cheng, A.N.; Sankaran, V.G. The Genetics of Human Hematopoiesis and Its Disruption in Disease. *EMBO Mol. Med.* **2019**, *11*, 1–13, doi:10.15252/emmm.201910316.
53. Yang, Z.; Zhang, C.; Luo, P.; Ye, M.; Gong, Q.; Mei, B. Genetic Variability of [E6] and [E7] Genes of Human Papillomavirus Type 58 in [Jingzhou], [Hubei] [Province] of Central [China]. *Virol. J.* **2022**, *19*, 71, doi:10.1186/s12985-022-01801-6.
54. Bodily, J.M.; Mehta, K.P.M.; Laimins, L.A. Human Papillomavirus [E7] Enhances Hypoxia-Inducible Factor 1-Mediated Transcription by Inhibiting Binding of Histone Deacetylases. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 1187–1195, doi:10.1158/0008-5472.CAN-102626.
55. Honegger, A.; Schilling, D.; Bastian, S.; Sponagel, J.; Kuryshv, V.; Sülmann, H.; Scheffner, M.; Hoppe-Seyler, K.; Hoppe-Seyler, F. Dependence of Intracellular and Exosomal [microRNAs] on Viral [E6]/[E7] Oncogene Expression in [HPV]-Positive Tumor Cells. *PLoS Pathog.* **2015**, *11*, e1004712, doi:10.1371/journal.ppat.1004712.
56. White, E.A.; Sowa, M.E.; Tan, M.J.A.; Jeudy, S.; Hayes, S.D.; Santha, S.; Münger, K.; Harper, J.W.; Howley, P.M. Systematic Identification of Interactions between Host Cell Proteins and [E7] Oncoproteins from Diverse Human Papillomaviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, E260–267, doi:10.1073/pnas.1116776109.
57. Lou, H.; Boland, J.F.; Li, H.; Burk, R.; Yeager, M.; Anderson, S.K.; Wentzensen, N.; Schiffman, M.; Mirabello, L.; Dean, M. [HPV16] [E7] [Nucleotide] [Variants] [Found] in [Cancer]-[Free] [Subjects] [Affect] [E7] [Protein] [Expression] and [Transformation]. *Cancers (Basel)*. **2022**, *14*, 4895, doi:10.3390/cancers14194895.
58. Nunes, E.M.; Talpe-Nunes, V.; Sobrinho, J.S.; Ferreira, S.; Lino, V. de S.; Termini, L.; Silva, G.Á.F.; Boccardo, E.; Villa, L.L.; Sichero, L. E6/[E7] [Functional] [Differences] among [Two] [Natural] [Human] [Papillomavirus] 18 [Variants] in [Human] [Keratinocytes]. *Viruses* **2021**, *13*, 1114, doi:10.3390/v13061114.
59. Vandermark, E.R.; Deluca, K.A.; Gardner, C.R.; Marker, D.F.; Schreiner, C.N.; Strickland, D.A.; Wilton, K.M.; Mondal, S.; Woodworth, C.D. Human Papillomavirus Type 16 [E6] and [E7] 7 Proteins Alter [NF]-[kB] in Cultured Cervical Epithelial Cells and Inhibition of [NF]-[kB] Promotes Cell Growth and Immortalization. *Virology* **2012**, *425*, 53–60, doi:10.1016/j.virol.2011.12.023.
60. Spitkovsky, D.; Hehner, S.P.; Hofmann, T.G.; Möller, A.; Schmitz, M.L. The Human Papillomavirus Oncoprotein [E7] Attenuates [NF]-[Kappa] [B] Activation by Targeting the [Ikappa] [B] Kinase Complex. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 25576–25582, doi:10.1074/jbc.M201884200.
61. Byg, L.M.; Vidlund, J.; Vasiljevic, N.; Clausen, D.; Forslund, O.; Norrild, B. [NF]-[K] [B] Signalling Is Attenuated by the [E7] Protein from Cutaneous Human Papillomaviruses. *Virus Res.* **2012**, *169*, 48–53, doi:10.1016/j.virusres.2012.06.028.
62. Silva, R.C. de O.; da Silva Júnior, A.H.P.; Gurgel, A.P.A.D.; Barros Junior, M.R.; Santos, D.L.; de Lima, R. de C.P.; Batista, M.V.A.; Pena, L.J.; Chagas, B.S.; Freitas, A.C. Structural and Functional Impacts of [E5] Genetic Variants of Human Papillomavirus Type 31. *Virus Res.* **2020**, *290*, 198143, doi:10.1016/j.virusres.2020.198143.
63. McLaughlin-Drubin, M.E.; Münger, K. Oncogenic Activities of Human Papillomaviruses. *Virus Res.* **2009**, *143*, 195–208, doi:10.1016/j.virusres.2009.06.008.
64. Huber, M.A.; Azoitei, N.; Baumann, B.; Grünert, S.; Sommer, A.; Pehamberger, H.; Kraut, N.; Beug, H.; Wirth, T. [NF][kappaB] Is Essential for Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis in a Model of Breast Cancer Progression. *J. Clin. Invest.* **2004**, *114*, 569–581, doi:10.1172/JCI21358.
65. Hu, X.; Pang, T.; Guo, Z.; Pontén, J.; Nistér, M.; Bernard Afink, G. Oncogene Lineages of Human Papillomavirus Type 16 [E6],

