

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA
BÁSICA E APLICADA – PPGIBA

VARIANTES E MUTAÇÕES DO HPV 16 E O PERFIL
CLÍNICO E HISTOPATOLÓGICO DE MULHERES
AMAZÔNIDAS COM CÂNCER DE COLO DO ÚTERO

HEIDY HALANNA DE MELO FARAH RONDON

MANAUS

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA
BÁSICA E APLICADA – PPGIBA

HEIDY HALANNA DE MELO FARAH RONDON

VARIANTES E MUTAÇÕES DO HPV 16 E O PERFIL
CLÍNICO E HISTOPATOLÓGICO DE MULHERES
AMAZÔNIDAS COM CÂNCER DE COLO DO ÚTERO

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Imunologia Básica e Aplicada como
requisito de defesa para obtenção do título de Doutora
em Imunologia Básica e Aplicada.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Kátia Luz Torres Silva

Coorientadora: Dr.^a Valquíria do Carmo Alves Martins

MANAUS

2024

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

R771v Rondon, Heidy Halanna de Melo Farah
Variantes e mutações do HPV 16 e o perfil clínico e histopatológico de mulheres amazônidas com câncer de colo do útero / Heidy Halanna de Melo Farah Rondon . 2024
99 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Kátia Luz Torres Silva
Coorientadora: Valquíria do Carmo Alves Martins
Tese (Doutorado em Imunologia Básica e Aplicada) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Variantes do HPV. 2. Câncer de colo de útero. 3. Sequenciamento de nova geração. 4. Hpv 16. I. Silva, Kátia Luz Torres. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

HEIDY HALANNA DE MELO FARAH RONDON

VARIANTES E MUTAÇÕES DO HPV 16 E O PERFIL
CLÍNICO E HISTOPATOLÓGICO DE MULHERES
AMAZÔNIDAS COM CÂNCER DE COLO DO ÚTERO

Tese de doutorado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Imunologia Básica e
Aplicada como requisito de defesa para
obtenção do título de Doutora em Imunologia
Básica e Aplicada.

BANCA EXAMINADORA

Prof. (a) Dra. Kátia Luz Torres Silva

Dr. André Luiz Leturiondo

Prof. (a) Dra. Adriana Malheiros Alle Marie

Dra. Cristina Mendes de Oliveira

Dr. Toni Ricardo Martins

MANAUS

2024

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu marido Mário Jorge Rondon.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus**, que me deu o dom da vida, que me dá força e nunca me deixou sozinha.

À minha família, meu alicerce, meu tudo, que transforma todos os meus dias para melhor. Em especial ao meu esposo, **Mario Jorge Rondon**, que foi paciente, parceiro, que me apoiou, me deu suporte, que segurou tudo em casa quando eu estava frágil, dando-me forças para concluir esta etapa. Aos meus filhos, **Enzo Gabriel** e **Bento Manoel**, que, com seu amor, carinho e cuidado, me incentivaram a terminar minhas análises, mesmo não entendendo o que seria, mas sabendo que logo a mamãe ficaria mais tempo com eles.

À minha mãe, **Simone Loureiro**, que diante das minhas fragilidades me apoiou, me ajudou e esteve presente, ajudando com as crianças, proporcionando atividades para que eu pudesse focar nos estudos.

À minha sogra, **Léa Cristina Rondon**, e à minha cunhada **Mariah Jordana Rondon** pela paciência, pela ajuda com as crianças e pelo apoio na minha casa, pois me davam suporte em dias em que eu estava cansada, sempre proporcionando atividades para os meus filhos.

Ao meu pai, **Nelson Farah**, e à minha madrasta, **Darliene Félix**, por toda a ajuda, por todo jantar elaborado quando estava cansada, por todo cuidado comigo e com minha família em dias em que eu estava desanimada, convidando-me para uma sinuca, um churrasco e uma conversa à mesa da cozinha.

Ao meu irmão, **Luhan Farah**, e à minha cunhada **Deborah Paz**, que, sempre que podiam, buscavam as crianças, dormiam com elas para que não ficassem na monotonia em casa e assim eu pudesse descansar. E à minha sobrinha e afilhada **Maria Júlia**, tão pequenina, mas que já transforma e ressignifica as coisas mais belas e importantes da vida.

Aos meus amigos casais das **Equipes de Nossa Senhora**, que me sustentaram na fé, na perseverança; que ouviram cada uma das partilhas com respeito, cuidado e me deram muitas palavras de amor, de afeto; que foram pacientes com minha caminhada na fé; e que sempre estiveram dispostos a me ajudar.

À minha orientadora, a Prof.^a Dr.^a **Kátia Luz Torres Silva**, que é *luz*, que é *amor*! Que sempre me apoiou, investiu no meu potencial, me deu oportunidades que jamais terei como agradecer; que é minha parceira de trabalho, com quem troco ideias, trabalhando na luta das mulheres com câncer de colo de útero com o objetivo de ajudá-las e – quem sabe – contribuir para acabar com esse câncer em nosso Estado; ela que hoje é minha amiga, parceira de partilhas, conselhos, de sorte que sempre estamos conectadas – uma amizade verdadeira e de fé. Agradeço a paciência, a amizade e a sua constante presença em momentos tão importantes da minha vida.

À minha coorientadora, a Dr.^a **Valquíria do Carmo**, pelos grandiosos ensinamentos no Laboratório de Biologia Molecular, pela paciência e pelo apoio nas análises; também por me incentivar a não desistir, sendo exemplo de busca de conhecimento; profissional dedicada e que se importa com todos os participantes da pesquisa. Minha amiga – muitas vezes *mãe*, que sempre me aconselhou, me ajudou, me ouviu. Obrigada por compartilhar momentos importantes na minha vida! Eu agradeço por todas as etapas que vivenciamos juntas.

Ao Professor **Dr. Felipe Naveca**, que foi paciente ensinando cada etapa de análise após sequenciamentos, que teve a disponibilidade de me atender mesmo distante – muitas vezes durante a noite, em horários em que poderia estar com sua família; que me ensinou como usar o Genious, como curar uma sequência, como buscar mutações; que foi, portanto, primordial nesta fase final do meu estudo. Minha eterna gratidão pelo profissional que o senhor é e pela dedicação que tem dentro da pesquisa.

À minha amiga **Josiane Silva**, que sempre me aconselhou e me orientou e que com sua alegria e companheirismo deixava o DEP animado para todos. Minha amiga de compartilhamento das palavras de Deus, de perseverança e de fé; ela que sempre nos lembrava que Deus não nos abandona.

Aos meus amigos de laboratório, **Flávia, Jhonathan, Mikele**, que estão sempre lado a lado nas análises e na troca de experiências. Às minhas alunas de PAIC **Lilian e Helena**, que, com sua responsabilidade, foram fundamentais nesta etapa levando os projetos com excelência dentro da FCECON.

Aos meus colegas de pesquisa **Nayara Souza e Cibele**, que sempre me ajudaram e estiveram disponíveis para me ajudar; amigas que ouviam, aconselhavam.

À **Tatiana Pires**, minha eterna professora e hoje colega de trabalho, que foi fundamental nesta etapa final ensinando-me a realizar árvores filogenéticas com cuidado e trilhando todos os passos para que eu concluísse.

Às minhas amigas de doutorado **Márcia Poinho e Suzanna**, que estiveram comigo por quatro anos cursando disciplina, trocando informações, apoiando para que este dia chegasse.

Ao Professor Doutor **José Eduardo Levi**, do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, e à Professora Doutora **Cristina Mendes**, que idealizaram este trabalho em 2015 e nos ajudaram a descrever a metodologia a ser utilizada.

Ao professor **Daniel Barros**, da Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas – Dr.^a Rosemary Costa Pinto (FVS-RCP), que me ajudou nos ajustes finais estatísticos, com muita paciência e motivação com os resultados do meu trabalho.

À **Fundação Centro de Controle em Oncologia do Estado do Amazonas**, instituição na qual desenvolvi o projeto; a toda a sua Diretoria e equipe, que valoriza a pesquisa e – o melhor – os seus pacientes.

Ao **Instituto de Pesquisa Leônidas & Maria Deane (ILDm)**, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Manaus – Amazonas, por ter permitido que o sequenciamento de nova geração acontecesse na instituição, pela equipe do Dr. Felipe Naveca – **Victor, Fernanda, Val** –, que foram fundamentais para que esta etapa acontecesse.

Agradeço a todos; não é possível fazer nada sozinha; é preciso uma rede; é preciso ajuda mútua; é preciso equipe; é preciso família; é preciso amizade; e principalmente é preciso ter Deus! E este doutorado foi construído com a ajuda de todos.

Obrigada.

Seja forte e corajoso!

Josué 1:9

RESUMO

O HPV 16, considerado um dos carcinógenos humanos mais importantes, é o genótipo prevalente no mundo, com uma taxa de ocorrência de 15,3%. Pode ser dividido em quatro linhagens (A, B, C, D) e em pelo menos dezesseis sublinhagens; estas conferem riscos diferentes ao desenvolvimento de pré-câncer e câncer. Nesse contexto, estudos sobre as variantes circulantes na Região Amazônica ainda são escassos. Com isso, este estudo buscou descrever as variantes circulantes e as mutações do HPV16 em mulheres amazônicas com câncer de colo de útero e relacioná-las com as características clínicas e patológicas das pacientes. O estudo incluiu mulheres com diagnóstico de câncer de colo de útero que chegavam para tratamento à FCECON. Foram sequenciadas 59 amostras positivas para HPV16 por meio do sequenciamento de nova geração utilizando protocolo modificado. As leituras FASTQ foram analisadas pelo programa *Genious Prime*; e foram analisados parâmetros de qualidade das sequências. Foram incluídas 33 amostras após critério de qualidade proposto no estudo. De acordo com as características clínicas das pacientes, a maioria – 27,2% – tinha entre 46 e 55 anos; cerca de 6,0% apresentavam idade inferior a 25 anos; destas duas pacientes tinham 20 anos de idade no momento da coleta da amostra. Quanto à raça, 90,9% se declararam brancas; e 84,8% eram do interior do Estado do Amazonas. O tipo histológico mais frequente foi o carcinoma de células escamosas, com 72,5%, seguido de 27,5% de adenocarcinoma. O estadiamento FIGO, que ia de IB até IVB, foi heterogêneo, e o mais frequente foi o IB1 (18,1%). Das 33 pacientes do estudo, cinco (15,2%) foram a óbito por conta da doença (CID539). Quanto ao prognóstico, 60,6% foram consideradas como avançado para a doença. A linhagem A foi encontrada com maior frequência (51,6%), seguida da linhagem D (41,9%), das C e B (3,2% para cada uma delas). Foram encontradas apenas as sublinhagens A1, B1, C1 e D3. A sublinhagem A1 foi encontrada em 16 amostras, com 51,6%; a sublinhagem D3 foi a segunda mais frequente, com 41,9%; as sublinhagens B1 e C1 foram encontradas – cada uma delas em uma amostra diferente. As mutações foram classificadas como sendo 55,4% sinônimas/silenciosas; e 44,6% mutações missense/não silenciosas. Entre as mutações missense mais frequentes, destacam-se: A3115C (I44L) isoleucina>leucina; A5570G (T266A) treonina>alanina; e A3178G (I65V) isoleucina>valina – encontradas em 60,6% das amostras analisadas –, além da mutação A4362C (L330F) leucina>fenilalanina (57,6%). Em conclusão, os dados apresentam informações sobre a diversidade das variantes, bem como os SNPs e as

mutações missense encontradas no genoma do HPV 16 e o uso da metodologia de sequenciamento completo do genoma do HPV 16 por sequenciamento de nova geração (NGS) permitiu, em larga escala, identificar características na variabilidade intratípica do HPV 16, as quais talvez, com uso de outras metodologias, poderiam passar despercebida, que futuramente podem ser utilizadas em estudos futuros relacionados à patogênese da doença e ao HPV16 nesta região.

Palavras-chave: Variantes do HPV; câncer de colo de útero; Sequenciamento de nova geração; HPV16

ABSTRACT

HPV 16, considered one of the most important human carcinogens, is the prevalent genotype in the world, with an occurrence rate of 15.3%. It can be divided into four lineages (A, B, C, D) and at least sixteen sublineages; these confer different risks for the development of pre-cancer and cancer. In this context, studies on variants circulating in the Amazon region are still scarce. Therefore, this study sought to describe the circulating variants and mutations of HPV16 in Amazonian women with cervical cancer and relate them to the clinical and pathological characteristics of the patients. The study included women diagnosed with cervical cancer who arrived for treatment at FCECON. HPV16 59 samples positive were sequenced through next generation sequencing using a protocol modified. FASTQ readings were analyzed using the Genious Prime program; and sequence quality parameters were analyzed. 33 samples were included following the quality criteria proposed in the study. Were included 33 samples following the quality criteria proposed in the study. According to the clinical characteristics of the patients, the majority – 27.2% – were between 46 and 55 years old; around 6.0% were under 25 years of age; These two patients were 20 years old at the time of sample collection. Regarding race, 90.9% declared themselves white; and 84.8% were from the interior of the State of Amazonas. The most common histological type was squamous cell carcinoma, with 72.5%, followed by 27.5% of adenocarcinoma. The FIGO staging, which ranged from IB to IVB, was heterogeneous, and the most common was IB1 (18.1%). Of the 33 patients in the study, five (15.2%) died due to the disease (CID539). Regarding the prognosis, 60.6% were considered to have advanced disease. Lineage A was found most frequently (51.6%), followed by lineage D (41.9%), C and B (3.2% for each of them). Only sublineages A1, B1, C1 and D3 were found. The A1 sublineage was found in 16 samples, with 51.6%; the D3 sublineage was the second most common, with 41.9%; sublineages B1 and C1 were found – each in a different sample. The mutations were classified as being 55.4% synonymous/silent; and 44.6% missense/non-silent mutations. Among the most frequent missense mutations, the following stand out: A3115C (I44L) isoleucine>leucine; A5570G (T266A) threonine>alanine; and A3178G (I65V) isoleucine>valine – found in 60.6% of the samples analyzed –, in addition to the A4362C (L330F) leucine>phenylalanine mutation (57.6%). In conclusion, the data presents information on the diversity of variants, as well as the SNPs and missense mutations found in the HPV 16 genome and the use of the complete sequencing

methodology of the HPV 16 genome by next generation sequencing (NGS) allowed, on a large scale, identify characteristics in the intratypic variability of HPV 16, which perhaps, using other methodologies, could go unnoticed, which in the future can be used in future studies related to the pathogenesis of the disease and HPV16 in this region.