43. Zhou, Z.; Yang, H.; Yang, L.; Yao, Y.; Dai, S.; Shi, L.; Li, C.; Yang, L.; Yan, Z.; Yao, Y. Human Papillomavirus Type 16 [E6] and [E7] Gene Variations Associated with Cervical Cancer in a [Han] [Chinese] Population. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* **2019**, *73*, 13–20, doi:10.1016/j.meegid.2019.04.008.
44. Conde-Ferraz, L.; Pacheco-Arjona, R.; Novelo Canul, C.; Gomez-Carballo, J.; Ramirez-Prado, J.H.; Ayora-Talavera, G.; González-Losa, M.D.R. Genetic [Variability] in [E6] and [E7] [Oncogenes] from [Human] [Papillomavirus] [Type] 58 in [Mexican] [Women]. *Intervirology* **2017**, *60*, 235–246, doi:10.1159/000489306.
45. Tenjimbayashi, Y.; Onuki, M.; Hirose, Y.; Mori, S.; Ishii, Y.; Takeuchi, T.; Tasaka, N.; Satoh, T.; Morisada, T.; Iwata, T.; et al. Whole-Genome Analysis of Human Papillomavirus Genotypes 52 and 58 Isolated from [Japanese] Women with Cervical Intraepithelial Neoplasia and Invasive Cervical Cancer. *Infect. Agent. Cancer* **2017**, *12*, 44, doi:10.1186/s13027-017-0155-4.
46. Berumen, J.; Ordoñez, R.M.; Lazcano, E.; Salmeron, J.; Galvan, S.C.; Estrada, R.A.; Yunes, E.; Garcia-Carranca, A.; Gonzalez-Lira, G.; la Campa, A. Asian-[American] Variants of Human Papillomavirus 16 and Risk for Cervical Cancer: A Case-Control Study. *J. Natl. Cancer Inst.* **2001**, *93*, 1325–1330, doi:10.1093/jnci/93.17.1325.
47. Zuna, R.E.; Moore, W.E.; Shanesmith, R.P.; Dunn, S.T.; Wang, S.S.; Schiffman, M.; Blakey, G.L.; Teel, T. Association of [HPV16] [E6] Variants with Diagnostic Severity in Cervical Cytology Samples of 354 Women in a [US] Population. *Int. J. Cancer* **2009**, *125*, 2609–2613, doi:10.1002/ijc.24706.
48. Cornet, I.; Gheit, T.; Iannacone, M.R.; Vignat, J.; Sylla, B.S.; Del Mistro, A.; Franceschi, S.; Tommasino, M.; Clifford, G.M. [HPV16] Genetic Variation and the Development of Cervical Cancer Worldwide. *Br. J. Cancer* **2013**, *108*, 240–244, doi:10.1038/bjc.2012.508.
49. Burk, R.D.; Harari, A.; Chen, Z. Human Papillomavirus Genome Variants. *Virology* **2013**, *445*, 232–243, doi:10.1016/j.virol.2013.07.018.
50. Chan, P.K.S.; Luk, A.C.S.; Park, J.-S.; Smith-McCune, K.K.; Palefsky, J.M.; Konno, R.; Giovannelli, L.; Coutlée, F.; Hibbitts, S.; Chu, T.-Y.; et al. Identification of Human Papillomavirus Type 58 Lineages and the Distribution Worldwide. *J. Infect. Dis.* **2011**, *203*, 1565–1573, doi:10.1093/infdis/jir157.
51. Dearlove, B.; Lewitus, E.; Bai, H.; Li, Y.; Reeves, D.B.; Joyce, M.G.; Scott, P.T.; Amare, M.F.; Vasan, S.; Michael, N.L.; et al. A [SARS]-[CoV]-2 Vaccine Candidate Would Likely Match All Currently Circulating Variants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2020**, *117*, 23652–23662, doi:10.1073/pnas.2008281117.
52. Bao, E.L.; Cheng, A.N.; Sankaran, V.G. The Genetics of Human Hematopoiesis and Its Disruption in Disease. *EMBO Mol. Med.* **2019**, *11*, 1–13, doi:10.15252/emmm.201910316.
53. Yang, Z.; Zhang, C.; Luo, P.; Ye, M.; Gong, Q.; Mei, B. Genetic Variability of [E6] and [E7] Genes of Human Papillomavirus Type 58 in [Jingzhou], [Hubei] [Province] of Central [China]. *Virol. J.* **2022**, *19*, 71, doi:10.1186/s12985-022-01801-6.
54. Bodily, J.M.; Mehta, K.P.M.; Laimins, L.A. Human Papillomavirus [E7] Enhances Hypoxia-Inducible Factor 1-Mediated Transcription by Inhibiting Binding of Histone Deacetylases. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 1187–1195, doi:10.1158/0008-5472.CAN-102626.