Keywords: HPV variants; cervical cancer; Next generation sequencing; HPV16.

Lista de Figuras

Figura 1 – Árvore filogenética dos cinco gêneros do HPV encontrados nos seres humanos – Alfa, Beta, Gamma, Mu e Nu –, baseada no alinhamento dos genes E1, E2, L1 e L2. O gênero Alpha é classificado como cutâneo de baixo risco (cor cinza), mucoso de baixo risco (cor laranja) ou de alto risco (cor rosa). Em texto vermelho estão os genótipos classificados como carcinogênicos em humanos, com base em dados epidemiológicos. Os restantes dos genótipos são “prováveis” ou “possíveis” cancerígenos. Fonte: (Doorbar *et al.*, 2015).

Figura 2 – Representação esquemática do genoma do HPV16. Ilustração do genoma circular de DNA de fita dupla de 7.908 pb do HPV16. As linhas pretas representam os genes expressos precocemente, identificados pela letra “E”. As linhas azuis representam os genes expressos tardiamente, identificados pela letra “L”. Representação em cinza da região reguladora a montante (URR) e uma segunda região não codificante (NCR) (Burk *et al.*, 2011).

Figura 3 – Ciclo de infecção pelo HPV. Fonte: Adaptado de Moody & Laimins 2010.

Figura 4. Esquema da história natural do câncer de colo de útero. Fonte: Adaptado de Schiffman *et al.*, 2011.

Figura 5 – A: Resposta imune levando à eliminação do vírus. B: Mecanismo de evasão do sistema imune do HPV16 e HPV18. Fonte: Adaptado de Steinbach e Riemer, 2018.

Figura 6 – A: Colo do útero e os epitélios que revestem o órgão. B: representação do câncer de colo de útero. Fonte: Modificada IARC (screening.iarc.fr).

Figura 7 – Taxas de mortalidade de câncer de colo de útero por 100 mil mulheres nas regiões do Brasil, nos anos de 1979 a 2020. Fonte: Instituto Nacional do Câncer (INCA). Regiões determinadas em cores: em azul-escuro Região Centro-Oeste; em laranja Região Nordeste; em cinza Região Norte; em amarelo Região Sudeste; em azul-claro Região Sul; e em verde Brasil.

Figura 8. *Primers* alinhados no Geneious Prime versão 2103.1.2 na sequência referência NC_001526.4. Em verde estão os *primers* gerados no *pool* 1; e em lilás, os pares de *primers* do *pool* 2. Fonte: Figura elaborada pelo autor no programa Geneious Prime.

Figura 9. *Workflow* utilizado no Programa Geneious Prime 2013.1.2 em cada *contig* gerado. Imagem da tela do *software*.

Figura 10. Fluxograma da seleção de amostras para análises de variantes e de mutações do HPV16.

Figura 11. Árvore filogenética do HPV16 com identificação das linhagens. O método utilizado foi o Neighbour-Joining (para a construção das filogenias) os valores são de ultrafast bootstrap (UFB) e SH-aLRT. Em cor azul amostras da linhagem D3, em cor amarela amostras da linhagem C1, em cor verde amostras da linhagem B1 e em lilás amostras da linhagem A1.

Figura 12 – Análise de sobrevivência global das pacientes do estudo pelo método de Kaplan-Meier. A linha preta representa o intervalo de confiança (IC 95%).

Lista de Tabelas

Tabela 01. Características sociodemográficas e clínicas das pacientes com câncer de colo de útero infectadas por HPV 16, atendidas na FCECON, Amazonas, Brasil

Tabela 02. Relação do estadiamento FIGO da doença com as sublinhagens de HPV16 encontradas nas mulheres com câncer de colo de útero atendidas na FCECON, Amazonas, Brasil.

Tabela 03. Relação das sublinhagens do HPV16 com os tipos histológicos dos tumores em mulheres com câncer de colo de útero atendidas na FCECON, Amazonas, Brasil.

Tabela 04. Mutações missense/não silenciosas encontradas no genoma completo do HPV16.

Lista de Quadros

Quadro 01. Classificação e estadiamento conforme a FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics).

Quadro 02. Pares de *primers* sintetizados para sequenciamento.

Quadro 03. Relação das mutações do HPV 16 encontradas de acordo com as características clínicas das pacientes analisadas

Lista de Gráficos

Gráfico 01: Frequência dos SNPs encontrados nos genes E1, E2, E5, E6, E7, L1 e L2 após normalização, de acordo com o tamanho de cada gene.

Lista de abreviaturas, siglas

ADC – Adenocarcinoma cervical

CCU – Câncer de colo de útero

CEC – Carcinoma de células escamosas

CID539 – Neoplasia maligna do colo do útero, não especificado

CNRAC – Central Nacional de Regulação de Alta Complexidade

CTLs – Linfócitos T Citotóxicos

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EZT – Exérese da Zona de Transformação

FCECON – Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas

FIGO – International Federation of Gynecology and Obstetrics

GCO – Global Cancer Observatory

HLA – Antígeno Leucocitário Humano

HPV – Papillomavirus Humano

HR HPV – HPV de alto risco

IARC – Agência Internacional de Pesquisa em Câncer, do inglês International Agency for Research on Cancer

ICTV – Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus, do inglês International Committee on Taxonomy of Viruses

IFN – Interferon Gama

JEC – Junção Escamocolunar

KDA – Kilo Dalton

KPNC – Kaiser Permanente Division of Research

LCR – Região Longa de Controle

MHC – Complexo de Histocompatibilidade

NGS – Sequenciamento de Nova Geração

NIC 3 – Neoplasia Intraepitelial de Grau 3

OMS – Organização Mundial da Saúde

OR – Odds Ratio

ORF – Região de leitura aberta

p53 – Proteína 53

pB – Pares de bases

pRB – Proteína do retinoblastoma

SNPs – Polimorfismos de nucleotídeo único

STAT – Fatores ativadores de transcrição de sinal

INCA – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 Referencial Teórico	24
2.1 Papillomavírus Humano (HPV)	24
2.1.1 Epidemiologia do HPV	26
2.1.2 Variantes do HPV 16	28
2.1.3 Ciclo da Infecção Viral e processo carcinogênico.....	29
2.1.4 Resposta Imune e infecção do HPV.....	31
2.2 Câncer de Colo de útero (CCU)	33
2.2.1 Epidemiologia do câncer de colo de útero (CCU)	37
2.3 Sequenciamento de Nova Geração (NGS)	40
3 JUSTIFICATIVA	42
4 OBJETIVOS	
4.1 Gerais.....	43
4.2 Específicos.....	43
5 MATERIAL E MÉTODOS	
5.1 Tipo de estudo	44
5.2 Local do estudo	44
5.3 População do estudo	45
5.4 Amostragem	45
5.5 Critérios de elegibilidade	45
5.6 Procedimentos de coleta de dados clínicos e epidemiológicos.....	45
5.7 Triagem molecular para detecção e genotipagem do HPV16.....	46
5.8 Preparo das amostras positivas HPV16 para a análise de NGS	46
5.9 Amplificação do genoma completo do HPV16.....	46
5.10 Preparação da Biblioteca	49
5.11 Análises de Bioinformática	50
5.12 Análises de Mutações	50
5.13 Análises Estatísticas	51
6 RESULTADOS	53
7 DISCUSSÃO	66
8 CONCLUSÕES	75
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
10 APÊNDICES	87
11 ANEXOS	99

1. INTRODUÇÃO

O câncer de colo do útero (CCU) é o quarto tipo mais comumente diagnosticado da doença em mulheres de todas as idades no mundo todo, com uma incidência mundial de 13,36 a cada 100 mil mulheres no ano de 2020 (SUNG; FERLAY; SIEGEL; LAVERSANNE *et al.*, 2021).

Em 2020, a International Agency for Research on Cancer (IARC) forneceu informações sobre a incidência e a mortalidade por câncer. Analisou dados tabulados e descritos no Global Cancer Observatory (GCO) de 185 países e relatou que o número de óbitos por câncer de colo do útero (CCU) foi de 341.831 mulheres nesse mesmo ano (SUNG; FERLAY; SIEGEL; LAVERSANNE *et al.*, 2021).

No Brasil, excluídos os tumores de pele não melanoma, o de colo do útero é o terceiro tipo de câncer mais comum entre as mulheres, com uma estimativa de 17.010 casos novos para o ano de 2023, com uma taxa de incidência estimada de 13,25 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2023).

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer – José Alencar Gomes da Silva (INCA), as taxas de incidência e o número de casos novos estimados são diferentes nas distintas regiões do Brasil para o ano de 2023. A Região Norte apresenta a maior taxa de incidência, com 16,77/100 mil mulheres, seguida da Região Nordeste, com 13,85/100 mil mulheres. Já nas regiões Centro-Oeste, Sul e Sudeste, estima-se uma incidência de 11,09/100 mil mulheres; 9,77/100 mil mulheres; e 8,57/100 mil mulheres, respectivamente (INCA, 2023).

As taxas de incidência observadas nas regiões do Brasil demonstram que o CCU continua sendo um problema de saúde pública no País. O fator que mais chama a atenção é a taxa de mortalidade, pois, no ano de 2020, observou-se a taxa de 4,60 mortes por 100 mil mulheres (dado ajustado pela população mundial). Especificamente na Região Norte, a taxa de mortalidade foi de 9,52 mortes por 100 mil mulheres, representando a primeira causa de óbito por câncer feminino nessa região, quando comparada às outras regiões do Brasil no ano de 2020 (INCA, 2020).

Vários fatores podem contribuir para o desenvolvimento do CCU. No entanto a infecção persistente pelo Papillomavírus Humano (HPV) é considerada um dos principais fatores para esse desenvolvimento (BOSCH; MUÑOZ; DE SANJOSÉ, 1997) (DE VILLIERS, 2003). A relação do HPV e o câncer de colo do útero vem sendo demonstrada em

diversos estudos (BOSCH; MANOS; MUÑOZ; SHERMAN *et al.*, 1995; BOSCH; MUÑOZ, 2002; MUÑOZ; BOSCH, 1992; MUÑOZ; BOSCH; DE SANJOSÉ; HERRERO *et al.*, 2003).

Os HPVs pertencem à família *Papillomaviridae* e são distribuídos em cinco gêneros: Alpha-papillomavirus, Beta-papillomavirus, Gamma-papillomavirus, Mu-papillomavirus e Nu-papillomavirus (DE VILLIERS; FAUQUET; BROKER; BERNARD *et al.*, 2004). O gênero Alpha-papillomavirus contém os vírus associados com o desenvolvimento de tumores na mucosa oral ou anogenital; o gênero Beta-papillomavirus contém os vírus que estão associados com o desenvolvimento de epidermodisplasias; e os gêneros Gama, Mu e Nu estão associados a tumores cutâneos (BURK; HARARI; CHEN, 2013; VAN DOORSLAER, K.; CHEN, Z.; BERNARD, H. U.; CHAN, P. K. S. *et al.*, 2018).

Os HPVs são vírus pequenos, que medem 50-60nm de diâmetro e não possuem envoltório. Seu genoma é composto por uma molécula de DNA fita dupla circular, com aproximadamente 8.000 pares de bases (pb) (Baker *et al.*, 1991). O genoma contém oito fases de leitura aberta (Open Reading Frames – ORF), sendo dividido em uma região chamada precoce (*E-early*), que envolve as regiões E1, E2, E3, E4, E5, E6 e E7, com cerca de 4 mil pb, que codificam proteínas envolvidas na replicação viral e oncogênese; outra região chamada tardia (*L-late*), com aproximadamente 3 mil pb, que codifica as duas proteínas do capsídeo L1 e L2 e a região reguladora; e, por fim, a região chamada não codificadora LCR (Região Longa de Controle), de cerca 1mil pb, que regula a replicação viral e a expressão gênica (DOORBAR, JOHN, 2006).

Mais de 200 genótipos de HPVs já foram descritos na literatura (BERNARD; BURK; CHEN; VAN DOORSLAER *et al.*, 2010; VAN DOORSLAER; LI; XIRASAGAR; MAES *et al.*, 2017). Destes, cerca de 40 infectam a região anogenital (MUÑOZ; BOSCH; DE SANJOSÉ; HERRERO *et al.*, 2003), dos quais todos são classificados no gênero Alpha-papillomavirus (BURK; HARARI; CHEN, 2013). Recentemente, observou-se uma variabilidade substancial na capacidade de carcinogênese entre os genótipos, listados na ordem de risco, do maior para o menor (COMBES; GUAN; FRANCESCHI; CLIFFORD, 2015; DE SANJOSE; BROTONS; PAVON, 2018; DEMARCO; HYUN; CARTER-POKRAS; RAINE-BENNETT *et al.*, 2020).

Os HPVs 16 e 18, juntos, são responsáveis por 70% dos casos de CCU e são os dois genótipos mais frequentes em todas as regiões geográficas do mundo (DE SANJOSE, S.; QUINT, W. G.; ALEMANY, L.; GERAETS, D. T. *et al.*, 2010). No Amazonas alguns estudos que descreveram a prevalência dos genótipos 16 e 18 em diferentes populações, sejam

elas populações de rastreamento e/ou populações com câncer, encontram a presença do HPV 16. (COSTA-LIRA; JACINTO; SILVA; NAPOLEÃO *et al.*, 2017; TORRES; MARIÑO; PIRES ROCHA; DE MELLO *et al.*, 2018).

Sabe-se que a persistência do HPV é fundamental para que ocorra o desenvolvimento do câncer de colo do útero, e vários fatores podem estar associados a essa persistência, como resposta imunológica do hospedeiro, variação genotípica do HPV, tropismo celular, instabilidade genômica, entre outros (DE SANJOSE; BROTONS; PAVON, 2018; EGAWA; EGAWA; GRIFFIN; DOORBAR, 2015; SCHIFFMAN; DOORBAR; WENTZENSEN; DE SANJOSÉ *et al.*, 2016).

Estudos têm mostrado a diversidade da sequência do HPV 16 (variantes) em diferentes áreas geográficas e sua associação a diferentes riscos de desenvolvimento de câncer de colo do útero, assim como seus tipos histológicos (BERUMEN; ORDOÑEZ; LAZCANO; SALMERON *et al.*, 2001; HILDESHEIM; SCHIFFMAN; BROMLEY; WACHOLDER *et al.*, 2001; XI; KIVIAT; HILDESHEIM; GALLOWAY *et al.*, 2006). Mutações pontuais no genoma do HPV 16 podem estar associadas à persistência viral e ao risco aumentado para desenvolvimento do CCU (DE OLIVEIRA; VIEIRA; ÁVILA; FINGER-JARDIM *et al.*, 2017).

Sabe-se que diversas metodologias são utilizadas para sequenciar diferentes regiões do genoma ou até o genoma completo (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977). Hoje, a técnica de sequenciamento de nova geração (Next Generation Sequencing) proporciona obtenção de sequências do genoma completo, gerando informações importantes para o entendimento da compreensão genética e da biologia do genoma viral, sendo implementada para identificação de novas espécies, sequenciamento do transcriptoma, epigenômica e metagenômica (BALDWIN; FELDMAN; ALWINE; ROBERTSON, 2014).

As informações disponíveis sobre a diversidade do HPV 16 dentro de uma população específica, especialmente na população amazônica, em nível de genoma completo, ainda são limitadas (CASTRO; FARIAS; BORBOREMA-SANTOS; CORREIA *et al.*, 2011). Com isso, investigar o genoma completo do HPV16 pode fornecer mais informações sobre os genes, identificar as variantes, descrever polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) e relacionar essas variações aos desfechos clínicos obtidos na população estudada.

Baseado nessas premissas e no grande impacto do câncer de colo do útero na Região Amazônica, este estudo visou descrever as variantes circulantes e as mutações do HPV16 e

relacionar esses achados com o perfil clínico e histopatológico de mulheres amazônidas com câncer de colo do útero.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Papillomavírus Humano (HPV)

Os Papillomavirus Humanos pertencem à família *Papillomaviridae* e são distribuídos em cinco gêneros: o gênero Alpha-papillomavirus, Beta-papillomavírus, Gamma-papillomavírus, Mu-papillomavírus e Nu-papillomavírus (Figura 1) (BURK; HARARI; CHEN, 2013; VAN DOORSLAER, K.; CHEN, Z.; BERNARD, H.-U.; CHAN, P. K. *et al.*, 2018).

A classificação taxonômica do HPV é baseada na sequência e na identidade do gene L1, região mais conservada do vírus, sendo distribuído em família, gênero e espécie, que ainda se classificam em genótipos e em variantes (linhagens e sublinhagens). Dessa forma, os gêneros são definidos baseados na similaridade de 60%; espécie em 61-70% de similaridade; e genótipo de 71-90%. Nos casos de linhagem e sublinhagem as diferenças podem variar de 1 a 10% (BURK; HARARI; CHEN, 2013; DE VILLIERS; FAUQUET; BROKER; BERNARD *et al.*, 2004).

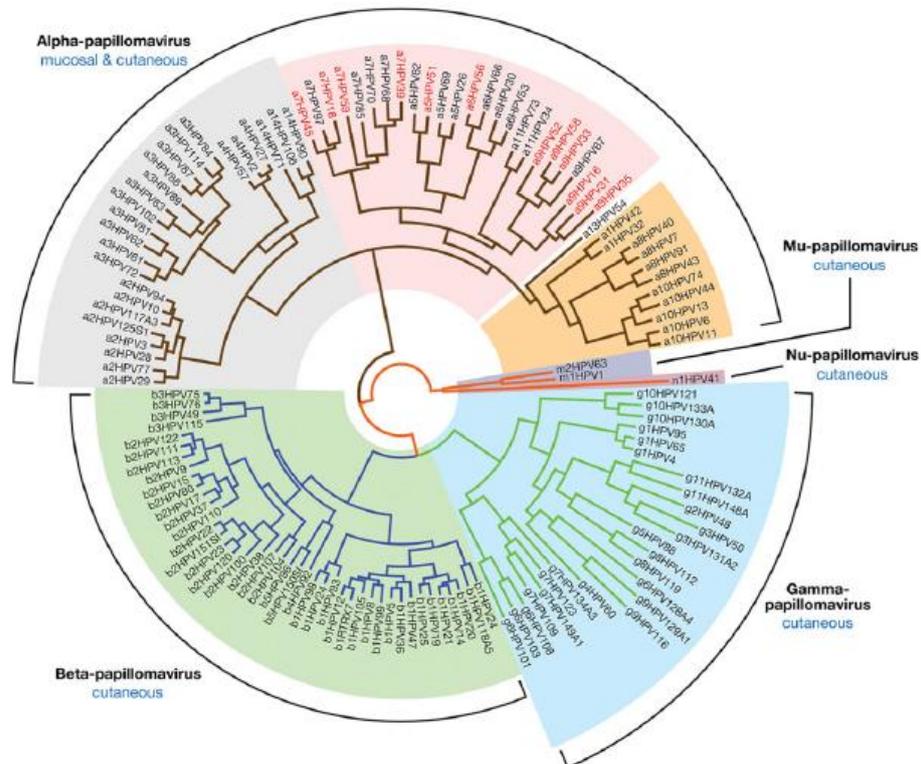


Figura 1 – Árvore filogenética dos cinco gêneros do HPV encontrados nos seres humanos – Alfa, Beta, Gamma, Mu e Nu –, baseada no alinhamento dos genes E1, E2, L1 e L2. O gênero Alpha é classificado como cutâneo de baixo risco (cor cinza), mucoso de baixo risco (cor laranja) ou de alto risco (cor rosa). Em texto vermelho estão os genótipos classificados como carcinogênicos em humanos, com base em dados epidemiológicos. Os restantes dos genótipos são “prováveis” ou “possíveis” cancerígenos. Fonte: (Doorbar *et al.*, 2015).

Esses vírus têm tropismo por diferentes sítios anatômicos (vagina, vulva, pênis, ânus, orofaringe, colo do útero) e, conforme o genótipo, podem causar lesões benignas, com diferentes aspectos clínicos (verrugas cutâneas, condilomas, epidermodisplasias) ou lesões malignas (CASTLE; RODRIGUEZ; PORRAS; HERRERO *et al.*, 2007).

Mais de 200 genótipos de HPVs foram descritos na literatura e estão envolvidos em doenças benignas e malignas, sendo classificados em alto risco oncogênico (HR-HPV) e baixo risco oncogênico (LR-HPV). O gênero Alpha-papillomavirus é considerado o maior grupo de HPVs envolvidos no processo de carcinogênese (DEMARCO; HYUN; CARTER-POKRAS; RAINE-BENNETT *et al.*, 2020).

A IARC classificou 12 genótipos de HPVs com risco para desenvolvimento do CCU baseando-se na prevalência desses HPVs no mundo, sendo eles: HPV16, HPV 31, HPV33, HPV35, HPV52, HPV58, HPV18, HPV39, HPV45, HPV59, HPV51, HPV56. Essa prevalência pode variar conforme a área geográfica, a população e a idade (DE SANJOSE; WHEELER; QUINT; HUNT *et al.*, 2013; GUAN; HOWELL-JONES; LI; BRUNI *et al.*, 2012).

Quanto à sua estrutura, os HPVs são vírus de estrutura icosaédrica, sem envelope comum, com aproximadamente 50-60nm de diâmetro. Seu genoma compreende círculos de cadeia dupla (epissomas) de aproximadamente 8.000 pares de bases, que contêm oito fases de leitura aberta (regiões de leitura aberta – ORFs), que codificam proteínas ao longo da replicação viral (DOORBAR, JOHN, 2006) (Figura 2).

O genoma do HPV é composto por uma região de fase precoce do ciclo de multiplicação viral (*E-early*) composta pelas regiões E1, E2, E4, E5, E6 e E7, com cerca de 4 kb; uma segunda região, chamada tardia (*L-late*), com aproximadamente 3kb, que codifica as duas proteínas do capsídeo L1 e L2; e a terceira região considerada reguladora. E, por fim, a região chamada não codificadora LCR, de cerca 1kb, que regula a replicação viral e a

expressão gênica (DOORBAR; EGAWA; GRIFFIN; KRANJEC *et al.*, 2015; SMITH; CHEN; REIMERS; VAN DOORSLAER *et al.*, 2011).

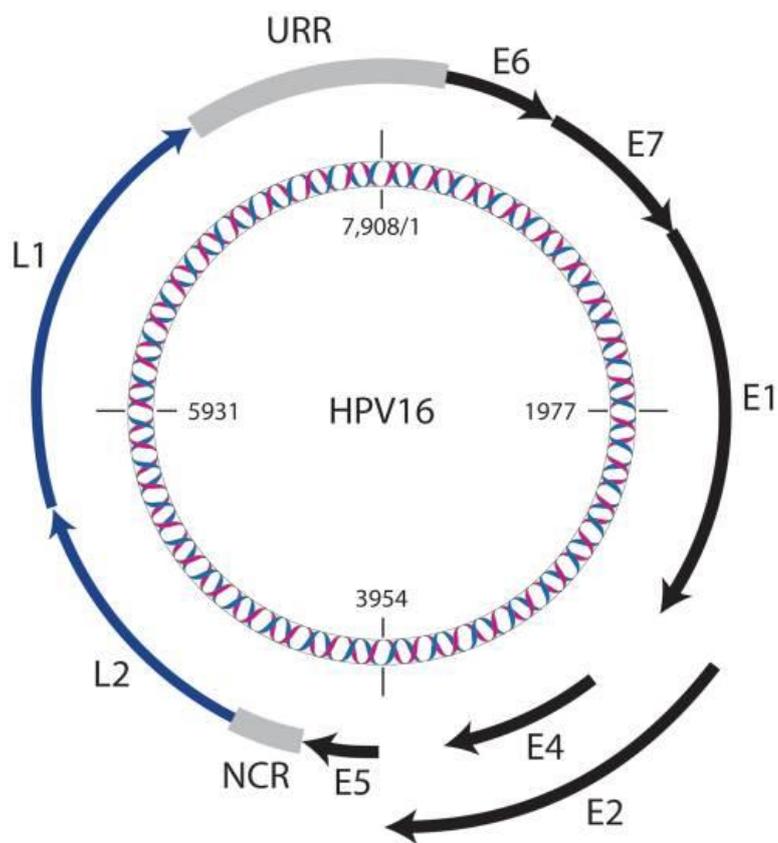


Figura 2 – Representação esquemática do genoma do HPV16. Ilustração do genoma circular de DNA de fita dupla de 7.908 pb do HPV16. As linhas pretas representam os genes expressos precocemente, identificados pela letra “E”. As linhas azuis representam os genes expressos tardiamente, identificados pela letra “L”. Representação em cinza da região reguladora a montante (URR) e uma segunda região não codificante (NCR) (Burk *et al.*, 2011).

2.1.1 Epidemiologia do HPV

O HPV é considerado o agente infeccioso de transmissão sexual mais comum no mundo, prevalente em mulheres e em homens sexualmente ativos, que poderão ser infectados em algum momento de sua vida, inclusive serem infectados repetidamente (DE SANJOSE; BROTONS; PAVON, 2018; DE SANJOSÉ; SERRANO; TOUS; ALEJO *et al.*, 2018).