55. Honegger, A.; Schilling, D.; Bastian, S.; Sponagel, J.; Kuryshv, V.; Sültmann, H.; Scheffner, M.; Hoppe-Seyler, K.; Hoppe-Seyler, F. Dependence of Intracellular and Exosomal [microRNAs] on Viral [E6]/[E7] Oncogene Expression in [HPV]-Positive Tumor Cells. *PLoS Pathog.* **2015**, *11*, e1004712, doi:10.1371/journal.ppat.1004712.
56. White, E.A.; Sowa, M.E.; Tan, M.J.A.; Jeudy, S.; Hayes, S.D.; Santha, S.; Münger, K.; Harper, J.W.; Howley, P.M. Systematic Identification of Interactions between Host Cell Proteins and [E7] Oncoproteins from Diverse Human Papillomaviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, E260–267, doi:10.1073/pnas.1116776109.
57. Lou, H.; Boland, J.F.; Li, H.; Burk, R.; Yeager, M.; Anderson, S.K.; Wentzensen, N.; Schiffman, M.; Mirabello, L.; Dean, M. [HPV16] [E7] [Nucleotide] [Variants] [Found] in [Cancer]-[Free] [Subjects] [Affect] [E7] [Protein] [Expression] and [Transformation]. *Cancers (Basel)* **2022**, *14*, 4895, doi:10.3390/cancers14194895.
58. Nunes, E.M.; Talpe-Nunes, V.; Sobrinho, J.S.; Ferreira, S.; Lino, V. de S.; Termini, L.; Silva, G.Á.F.; Boccardo, E.; Villa, L.L.; Sichero, L. E6/[E7] [Functional] [Differences] among [Two] [Natural] [Human] [Papillomavirus] 18 [Variants] in [Human] [Keratinocytes]. *Viruses* **2021**, *13*, 1114, doi:10.3390/v13061114.
59. Vandermark, E.R.; Deluca, K.A.; Gardner, C.R.; Marker, D.F.; Schreiner, C.N.; Strickland, D.A.; Wilton, K.M.; Mondal, S.; Woodworth, C.D. Human Papillomavirus Type 16 [E6] and [E] 7 Proteins Alter [NF]-[kB] in Cultured Cervical Epithelial Cells and Inhibition of [NF]-[kB] Promotes Cell Growth and Immortalization. *Virology* **2012**, *425*, 53–60, doi:10.1016/j.virol.2011.12.023.
60. Spitkovsky, D.; Hehner, S.P.; Hofmann, T.G.; Möller, A.; Schmitz, M.L. The Human Papillomavirus Oncoprotein [E7] Attenuates [NF]-Kappa [B] Activation by Targeting the [Ikappa] [B] Kinase Complex. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 25576–25582, doi:10.1074/jbc.M201884200.
61. Byg, L.M.; Vidlund, J.; Vasiljevic, N.; Clausen, D.; Forslund, O.; Norrild, B. [NF]-K[B] Signalling Is Attenuated by the [E7] Protein from Cutaneous Human Papillomaviruses. *Virus Res.* **2012**, *169*, 48–53, doi:10.1016/j.virusres.2012.06.028.
62. Silva, R.C. de O.; da Silva Júnior, A.H.P.; Gurgel, A.P.A.D.; Barros Junior, M.R.; Santos, D.L.; de Lima, R. de C.P.; Batista, M.V.A.; Pena, L.J.; Chagas, B.S.; Freitas, A.C. Structural and Functional Impacts of [E5] Genetic Variants of Human Papillomavirus Type 31. *Virus Res.* **2020**, *290*, 198143, doi:10.1016/j.virusres.2020.198143.
63. McLaughlin-Drubin, M.E.; Münger, K. Oncogenic Activities of Human Papillomaviruses. *Virus Res.* **2009**, *143*, 195–208, doi:10.1016/j.virusres.2009.06.008.
64. Huber, M.A.; Azoitei, N.; Baumann, B.; Grünert, S.; Sommer, A.; Pehamberger, H.; Kraut, N.; Beug, H.; Wirth, T. [NF][kappaB] Is Essential for Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis in a Model of Breast Cancer Progression. *J. Clin. Invest.* **2004**, *114*, 569–581, doi:10.1172/JCI21358.
65. Hu, X.; Pang, T.; Guo, Z.; Pontén, J.; Nistér, M.; Bernard Afink, G. Oncogene Lineages of Human Papillomavirus Type 16 [E6],