Uma metanálise analisou estudos entre 1995 e 2009 em cinco continentes do mundo – um total de 194 estudos –, que compreenderam 1.016.719 mulheres com citologia normal. Nesse estudo foi identificada uma prevalência global de 11,7% de infecção pelo HPV nessas

mulheres, apresentando um pico da infecção em mulheres mais jovens (<25 anos) (BRUNI; DIAZ; CASTELLSAGUÉ; FERRER *et al.*, 2010),

O HPV 16 é o genótipo mais frequente no mundo, seja em mulheres com citologia normal e/ou seja em mulheres com câncer de colo do útero (CLIFFORD; SMITH; PLUMMER; MUÑOZ *et al.*, 2003; DE SANJOSÉ; DIAZ; CASTELLSAGUÉ; CLIFFORD *et al.*, 2007). Em 1992 o HPV foi considerado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como a principal causa do câncer de colo do útero. Em 1995 um estudo multicêntrico, realizado por Bosh *et al.* sobre a prevalência do HPV no câncer de colo do útero, analisaram-se amostras coletadas de 22 países e detectou-se o HPV em 93% dos tumores de CCU, sendo o HPV16 prevalente em cerca de 50% das amostras analisadas (BOSCH; MANOS; MUÑOZ; SHERMAN *et al.*, 1995).

Um estudo retrospectivo, transversal atribuiu os genótipos do HPV a pacientes com câncer de colo do útero de 38 países do mundo (Europa, América do Norte, América do Sul Central, África, Ásia e Oceania) e encontrou uma frequência de HPV de 85%; os HPV 16 e 18 foram prevalentes em cerca de 71% dos casos de CCU (DE SANJOSE, SILVIA; QUINT, WIM GV; ALEMANY, LAIA; GERAETS, DAAN T *et al.*, 2010).

No Brasil, uma metanálise que avaliou a prevalência da infecção genital, anal e oral pelo HPV analisou 139 estudos, que compreenderam 57.513 participantes, sendo 105 estudos especificamente sobre a prevalência da infecção do HPV em colo do útero. Esse estudo mostrou uma prevalência de HPV cervical de 25,41% (IC95% 22,71-28,32), sendo 17,65% HR-HPV (COLPANI; SOARES FALCETTA; BACELO BIDINOTTO; KOPS *et al.*, 2020).

Um estudo multicêntrico transversal, com homens e mulheres entre 16 e 25 anos, sexualmente ativos, realizado no Brasil (POP-Brasil), coletou dados entre setembro de 2016 e novembro de 2017 e avaliou a prevalência de HPV em 7.694 participantes por meio da coleta de amostras de cérvix uterina, pênis e escroto. A prevalência encontrada nessa população foi de 35,2% de HPV de alto risco e de 46,4% de outros HPV. A maior prevalência ocorreu nas regiões Nordeste e Centro-Oeste, com 58,09% e 56,46%; a Região Norte, com 53,54%, seguida das regiões Sudeste e Sul, com 49,92% e 49,68%, respectivamente.

No Amazonas alguns estudos que descreveram a prevalência dos genótipos 16 e 18 em diferentes populações, tais como em mulheres que realizaram o rastreamento do CCU na rede pública, mulheres ribeirinhas, indígenas, mulheres com lesões de alto grau e com câncer de colo do útero, corroboram essa frequência (DUARTE; VIEIRA; BRITO; PINHEIRO *et al.*,

2017; FONSECA; TAEKO; CHAVES; AMORIM *et al.*, 2015; TORRES; MARIÑO; PIRES ROCHA; DE MELLO *et al.*, 2018).

2.1.2 Variantes do HPV 16

O HPV16 é responsável por quase todos os cânceres de colo do útero. Estudos vêm demonstrando que as variantes do HPV16 – quando o genoma difere em menos 10% nas sequências de nucleotídeos da ORF-L1 – podem conferir risco diferencial no desenvolvimento de lesões precursoras de alto grau e CCU (BURK; HARARI; CHEN, 2013).

As variantes do HPV16 são classificadas em linhagens que diferem entre 1,0 e 10% do nível dos nucleotídeos; e as sublinhagens que diferem de 0,5 a 1,0% no nível de nucleotídeo do genoma completo (DE VILLIERS, 2013).

O HPV 16 pode ser subdividido em quatro linhagens e, até o momento, foram identificadas 16 sublinhagens (DE VILLIERS, 2013):

- A (A1, A2 e A3) (tradicionalmente classificadas como europeias), A4 (asiática);
- B (B1, B2, B3 e B4 (africana-1));
- C (C1, C2, C3 e C4 (africana-2));
- D (D1 (norte-americana), D2 e D3 (asiático-americana) e D4 (norte-americana)).

Mirabello e colaboradores (2016) realizaram um estudo por meio do método de sequenciamento de nova geração envolvendo 3.579 mulheres positivas para o HPV16 com o objetivo de identificar as principais variantes e associá-las com o risco para o desenvolvimento de lesões precursoras e/ou desenvolvimento do câncer de colo do útero. O estudo identificou uma forte associação da sublinhagem A4 – asiática, com um risco aumentado para câncer de colo do útero, especificamente o adenocarcinoma (OR= 9,81, IC 95%). Identificou ainda que as diferentes sublinhagens e suas propriedades carcinogênicas podem influenciar o maior risco em tipos histológicos de pré-câncer e câncer (MIRABELLO, L.; YEAGER, M.; CULLEN, M.; BOLAND, J. F. *et al.*, 2016).

No Brasil, outro estudo que teve como objetivo analisar a diversidade genética intra-hospedeiro em dez casos de CCU e um de condiloma associados a uma única infecção por HPV 16 descreveu pontos de mutações que podem estar associadas a infecção conforme a linhagem encontrada (DE OLIVEIRA; BRAVO; SANTIAGO E SOUZA; GENTA *et al.*,

2015). Outro estudo buscou diferenças no risco de CCU associado à variação genotípica, por meio de SNPs específicos ou “haplótipos virais” (ou seja, variações fixas no genoma viral), que poderiam ser responsáveis pelo aumento da carcinogenicidade viral. Em conclusão, o estudo permitiu identificar novos SNPs, deleções contíguas sugestivas de integração viral (OR de 27,3, IC de 95% 3,3–222, P = 0,002) em NIC3, que podem estar associados a coinfeções de linhagem variante com HPV 16 (CULLEN; BOLAND; SCHIFFMAN; ZHANG *et al.*, 2015).

Além disso, variantes que promovem alterações no genoma do hospedeiro também podem levar a alterações de aminoácidos, podendo alterar domínios funcionais e até antigênicos do vírus; e podem introduzir novas propriedades imunogênicas, combinando com genótipos específicos de HPV e até polimorfismos do antígeno leucocitário humano (HLA), o que aumenta o risco da persistência do HPV e a progressão do câncer cervical (DE ARAUJO SOUZA; SICHERO; MACIAG, 2009).

2.1.3 Ciclo da infecção viral e processo carcinogênico

O HPV é capaz de alterar o ciclo celular das células hospedeiras por meio da expressão das proteínas virais. A organização do ciclo de vida dos HPVs Alpha-papilomavirus é mais bem elucidada do que a dos demais (DOORBAR; QUINT; BANKS; BRAVO *et al.*, 2012).

Acredita-se que o ciclo de vida viral seja iniciado pela infecção das células epiteliais basais, que infectam os queratinócitos. Essa infecção pode acontecer por meio de uma lesão, como uma ferida ou um trauma epitelial, para que o vírus atinja a camada basal do epitélio, infectando assim o tecido (DOORBAR; CUBIE, 2005; HORVATH; BOULET; RENOUX; DELVENNE *et al.*, 2010). A estratégia de entrada do vírus na célula é controversa, estando relacionada com o genótipo do HPV e até com o tipo celular infectado. Alguns estudos demonstram que o vírus utiliza receptores específicos, como é o caso dos proteoglicanos de sulfato de heparina, que se ligam à proteína do capsídeo L1 exercendo um papel fundamental para a ligação inicial (HORVATH; BOULET; RENOUX; DELVENNE *et al.*, 2010). Já outros estudos revelam que receptores do fator de crescimento epidérmico (EGF), integrinas e outros podem ser utilizados como receptores de entrada do HPV na célula (EVANDER; FRAZER; PAYNE; QI *et al.*, 1997).

As partículas do vírus são levadas lentamente para dentro da célula por um mecanismo de endocitose utilizando componentes citoplasmáticos até chegarem ao núcleo celular (DIGIUSEPPE; BIENKOWSKA-HABA; GUION; SAPP, 2017). No início da infecção, o

genoma permanece nas células da camada basal, como epissomo estável, com baixo número de cópias, sem integração ao genoma da célula hospedeira (DOORBAR; EGAWA; GRIFFIN; KRANJEC *et al.*, 2015).

Após essa etapa, as partículas do HPV são desmontadas em endossomos tardios e/ou em lisossomos, já com a transferência do DNA viral para o núcleo da célula, que é realizada pela proteína do capsídeo viral L2. Inicialmente, o genoma permanece nas células da camada basal, como epissomo estável, sem integração ao genoma da célula hospedeira, o que permite assim a síntese das proteínas precoces E1, E2, E4 e E5 e dá início à replicação celular (Figura 3) (DOORBAR, JOHN, 2006).

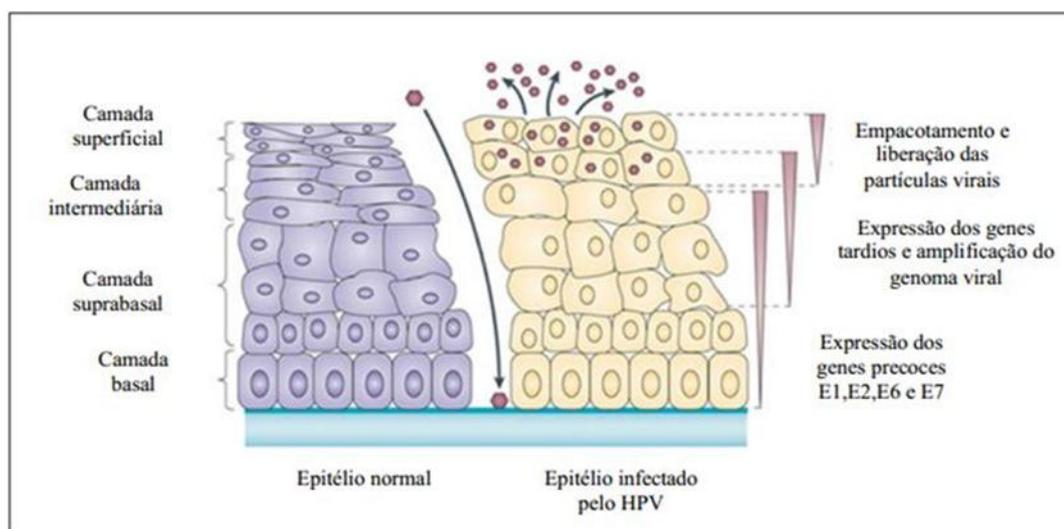


Figura 3 – Ciclo de infecção pelo HPV. Fonte: Adaptado de Moody & Laimins 2010.

Após a divisão celular, uma das células filhas permanece na camada basal e fornece um reservatório de DNA, enquanto a outra célula migra para a camada suprabasal e inicia a diferenciação com subsequente amplificação do DNA viral e expressão dos genes tardios. Nas camadas superiores do epitélio ocorre o empacotamento e a liberação das partículas virais (DOORBAR, J., 2006; HORVATH; BOULET; RENOUX; DELVENNE *et al.*, 2010).

Durante o processo de oncogênese, os genes precoces E2, E6 e E7 estão envolvidos principalmente no potencial oncogênico do HPV. As proteínas E6 e E7 interagem diretamente no mecanismo de controle do ciclo celular, degradando e inativando as proteínas do retinoblastoma (pRB) (105 kilo Dalton - KDa) e a proteína 53 (p53) (53 KDa), o que resulta em acúmulo de mutações oncogênicas, sendo responsáveis pela supressão tumoral, além de apresentarem eficientes mecanismos de evasão do sistema imune (SASAGAWA; TAKAGI; MAKINODA, 2012).

Outro fator determinante no processo de oncogênese tumoral é a integração do DNA do HPV ao genoma humano. O gene E2 torna-se inativo e ocorre o aumento da transcrição dos genes E6 e E7, que por sua vez inativam as proteínas pRB e P53. Essa ação conjugada de E2, E6 e E7 resulta na interrupção de diversos pontos de checagem do ciclo celular, o que leva ao acúmulo de mutações em diversos genes celulares e contribui para a progressão do CCU (DOORBAR, JOHN, 2006).

2.1.4 Resposta imune e a infecção do HPV

A infecção pelo HPV pode ser interrompida dentro de 12 a 24 meses em cerca de 90% dos casos. Entretanto 10% das infecções podem persistir e levar ao desenvolvimento do câncer de colo do útero (SASAGAWA; TAKAGI; MAKINODA, 2012).

As infecções persistentes do HPV podem resultar em lesões precursoras ou neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) de baixo grau (1,2), que podem levar a lesões de alto grau (NIC 3) e depois ao processo de invasão, o que ocasiona o câncer (SCHIFFMAN; DOORBAR; WENTZENSEN; DE SANJOSÉ *et al.*, 2016). O esquema da história natural do câncer de colo do útero, demonstrado na figura 4, evidencia os passos necessários para o desenvolvimento dessa neoplasia. Esses passos estão combinados com a persistência do HPV, a evasão do vírus ao sistema imune, o desenvolvimento de lesões precursoras até ele chegar à invasão, o que ocasiona o câncer (CAMPOS; DEMARCO; BRUNI; DESAI *et al.*, 2021).