- {E7} and {E5} in Preinvasive and Invasive Cervical Squamous Cell Carcinoma. *J. Pathol.* **2001**, *195*, 307–311, doi:10.1002/path.944.
66. Bhattacharjee, B.; Mandal, N.R.; Roy, S.; Sengupta, S. Characterization of Sequence Variations within {HPV16} Isolates among {Indian} Women: Prediction of Causal Role of Rare Non-Synonymous Variations within Intact Isolates in Cervical Cancer Pathogenesis. *Virology* **2008**, *377*, 143–150, doi:10.1016/j.virol.2008.04.007.
 67. Makowsky, R.; Lhaki, P.; Wiener, H.W.; Bhatta, M.P.; Cullen, M.; Johnson, D.C.; Perry, R.T.; Lama, M.; Boland, J.F.; Yeager, M.; et al. Genomic Diversity and Phylogenetic Relationships of Human Papillomavirus 16 ({HPV16}) in {Nepal}. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* **2016**, *46*, 7–11, doi:10.1016/j.meegid.2016.10.004.
 68. Bicknell, A.A.; Ricci, E.P. When {mRNA} Translation Meets Decay. *Biochem. Soc. Trans.* **2017**, *45*, 339–351, doi:10.1042/BST20160243.
 69. Hanson, G.; Collier, J. Codon Optimality, Bias and Usage in Translation and {mRNA} Decay. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19*, 20–30, doi:10.1038/nrm.2017.91.
 70. Jia, L.; Mao, Y.; Ji, Q.; Dersh, D.; Yewdell, J.W.; Qian, S.-B. Decoding {mRNA} Translatability and Stability from the 5' {UTR}. *Nat. Struct. & Mol. Biol.* **2020**, *27*, 814–821, doi:10.1038/s41594-020-0465-x.