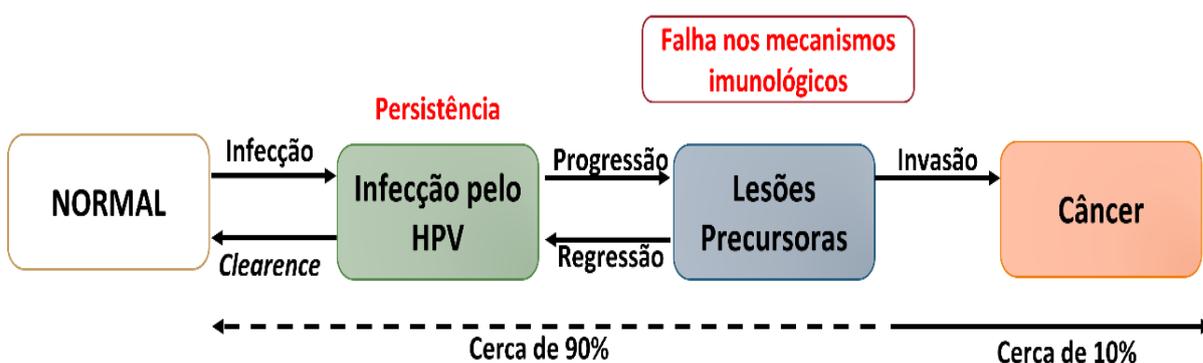


Figura 4. Esquema da história natural do câncer de colo do útero. Fonte: Adaptado de Schiffman *et al.*, 2011.

A resposta imune do hospedeiro tem um papel fundamental no desfecho da doença. Os mecanismos de defesa incluem componentes do sistema imune inato – importante na defesa antiviral –, ativação de sistema complemento e ativação de células NK. Já a resposta imune adaptativa é composta por anticorpos, células T e interferons (IFNs), que têm um papel importante na indução de um estado antiviral nas células infectadas (Figura 5-A)

(STEINBACH; RIEMER, 2018). Dessa forma, cerca de 90% das infecções pelo HPV sofrem a eliminação (*clearance*) antes do início da formação do câncer (SASAGAWA; TAKAGI; MAKINODA, 2012).

Por outro lado, em alguns casos em que a resposta imune não é efetiva (persistência viral), vários fatores podem estar relacionados a isso como o genótipo do HPV envolvido, o mecanismo de evasão viral, o tropismo celular, a instabilidade genômica e o padrão da resposta imunológica do hospedeiro (SCHIFFMAN; RODRIGUEZ; CHEN; WACHOLDER *et al.*, 2010; ZHANG; XU; ZHANG; QIAO, 2020).

O HPV tem a capacidade de permanecer sem ser detectado pelo sistema imunológico do hospedeiro por longos períodos. Ele utiliza o seu ciclo de vida como uma estratégia para não ser detectado. Em fase latente, o vírus permanece com produção reduzida de proteínas virais, com baixa viremia e sem indução de inflamação, evitando a indução de apoptose celular, uma das estratégias de evasão do sistema imune (STEINBACH; RIEMER, 2018).

Outro mecanismo de evasão do sistema imune, especificamente em infecções por HPV de alto risco (genótipos 16 e/ou 18), são as proteínas E6 e E7, que interferem na função de Tyk2, afetando a sinalização de STAT para produção de interferon e ativação de macrófagos, o que influencia na produção de anticorpos e reduz os níveis do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) para apresentação dos antígenos virais, diminuindo assim a ativação de linfócitos T por um grande período. Essa diminuição afeta especificamente a resposta adaptativa pela não expressão do MHC de classe I, comprometendo assim a ativação de linfócitos TCD8+ citotóxicos (CTLs), que desempenham um papel importante na eliminação das células infectadas, o que resulta na inativação de CTLs CD8 e, por sua vez, leva à persistência viral e posteriormente ao desenvolvimento do câncer de colo do útero (Figura 5-B) (STEINBACH; RIEMER, 2018).

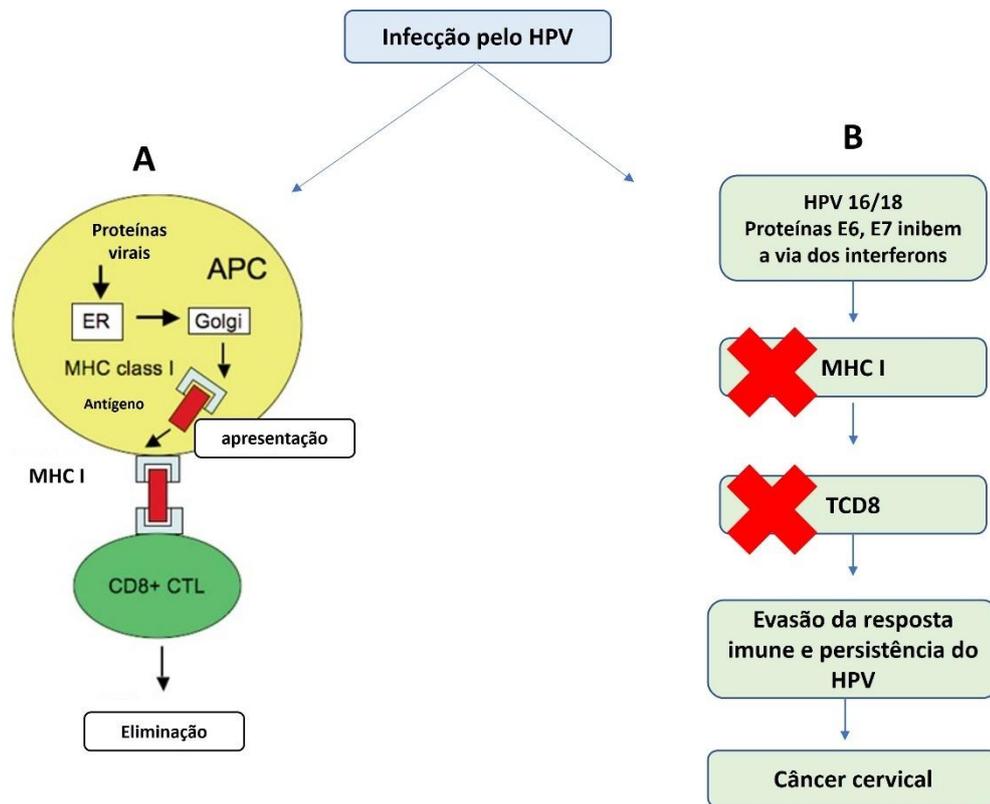


Figura 5 – A: Resposta imune levando à eliminação do vírus. B: Mecanismo de evasão do sistema imune do HPV16 e HPV18. Fonte: Adaptado de Steinbach e Riemer, 2018.

A presença de mutações no HPV 16 pode fornecer um escape da resposta imune, especialmente o acúmulo de mutações sinônimas encontradas nas proteínas do vírus, se quando localizadas em epítomos antigênicos, podem oferecer uma vantagem do vírus ante a resposta imune (EL ALIANI; EL ABID; KASSAL; KHYATTI *et al.*, 2020).

2.2 Câncer de colo do útero (CCU)

O CCU é caracterizado pela replicação desordenada do epitélio de revestimento do órgão, comprometendo o tecido subjacente (estroma) e podendo invadir estruturas e órgãos contíguos ou a distância. É uma doença de desenvolvimento lento, que pode não apresentar sintomas na fase inicial e evoluir para quadros de sangramento vaginal intermitente ou para, após relação sexual, secreção vaginal anormal e dor abdominal associada a queixas urinárias ou intestinais nos casos mais avançados (INCA, 2010).

O colo do útero localiza-se na porção inferior do útero, onde se encontra a abertura do órgão, localizando-se no fundo da vagina. Apresenta formato cilíndrico e possui uma abertura central, que liga o interior do útero à cavidade vaginal, estando mais exposto ao risco de doenças e a alterações relacionadas ao ato sexual (INCA, 2010).

O colo do útero é revestido por dois tipos epiteliais: o epitélio escamoso (na região da ectocérvice) e o epitélio glandular (na região da endocérvice) (Figura 6). Esses dois tipos de epitélio encontram-se na junção escamocolunar (JEC), considerada uma área de constante metaplasia, chamada de *zona de transformação* (REICH; REGAUER; MCCLUGGAGE; BERGERON *et al.*, 2017). O CCU surge nessa área, que apresenta uma célula-tronco especializada conhecida como *célula de reserva cervical*, que se apresenta de formas variáveis e está envolvida no processo natural de metaplasia dessa região (REICH; REGAUER; MCCLUGGAGE; BERGERON *et al.*, 2017).

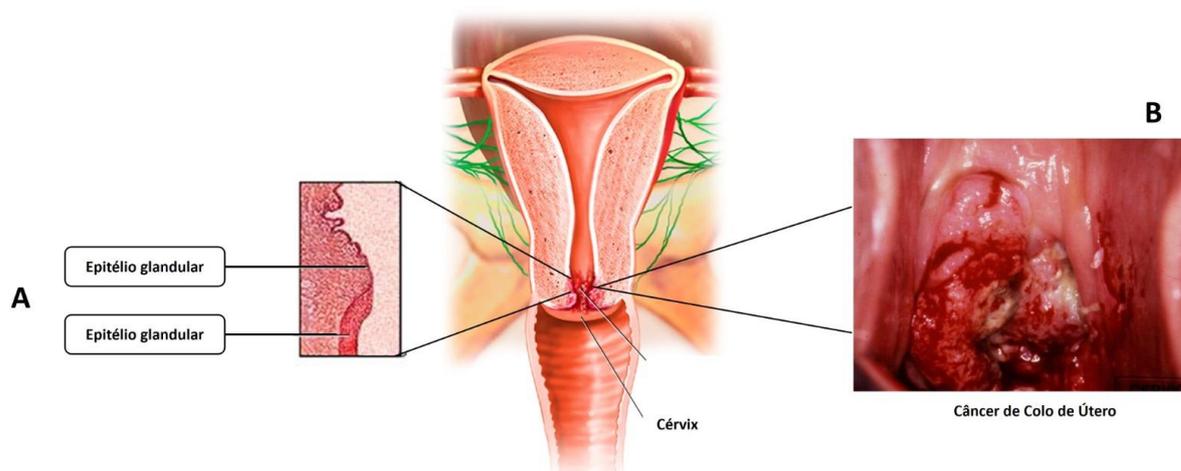


Figura 6 – A: Colo do útero e os epitélios que revestem o órgão. B: representação do câncer de colo do útero. Fonte: Modificada IARC (screening.iarc.fr).

Histologicamente o câncer de colo do útero é classificado com base em critérios morfológicos, como carcinoma de células escamosas (CEC) e adenocarcinoma cervical (ADC). Estes dois tipos histológicos estão envolvidos em cerca de 95% dos casos de câncer de colo do útero, sendo o CEC mais comum em cerca de 70% dos casos, quando comparado ao ADC, com 25%. Do restante, 5% são outros tipos histológicos, classificados como carcinosarcoma, adenoescamoso, entre outros (BHATLA; AOKI; SHARMA; SANKARANARAYANAN, 2021). Recentemente, a OMS forneceu informações detalhadas sobre os tumores que podem aparecer no colo uterino e que são considerados raros (WHO, 2022).

O diagnóstico das lesões precursoras do câncer de colo do útero ocorre por meio de testes de rastreio e, no Brasil, é feito por meio do exame citopatológico ou exame preventivo, que analisa as células do colo do útero buscando alterações celulares (essas alterações variam de acordo com o grau) (INCA, 2016).

Outro exame que auxilia no diagnóstico é a colposcopia, que permite que o médico ginecologista possa examinar o colo do útero por meio de um aparelho chamado *colposcópico*. O diagnóstico definitivo é feito por meio de biópsia, que é a retirada de uma amostra de tecido uterino (no momento do exame colposcópico) para ser analisada por exame histopatológico, que permite a análise de característica de lesão invasiva (INCA, 2016). No Amazonas, o exame colposcópico é realizado apenas em cinco centros de referência públicos, que atendem a todo o Estado por meio do Sistema Único de Saúde.

Após confirmação colposcópica ou histológica, o tratamento excisional das lesões intraepiteliais escamosas de alto grau é realizado por meio de exérese da zona de transformação (EZT) (em inglês *LLETZ – Large loop excision of the transformation zone* ou *LEEP – Loop electrosurgical excision procedure*), feito sob visão colposcópica e anestesia local. É indicado para doença ectocervical ou quando a JEC não ultrapassa o primeiro centímetro do canal endocervical (INCA, 2016). No Amazonas, o tratamento das lesões precursoras é realizado em dois centros públicos, que atendem à demanda do Estado.

Já o tratamento para o câncer de colo do útero é determinado pelo médico conforme o estadiamento clínico e histopatológico. Os tratamentos podem ser: cirurgia (chamada histerectomia total ou parcial, com retirada de linfonodos ou não), radioterapia, braquiterapia e quimioterapia e terapias adjuvantes. No Amazonas, o tratamento das mulheres com CCU é realizado na FCECON (Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas) (INCA, 2016).

A determinação do tamanho e da extensão do câncer é chamada *estadiamento*, que descreverá aspectos do câncer como localização, tamanho do tumor e quais outros órgãos podem estar sendo afetados pela doença. Atualmente, o sistema internacionalmente utilizado para estadiamento do câncer de colo do útero é o FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics), numa escala de I a IV, sendo o estadiamento IV o que indica que a doença está disseminada e propagada para órgãos adjacentes com metástase a distância (Quadro 01) (BHATLA; DENNY, 2018).

Quadro 01. Classificação e estadiamento conforme a FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics).

Estádio		Descrição
I		Carcinoma estritamente confinado ao colo (a extensão para o corpo uterino não é considerada).
IA		Carcinoma invasor diagnosticado somente pela microscopia, com profundidade de invasão máxima $\leq 5\text{mm}$ ^a
	IA1	Invasão do estroma $\leq 3,0\text{mm}$ de profundidade.
	IA2	Invasão do estroma $> 3,0\text{mm}$ e $\leq 5,0\text{mm}$ de profundidade
IB		Carcinoma invasor com invasão de profundidade $> 5\text{mm}$ (maior que estágio IA), lesão limitada ao colo, com o tamanho mensurado no maior diâmetro do tumor ^b
	IB1	Carcinoma invasor $> 5\text{mm}$ de invasão estromal e $\leq 2\text{cm}$ na maior dimensão
	IB2	Carcinoma invasor $> 2\text{cm}$ e $\leq 4\text{cm}$ na maior dimensão.
	IB3	Carcinoma invasor $> 4\text{cm}$ na maior dimensão.
II		O carcinoma se estende além do colo uterino, mas não até o terço inferior da vagina ou da parede pélvica.
IIA		Envolvimento até dois terços superiores de vagina, sem invasão parametrial.
	IIA1	Carcinoma invasor $\leq 4\text{cm}$ na maior dimensão.
	IIA2	Carcinoma invasor $> 4\text{cm}$ na maior dimensão.
IIB		Envolvimento parametrial que não atinge a parede óssea.
III		O carcinoma envolve o terço inferior de vagina e/ou atinge a parede pélvica e/ou causa hidronefrose ou rim não funcionando e/ou envolve linfonodos pélvicos e/ou paraórticos
IIIA		Envolvimento da parede inferior de vagina, sem extensão à parede óssea.
IIIB		Envolvimento até a parede óssea e/ou hidronefrose ou rim não funcionando (a menos que seja de outra causa).

IIIC		Metástases linfonodais pélvicas e/ou paraórticas (incluindo micrometástases) independentemente do tamanho do tumor e da extensão (com anotações para imagem e patologia) ^c
	IIIC1	Metástases linfonodais pélvicas apenas.
	IIIC2	Metástases linfonodais paraórticas.
IV		O carcinoma se estende além da pelve verdadeira ou envolve (com biópsia confirmando) a mucosa da bexiga ou do reto. Um edema bolhoso, por exemplo, não permite alocar o caso como estágio IV.
IVA		Propagação para órgãos adjacentes.
IVB		Metástases a distância.

Fonte: Adaptado de Bhatla N *et al.*, 2018

a) Imagem e avaliação patológica podem ser utilizadas quando disponíveis para suplementar achados clínicos em relação ao tamanho do tumor e sua extensão, em todos os estádios. A avaliação patológica supera as imagens e os achados clínicos. b) O envolvimento do espaço vascular/linfático não muda o estágio. A extensão lateral do tumor não é mais considerada. c) Adicionar anotações para r (imagem) e p (patologia) para indicar o método que foi utilizado para alocar o caso em estágio IIIC. Por exemplo, se for a imagem que detectou a metástase em linfonodo pélvico, o estágio será IIIC1r; se a metástase for confirmada pela patologia, será estágio IIIC1p. O tipo de imagem e a técnica patológica utilizadas deverão sempre ser documentadas. Quando houver dúvida, o menor estágio deverá ser atribuído.

Por meio do estadiamento é possível avaliar o prognóstico da paciente, pois as taxas de sobrevida são diferentes quando a neoplasia está restrita ao órgão de origem ou quando ela se estende a outros órgãos (BHATLA; DENNY, 2018).

2.2.1 Epidemiologia do câncer de colo do útero (CCU)

A epidemiologia do câncer de colo do útero (CCU) continua chamando a atenção. Esse câncer é considerado um problema de saúde pública global e é o quarto tipo de câncer mais comum entre as mulheres no mundo, sendo a principal causa de morte delas em cerca de 42 países. Em nível mundial, o CCU apresentou incidência de cerca de 604.000 casos novos em 2020 e foi responsável por cerca de 341.831 mortes no mesmo ano (SUNG; FERLAY; SIEGEL; LAVERSANNE *et al.*, 2021).

A doença mata 35,7 mil mulheres a cada ano nas Américas – a maioria (80%) desses casos ocorre na América Latina e no Caribe. De acordo com o Global Cancer Observatory (GCO), a maioria dos casos (cerca de 85%) ocorre nas regiões menos desenvolvidas, onde totaliza quase 12% de todos os cânceres femininos (OPAS, 2022).

No Brasil, segundo o INCA, para o ano de 2023 foram estimados 17.010 casos novos de CCU, com uma incidência de 13,25 casos a cada 100 mil mulheres. Dentre as estimativas das regiões do Brasil, a incidência média nacional é de 15,43 a cada 100 mil mulheres. A Região Norte apresenta a maior taxa de incidência, com 16,77 a cada 100 mil mulheres (taxa ajustada) (INCA, 2023).

No Amazonas, o CCU é um dos tumores mais frequentes entre as mulheres (excluindo câncer de pele não melanoma), com uma incidência de 31,71 a cada 100.000 mulheres; e na capital, Manaus, a incidência é de 36,41 a cada 100.000 mulheres (INCA, 2023).

Observa-se que, durante os últimos anos, existe uma tendência do aumento das taxas de mortalidade na Região Norte do Brasil, quando comparada às demais regiões do território nacional (Figura 7). Os números apresentados de mortalidade no Amazonas e em sua capital são alarmantes, sendo observada a taxa de mortalidade de 14,49 a cada 100 mil mulheres para o Estado; e, na capital, uma taxa de 18,09 a cada 100.000 mulheres no ano de 2020 (INCA, 2020).

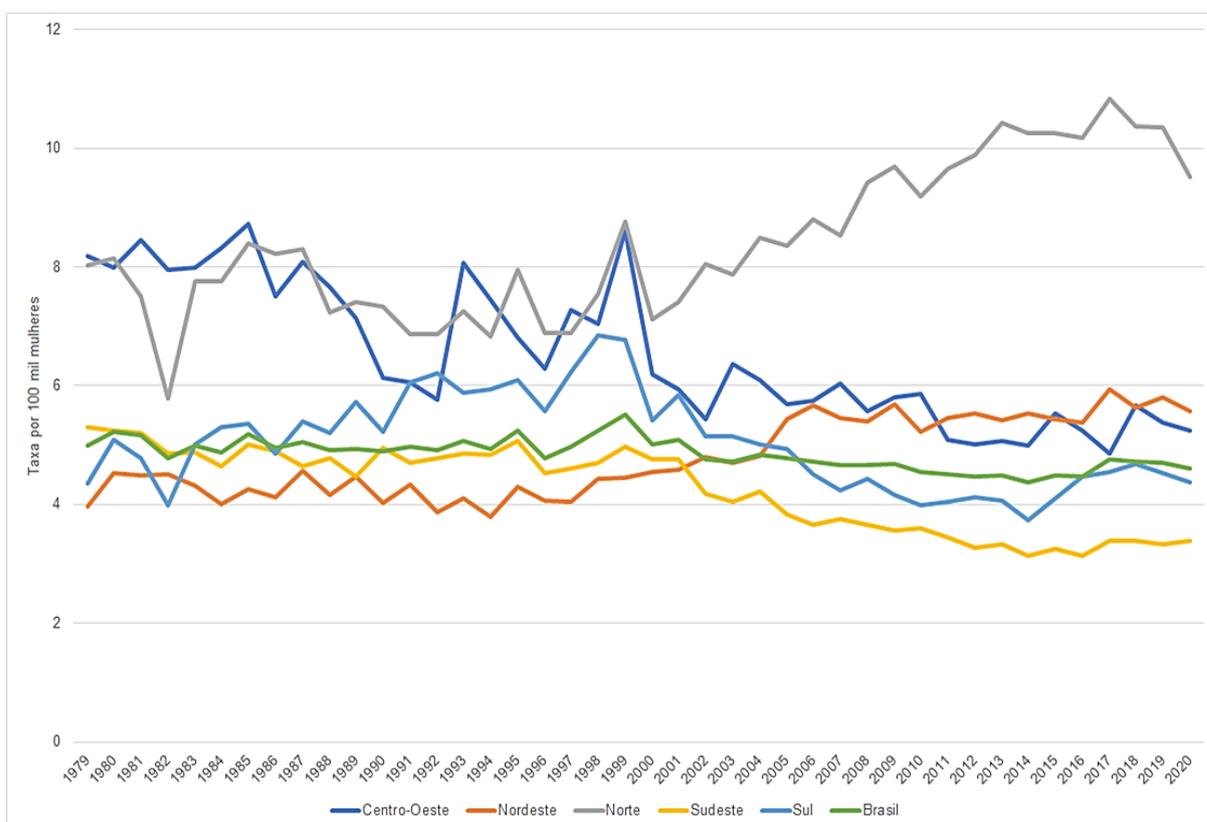


Figura 7 – Taxas de mortalidade de câncer de colo do útero por 100 mil mulheres nas regiões do Brasil, nos anos de 1979 a 2020. Fonte: Instituto Nacional do Câncer (INCA). Regiões determinadas em cores: em azul-escuro Região Centro-Oeste; em laranja Região Nordeste; em cinza Região Norte; em amarelo Região Sudeste; em azul-claro Região Sul; e em verde Brasil.

Em 2020 a Organização Mundial da Saúde aprovou uma resolução chamando a atenção do mundo e defendendo a eliminação do câncer de colo do útero, sendo um marco histórico que divulga uma estratégia global para eliminar esse tipo de câncer (ORGANIZATION, 2020). Foram sugeridas três estratégias com o objetivo de reduzir em mais de 40% os casos novos e as mortes até 2050, que são:

1. Promover a vacinação em cerca de 90% das meninas aos 15 anos de idade.
2. Rastrear 70% das mulheres com um teste de alto desempenho aos 35 anos e depois aos 45 anos.
3. Diagnosticar e tratar 90% das mulheres diagnosticadas com câncer de colo do útero.

Essas ações irão contribuir para a erradicação do CCU. Sabe-se que a doença se caracteriza por seu desenvolvimento lento e, se detectada e tratada precocemente, tem grandes chances de cura em cerca de 90% dos casos quando comparada a outros tipos de câncer (INCA, 2010).

2.3 Sequenciamento de Nova Geração (NGS)

Metodologias como o sequenciamento de nova geração – Next Generation Sequencing, em inglês, ou NGS – proporcionam um impacto profundo na compreensão genética e da biologia do genoma de todos os organismos. No âmbito da pesquisa, o NGS vem sendo implementado para sequenciamento de novos genomas, sequenciamento do transcriptoma, epigenômica, sequenciamento de milhares de vírus e outros microrganismos patogênicos, incluindo bactérias, fungos, parasitas (BALDWIN; FELDMAN; ALWINE; ROBERTSON, 2014; VELÁZQUEZ; PEIX; GÓMEZ-ALONSO, 2011).

As plataformas de NGS se distinguem pela grande escala de leitura, como a capacidade de gerar mais leituras em comprimento menor, precisão, tempo de execução, quantidade de ácidos nucleicos necessários para análise e até o custo do sequenciamento. A aplicabilidade de cada plataforma deverá ser avaliada, pois algumas delas são favoráveis para uso clínico ou para estudo do genoma completo, entre outras aplicações (MELDRUM; DOYLE; TOTHILL, 2011).

Independentemente da plataforma utilizada, o sequenciamento de nova geração permite abordagens que apresentam um grande potencial para manejo clínico, gestão e tratamento da saúde humana. Por meio do NGS é possível identificar variantes genéticas raras ou não, que estão associadas a diversas doenças, o que leva a uma melhor compreensão da patogênese das doenças e cria expectativas para uma medicina personalizada (SABOUR; SABOUR; GHORBAN, 2017; WAARTS; STONESTROM; PARK; LEVINE, 2022).

O câncer é uma das doenças que mais vêm sendo estudadas por meio do NGS, e os resultados estão proporcionando dados para prognóstico e tratamento da doença, como é o caso do sequenciamento do genoma completo, que permite um mapa detalhado de variações de nucleotídeos (SNPs), rearranjos e mudanças em todo o DNA genômico, proporcionando informações genéticas que podem contribuir para o manejo clínico desses pacientes (GUAN; LI; WANG; YI *et al.*, 2012; TAKEDA; SAKAI; TERASHIMA; KANEDA *et al.*, 2015).

Foi o caso de um estudo realizado com amostras do consórcio da Kaiser Permanente Northern California (KPNC), que utilizou o sequenciamento de nova geração e incluiu 472 casos de lesões precursoras do tipo NIC 3, 69 casos de câncer e 255 controles. O estudo observou novos SNPs, grandes deleções contíguas (OR de 27,3, IC de 95% 3,3–222, P =

0,002) em NIC3 que podem estar envolvidas na carcinogênese do HPV 16 (CULLEN; BOLAND; SCHIFFMAN; ZHANG *et al.*, 2015).