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



ANTONIO CARLOS DE FREITAS <antonio.cfreitas@ufpe.br>

[Microorganisms] Manuscript ID: microorganisms-2452435 - Submission Received

1 mensagem

Editorial Office <microorganisms@mdpi.com>

30 de maio de 2023 às 14:51

Responder a: microorganisms@mdpi.com

Para: Antonio Carlos de Freitas <antonio.cfreitas@ufpe.br>

Cc: Bárbara Simas Chagas <babisimas@gmail.com>, Elias Tibúrcio-Júnior <eliasbiomedico@gmail.com>, Ruany Cristyne de Oliveira Silva <ruanycristyne@hotmail.com>, Daffany Luana dos Santos <daffanyluana94@gmail.com>, Marconi Rêgo Barros-Júnior <marconijrr@gmail.com>, Rita de Cássia Pereira de Lima <ritajpbio@gmail.com>, Maria da Conceição Viana Invenção <maria.conceicao@ufpe.br>, Vanessa Emanuelle Pereira Santos <vanessa.emanuelle@ufpe.br>, Pedro Luiz França Neto <pedro.francaneto@ufpe.br>, Antonio Hunberto Silva-Júnior <antoniohumbertojr@yahoo.com.br>, Jacinto Costa Silva-Neto <jacinto.costa@ufpe.br>, Marcus Vinícius de Aragão Batista <mbatista@academico.ufs.br>

Dear Professor Freitas,

Thank you very much for uploading the following manuscript to the MDPI submission system. One of our editors will be in touch with you soon.

Journal name: Microorganisms

Manuscript ID: microorganisms-2452435

Type of manuscript: Article

Title: E7 oncogene HPV 58 variants detected in Northeast Brazil: genetic and functional analysis

Authors: Bárbara Simas Chagas, Elias Tibúrcio-Júnior, Ruany Cristyne de Oliveira Silva, Daffany Luana dos Santos, Marconi Rêgo Barros-Júnior, Rita de Cássia Pereira de Lima, Maria da Conceição Viana Invenção, Vanessa Emanuelle Pereira Santos, Pedro Luiz França Neto, Antonio Hunberto Silva-Júnior, Jacinto Costa Silva-Neto, Marcus Vinícius de Aragão Batista, Antonio Carlos de Freitas *

Received: 30 May 2023

E-mails: babisimas@gmail.com, eliasbiomedico@gmail.com, ruanycristyne@hotmail.com, daffanyluana94@gmail.com, marconijrr@gmail.com, ritajpbio@gmail.com, maria.conceicao@ufpe.br, vanessa.emanuelle@ufpe.br, pedro.francaneto@ufpe.br, antoniohumbertojr@yahoo.com.br, jacinto.costa@ufpe.br, mbatista@academico.ufs.br, antonio.cfreitas@ufpe.br

You can follow progress of your manuscript at the following link (login required):

https://susy.mdpi.com/user/manuscripts/review_info/506c4484f6d51e1ca640acdb29253c50

The following points were confirmed during submission:

1. Microorganisms is an open access journal with publishing fees of 2200 CHF for an accepted paper (see <https://www.mdpi.com/about/apc/> for details). This manuscript, if accepted, will be published under an open access Creative Commons CC BY license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), and I agree to pay the Article Processing Charges as described on the journal webpage (<https://www.mdpi.com/journal/microorganisms/apc>). See <https://www.mdpi.com/about/openaccess> for more information about open access publishing.

Please note that you may be entitled to a discount if you have previously received a discount code or if your institute is participating in the MDPI Institutional Open Access Program (IOAP), for more information see <https://www.mdpi.com/about/ioap>. If you have been granted any other special discounts for your submission, please contact the Microorganisms editorial office.

2. I understand that:

a. If previously published material is reproduced in my manuscript, I will provide proof that I have obtained the necessary copyright permission. (Please refer to the Rights & Permissions website: <https://www.mdpi.com/authors/rights>).

b. My manuscript is submitted on the understanding that it has not been published in or submitted to another peer-reviewed journal. Exceptions to this rule are papers containing material disclosed at conferences. I confirm that I will inform the journal editorial office if this is the case for my manuscript. I confirm that all authors are familiar with and agree with submission of the contents of the manuscript. The journal editorial office reserves the right to contact all authors to confirm this in case of doubt. I will provide email addresses for all authors and an institutional e-mail address for at least one of the co-authors, and specify the name, address and e-mail for invoicing purposes.

If you have any questions, please do not hesitate to contact the Microorganisms editorial office at microorganisms@mdpi.com

Kind regards,
Microorganisms Editorial Office
St. Alban-Anlage 66, 4052 Basel, Switzerland
E-Mail: microorganisms@mdpi.com
Tel. +41 61 683 77 34
Fax: +41 61 302 89 18

*** This is an automatically generated email ***