Diversas metodologias são utilizadas para sequenciar diferentes regiões do genoma ou o genoma completo. Hoje, a técnica de sequenciamento de nova geração (Next Generation Sequencing) proporciona a obtenção de sequências do genoma completo, o que gera informações importantes para o entendimento de mutações responsáveis pelo tropismo do HPV 16. Essa metodologia pode proporcionar a elucidação da patogenicidade do vírus e a relação com os tipos histológicos. Além disso, é possível entender o processo de transformação e o papel desempenhado por proteínas-chave na persistência viral, inclusive no entendimento da resposta imune contra a infecção (CULLEN; BOLAND; SCHIFFMAN; ZHANG *et al.*, 2015).

Sendo assim, a tecnologia NGS por meio da análise de milhões de sequências obtidas em curto período desponta como ferramenta promissora na investigação de microrganismos presentes em tumores, especificamente no câncer de colo do útero.

3 JUSTIFICATIVA

O HPV 16 é o genótipo prevalente no mundo, considerado um dos carcinógenos humanos mais importantes. As linhagens e sublinhagens e as mutações no genoma do HPV16 estão relacionadas a diferentes riscos no desenvolvimento de lesões precursoras e câncer, além de terem relação com os diferentes desfechos clínicos das pacientes.

Métodos como o Sequenciamento de Nova Geração (NGS) permitem gerar informações do genoma completo do HPV 16 em um curto tempo. A metodologia é tecnicamente viável para pesquisar de forma abrangente a variação genética viral, permitir estudos de associações de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) do HPV16 e, com isso, viabilizar estudos de risco de pré-câncer/câncer cervical, podendo até fornecer pistas sobre a agressividade da doença e o prognóstico das pacientes.

Salienta-se que já existem estudos que evidenciam determinadas mutações do HPV 16 encontradas em regiões do genoma do vírus como E1, E2, E6, E7, L1 e L2, em diferentes regiões geográficas do mundo. Algumas dessas mutações já foram associadas a mecanismos de resposta imune, evidenciando uma evasão do vírus, como também estão relacionadas ao aumento do processo carcinogênico, o que influencia na evolução e em diferentes prognósticos da doença.

Na população amazônica estudos de prevalência do HPV vêm caracterizando o genótipo 16 como o prevalente. Todavia estudos sobre as variantes circulantes na Região Amazônica ainda são escassos. Além disso, o câncer de colo do útero nessa região é um dos tumores mais frequentes entre as mulheres (excluindo câncer de pele não melanoma), com uma incidência de 31,71 a cada 100.000 mulheres; e na capital, Manaus, a incidência é de 36,41 a cada 100.000 mulheres. A região apresenta também achados de mulheres muito jovens com a doença, o que chama a atenção da comunidade científica.

Baseado nessas premissas, faz-se necessário entender o perfil das mulheres amazônicas com câncer de colo do útero e se existe alguma relação das variantes e das mutações no genoma completo do HPV16 com os diferentes tipos histológicos e desfechos clínicos das pacientes. Assim, será possível contribuir com informações regionais para futuros estudos em busca de melhor entendimento da doença, o processo de transformação e o papel desempenhado por proteínas-chave na persistência viral, inclusive no entendimento da resposta imune contra a infecção do HPV 16.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivos Gerais

Descrever as variantes circulantes e as mutações do HPV16 em mulheres amazônidas com câncer de colo do útero e relacioná-las com as características clínicas e patológicas.

4.2 Objetivos Específicos

- a) Descrever as características sociodemográficas e clínicas das pacientes estudadas.
- b) Classificar as variantes circulantes do HPV 16 encontradas na população estudada.
- c) Relacionar as variantes circulantes do HPV 16 encontradas com estadiamento da doença e tipo histológico.
- d) Descrever a frequência das mutações sinônimas/silenciosas e mutações missense/não silenciosas.
- e) Relacionar as características clínicas e histopatológicas das pacientes estudadas com as mutações encontradas no genoma completo do HPV16.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Tipo de Estudo

Trata-se de estudo observacional, descritivo, longitudinal, retrospectivo e prospectivo, que visou descrever as variantes circulantes e as mutações do HPV16 em mulheres amazônicas com câncer de colo do útero e relacioná-las com as características clínicas e patológicas.

Este estudo é um desdobramento de dois outros, intitulados: “Caracterização dos genótipos de HPV e população de rastreamento em pacientes com câncer de colo uterino do Estado do Amazonas” e “Caracterização da infecção por Papillomavirus Humano (HPV) e da coinfeção pelo Epstein-Barr vírus (EBV) nas mulheres com câncer de colo do útero invasor referenciadas para a FCECON”.

Ambos os estudos obtiveram aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas – CEP da Fundação CECON em 15/06/2013 e 15/09/2016, com número de CAAE: 1281221340000004 e 59349816.0.0000.0004, respectivamente (Anexos 1 e 2). Os estudos foram desenhados tendo como base as determinações da Resolução CNS 466, de 12 de dezembro de 2012. As amostras coletadas em ambos os estudos foram armazenadas em biorrepositório e tinham autorização para sequenciamento aprovada em CEP.

5.2 Local do Estudo

O estudo foi desenvolvido na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas – FCECON, instituição de referência em oncologia do Amazonas e do Norte do País.

A FCECON é a única instituição pública do Estado que realiza tratamento oncológico e faz parte da Central Nacional de Regulação de Alta Complexidade do Ministério da Saúde (CNRAC) e é o centro de referência para a Amazônia Ocidental, que recebe pacientes dos sete estados da Região Norte e mais do Maranhão e Mato Grosso, portanto atende à população amazônica. Na Fundação CECON o estudo envolveu os serviços de Ambulatório, Ginecologia, Oncologia Clínica, Centro Cirúrgico e Laboratório de Biologia Molecular.

A etapa do sequenciamento de nova geração foi realizada nas dependências da instituição Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD, em Manaus, em parceria com a Rede Genômica do Amazonas – REGESAM.

5.3 População do Estudo

A população de estudo foi composta de mulheres com diagnóstico de câncer de colo do útero que chegavam para atendimento à Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas.

5.4 Amostragem

A amostragem foi não probabilística: buscou-se obter o maior número possível de amostras no período de 2016 a 2020. A obtenção delas foi dependente da viabilidade de acesso às pacientes, fosse no ambiente ambulatorial, fosse no ambiente hospitalar (internação pré-operatória e realização da cirurgia), da viabilidade clínica da paciente (conforme conduta médica) e da disponibilidade da equipe para coleta.

As análises sociodemográficas, clínicas e patológicas foram obtidas nos prontuários das pacientes desde o momento de sua entrada no estudo até o período de julho de 2023 para que fosse possível realizar a análise de desfechos clínicos.

5.5 Critérios de Elegibilidade

Critérios de inclusão: Mulheres com idade igual ou superior a 18 anos; com diagnóstico histopatológico confirmado de câncer de colo do útero atendidas na Fundação CECON; Em qualquer estadiamento clínico; Sem histórico de tratamento para câncer (cirurgia e/ou quimio/radioterapia).

Critérios de exclusão: Histórico prévio de tratamento de câncer de colo do útero (por quimioterapia/radioterapia e/ou cirurgia).

5.6 Procedimentos de coleta de dados clínicos e epidemiológicos.

Os dados clínicos e epidemiológicos foram coletados por meio dos questionários aplicados nos dois estudos mencionados acima, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TLCE). Outros dados como óbito, tratamento, estadiamento FIGO e desfecho da doença foram coletados no Sistema de Prontuário Eletrônico da FCECON, o I-Doctor, que fornece informações sobre exames, detalhes sobre a clínica da paciente e outras informações pertinentes ao seu acompanhamento.

Após coleta de dados, especialmente os dados de histopatológicos, a equipe se reuniu com médicos cirurgiões oncologistas para padronização do estadiamento, conforme a

sugestão da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO). Além disso, para determinação do prognóstico da paciente em avançado e não avançado, considerou-se o estadiamento FIGO. As pacientes com tumores de estadiamento I foram consideradas com prognóstico não avançado; e as pacientes com tumores de estadiamento II em diante foram consideradas com prognóstico avançado da doença.

5.7 Triagem molecular para detecção e genotipagem do HPV16

A estratégia de triagem molecular utilizada para detecção do HPV 16 está descrita no artigo *Human papillomavirus (HPV) genotyping and clinical features in cervical cancer: hospital in the state of Amazonas* (Apêndice 1).

Após triagem molecular, 59 amostras foram positivas para HPV16 e seguiram para as demais etapas do estudo.

5.8 Preparo das amostras positivas HPV16 para a análise de NGS

Buscando o melhor rendimento para o sequenciamento, optou-se por extrair novamente as amostras de tecido tumoral congeladas, disponíveis em estoque. A extração foi realizada utilizando o *kit* comercial de alta performance ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System, da PROMEGA, seguindo as recomendações do fabricante.

Nas amostras sem tecido tumoral em estoque, utilizou-se uma alíquota de DNA já extraído previamente para a realização da triagem molecular. O *kit* de extração utilizado nessas amostras foi o DNeasy® Blood & Tissue Kit, da Qiagen, seguindo as recomendações do fabricante.

Após extração, o DNA foi quantificado por espectrofotometria por meio do equipamento NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers.

5.9 Amplificação do genoma completo do HPV16

Para amplificação do genoma completo do HPV16, utilizaram-se *primers* combinados (*primers* sobrepostos). Essa opção foi realizada para gerar uma cobertura ideal com o objetivo de gerar material suficiente para o sequenciamento de nova geração.

O desenho dos *primers* foi realizado por meio da ferramenta *Primal Scheme* (<http://primal.zibraproject.org>), que fornece um *pipeline* completo para o desenvolvimento de esquemas de *primers* multiplex eficientes (QUICK; GRUBAUGH; PULLAN; CLARO *et al.*,

2017). A ferramenta tem como objetivo gerar um conjunto de pares de *primers* sobrepostos, cujo tamanho foi determinado pelo comprimento do genoma alvo utilizado NC_001526.4, disponível no *GenBank*.

Foram gerados 28 pares de *primers* (apresentados no Quadro 02), os quais foram divididos em dois conjuntos, denominados: *pool 1* e 2, que posteriormente foram utilizados na amplificação do DNA.

Os *primers* gerados foram confirmados e alinhados por meio de uma ferramenta básica de alinhamento disponível *on-line*, o BLAST (do inglês, *Basic Local Alignment Search Tool*), e alinhados no programa Geneious Prime versão 2013.1.2. Na sequência, eis a referência utilizada para o desenho deles (Figura 8).

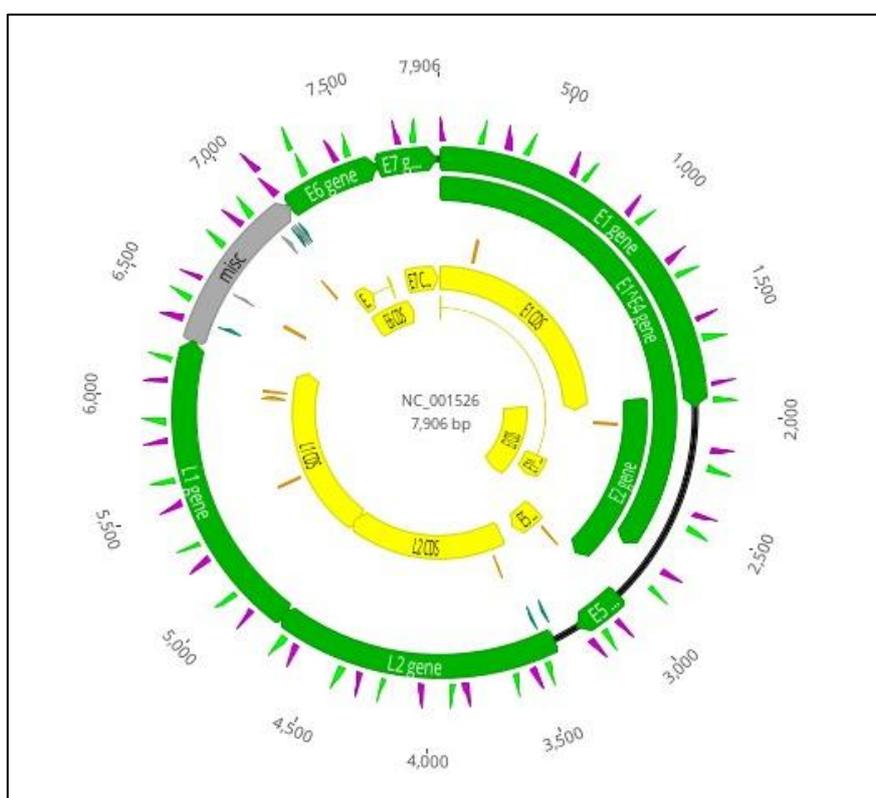


Figura 8. *Primers* alinhados no Geneious Prime versão 2103.1.2 na sequência referência NC_001526.4. Em verde estão os *primers* gerados no *pool 1*; e em lilás, os pares de *primers* do *pool 2*. Fonte: Figura elaborada pelo autor no programa Geneious Prime.]

Quadro 02. Pares de *primers* sintetizados para sequenciamento

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>	<i>Número de pb</i>
HPV16_1_LEFT	CCGAAACCGGTTAGTATAAAAGCA	24
HPV16_1_RIGHT	TTTTCTTCAGGACACAGTGGCT	22
HPV16_2_LEFT	AGAACAGCAATACAACAAACCGT	23
HPV16_2_RIGHT	GAAGCGTAGAGTCACACTTGCA	22
HPV16_3_LEFT	GGAGGATGAAATAGATGGTCCAGC	24
HPV16_3_RIGHT	ATGTGCTGTCTCTGTTTCTGCC	22
HPV16_4_LEFT	CTGATCCTGCAGGTACCAATGG	22
HPV16_4_RIGHT	TCCACTTCAGTATTGCCATACCC	23
HPV16_5_LEFT	TGTAGACAATAATATTAGTCCTAGATTAAGC	33
HPV16_5_RIGHT	CACCAATCGCAACACGTTGATT	22
HPV16_6_LEFT	AGCAAAATTTAAAGAGTTATACGGGGT	27
HPV16_6_RIGHT	GTATCCATTCTGGCGTGTCTCC	22
HPV16_7_LEFT	GCGTAGTACAGCAGCAGCATT	22
HPV16_7_RIGHT	ACAATTTGCTTCCAATCACCTCC	23
HPV16_8_LEFT	TGTGTAGACATTATAAACGAGCAGAAA	27
HPV16_8_RIGHT	AGAAACTAAATTTCCATCCAATGCATTC	29
HPV16_9_LEFT	GGTTACAACCATTAGCAGATGCC	23
HPV16_9_RIGHT	CTGACACACATTTAAACGTTGGC	23
HPV16_10_LEFT	TCCTTTTTCTCAAGGACGTGGT	22
HPV16_10_RIGHT	GCACTTCCACTGTATATCCATGTTT	25
HPV16_11_LEFT	ACTCACAATATAGTAATGAAAAGTGGACA	29
HPV16_11_RIGHT	GTTGGCCAAGTGTGCCTAATA	22
HPV16_12_LEFT	TCATGCGGGTGGTCAGGTAATA	22
HPV16_12_RIGHT	TATGTCCTGTCCAATGCCATGT	22
HPV16_13_LEFT	ACCCATAGTACATTTAAAAGGTGATGC	27
HPV16_13_RIGHT	CAGAGGCTGCTGTTATCCACAA	22
HPV16_14_LEFT	TGCCTATTAATACGTCCGCTGC	22
HPV16_14_RIGHT	ACATGTACCTGCCTGTTTGCAT	22
HPV16_15_LEFT	CATACACATGCACGCTTTTTAATTACA	27
HPV16_15_RIGHT	GAGGCCTTGTCCCAATGGAA	21
HPV16_16_LEFT	TCAAATATTACAATATGGAAGTATGGGTGT	30
HPV16_16_RIGHT	CCTCCAGTTTCTGCAGGTGTTG	22
HPV16_17_LEFT	AATACTGTTACTACTGTTACTACACATAAT	30
HPV16_17_RIGHT	CCAAAAAGTCAGGATCTGGAGCT	23
HPV16_18_LEFT	CAGTGGCAGCCTAGGATTATA	22
HPV16_18_RIGHT	AGTGGTAGTATATGTAGAAGGTGTTATAGT	30
HPV16_19_LEFT	TCGTAGTGGAAAATCTATAGGTGCT	25

HPV16_19_RIGHT	GGATGTAAATAAAAAGTCACCTGCATCA	27
HPV16_20_LEFT	CTGACCAAGCTCCTTCATTAATTCC	25
HPV16_20_RIGHT	ACCAAACCTTATTGGGGTCAGGT	22
HPV16_21_LEFT	ACTACTTGCAGTTGGACATCCC	22
HPV16_21_RIGHT	CTGCAACATTGGTACATGGGGA	22
HPV16_22_LEFT	GAGAATGTATATCTATGGATTACAAACAAACAC	33
HPV16_22_RIGHT	CAGTAGACCCAGAGCCTTTAATGT	24
HPV16_23_LEFT	ACCATATGGCGACAGCTTATTTTT	24
HPV16_23_RIGHT	GTTGAAAAATAAACTGTAAATCATATTCTCCC	33
HPV16_24_LEFT	ACAAATATGTCATTATGTGCTGCCA	25
HPV16_24_RIGHT	TCCTGCTTGTAGTAAAAATTTGCGT	25
HPV16_25_LEFT	CAGCACCTAAAGAAGATCCCCT	22
HPV16_25_RIGHT	ACACAATTAGTAGGTGTTGAAACAATAAGT	30
HPV16_26_LEFT	AGTTGTATGTGTGTTTGTATGTATGGT	27
HPV16_26_RIGHT	AGTGATTCAGTAGTTGCACATAGTG	25
HPV16_27_LEFT	GCCATTTTGTAGCTTCAACCGA	22
HPV16_27_RIGHT	TGAACAATGTATGACTAACCTTTACACA	28
HPV16_28_LEFT	GGCATAAGGTTTAAACTTCTAAGGCC	26
HPV16_28_RIGHT	GTCATATACCTCACGTCGCAGT	22

Para amplificação do genoma completo, foram realizados dois ensaios de PCR – um com o *pool 1*; e outro com o *pool 2*. O protocolo da reação de PCR no termociclador teve início a partir de desnaturação inicial a 98°C durante 3min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 98°C durante 15s, hibridização a 63°C durante 5min, 4°C. A reação teve um volume final de 25µl, e foi utilizado o *master mix* SuperFi II Green PCR (uma polimerase de DNA de revisão com fidelidade >300× Taq da ThermoFisher Scientific®).

Após amplificação, o *pool 1* e o *pool 2* foram fragmentados – processo para adicionar os adaptadores nas amostras –, purificados e foram levados ao preparo da biblioteca conforme protocolo modificado por NAVECA *et al.*, 2021 (NAVECA; NASCIMENTO; DE SOUZA; CORADO *et al.*, 2021).

5.10 Preparação da biblioteca

Para o preparo da biblioteca, foi utilizado o *kit* comercial Illumina COVIDSeq Test (*Illumina*), modificado por NAVECA *et al.*, 2021 (NAVECA; NASCIMENTO; DE SOUZA; CORADO *et al.*, 2021).

Amplicons agrupados normalizados de cada amostra foram usados para preparar bibliotecas de sequenciamento de próxima geração com Nextera XT (no. no. FC-131-1096) e agrupados em 2×250 ciclos (nº MS-103-1002) de execuções de extremidades pareadas.

5.11 Análises de bioinformática

As leituras FASTQ foram geradas pelo *pipeline* Illumina no sistema *BaseSpace* (<https://basespace.illumina.com>). Todos os arquivos foram baixados e importados para o programa Geneious Prime versão 2013.1.2. e foram submetidos a um processo de curadoria, na qual todos os adaptadores foram retirados, cortados, utilizando um fluxo de trabalho personalizado empregando as ferramentas BBDuk e BBDuk (v.37.25) e a sequência referência NC_001526.4 (Figura 9).

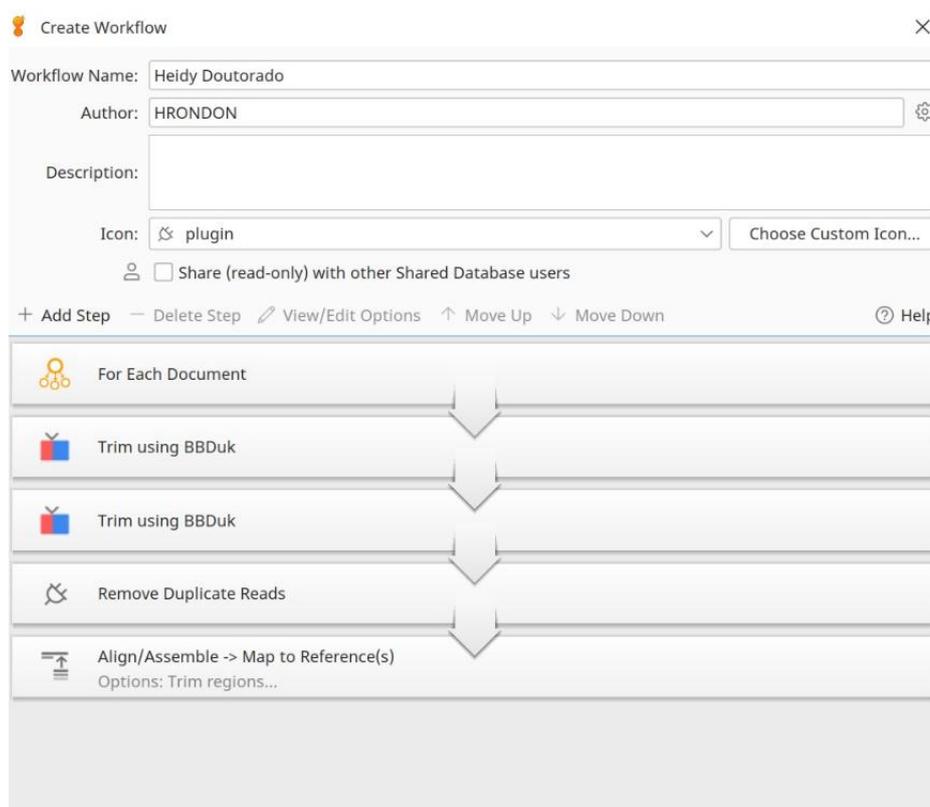


Figura 9. *Workflow* utilizado no Programa Geneious Prime 2013.1.2 em cada *contig* gerado. Imagem da tela do *software*.

Dos *contigs* gerados após o *workflow*, foram analisadas as estatísticas dos nucleotídeos, o número de *reads* gerados e o índice de qualidade. Todas as amostras tiveram ref-seq Q-30 de 99,9% e geraram uma média de 212.000 *reads*, tendo a sequência com maior número de *reads* 560.574; e a de menor número de *reads* 5. Baseada na obtenção dos *reads*,

foi calculada a média da cobertura das sequências, da qual se obteve uma média de cobertura 46.000 *reads* (Apêndice 2).

Dentro do programa Geneious Prime todos os *contigs* foram analisados com um *threshold* de 50% em comparação com a sequência *consensus* utilizada como referência (NC_001526.4), o que atribuiu qualidade total à análise. Buscando melhor cobertura por todo o genoma, quando não houve cobertura no nucleotídeo, foi inserida a letra “N” automaticamente mediante a configuração do programa. Somente as sequências com ambiguidade de até 5% de nucleotídeos “N” foram encaminhadas para a análise de mutações do genoma completo.

Após curadoria das sequências, elas foram alinhadas com um grupo de sequências de genoma completo de HPV 16 obtidas por meio de PAVE (The papillomavirus Episteme) usando o programa MAFT (Multiple Sequence Alignment and NJ).

As reconstruções filogenéticas foram realizadas pelo critério de máxima verossimilhança, usando-se o *modelfinder* e o *ultrafast bootstrap*, e foi encontrado um informativo de 93% no *dataset*. O modelo de substituição nucleotídica determinado e de critério de informação utilizado foi o Akaike Information Criterion (AIC) (KALYAANAMOORTHY; MINH; WONG; VON HAESELER *et al.*, 2017).

Para a criação da árvore filogenética utilizou-se o algoritmo Neighbor Joining, e para a visualização da árvore foi utilizado o programa Figtree versão 1.2.3.

5.12 Análises de mutações

Todas as amostras geraram um arquivo “.fasta” do genoma inteiro; as variantes e os SNPs (do inglês, Single Nucleotide Polimorphism) foram anotados em um banco de dados no Excel Microsoft 365, incluindo gene e/ou alteração de aminoácidos. Todas as variantes de nucleotídeos identificadas foram inspecionadas manualmente no Geneious Prime 2013.1.2 e só foram consideradas variantes verdadeiras se a chamada mostrasse pelo menos 100 leituras.

Todas as mutações encontradas nos diferentes genes foram normalizadas utilizando-se o seguinte cálculo: número de mutações encontradas do gene X / pelo tamanho do gene X; e foram analisadas de acordo com a sua presença em cada amostra analisada.

5.13 Análises estatísticas

O *software* utilizado na análise dos dados foi o programa Epi Info versão 7.2.5 para Windows, desenvolvido e distribuído gratuitamente pelo Centro de Prevenção e Controle de Doenças Norte-Americano – CDC (www.cdc.gov/epiinfo), e o nível de significância fixado nos testes estatísticos foi de 5%.

Na análise das relações dos tipos histológicos, estadiamento e mutações, foi utilizado o teste exato de Fisher, no qual o valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. A relação entre o perfil de mutações e o resultado histopatológico foi avaliada pelo teste Kruskal-Wallis para as análises comparativas entre as variáveis. Todas as análises foram realizadas no programa R Analytics.

A avaliação da sobrevida global foi calculada utilizando-se o método Kaplan-Meier, método não paramétrico, que é o mais utilizado para estimar tempos de sobrevida e probabilidades de sobrevida. Ele resulta em uma função degrau, em que há um degrau para baixo a cada instante em que um evento ocorre. Foi calculado o tempo de sobrevida em meses das participantes do estudo, considerando a data de início de tratamento e a data do óbito (desfecho).

6 RESULTADOS

Durante o período de estudo foram incluídas 59 pacientes com diagnóstico histopatológico de câncer de colo do útero, para as quais, durante a triagem para HPV, foi detectado HPV16 (descritas no apêndice 1). As 59 amostras foram encaminhadas ao sequenciamento do genoma completo do HPV16, conforme os critérios de qualidade propostos no estudo; 26 amostras foram excluídas, de modo que restaram apenas 33 amostras para análise das variantes e mutações do HPV 16 e do perfil clínico e histopatológico de mulheres amazônidas com câncer de colo do útero (Figura 10).

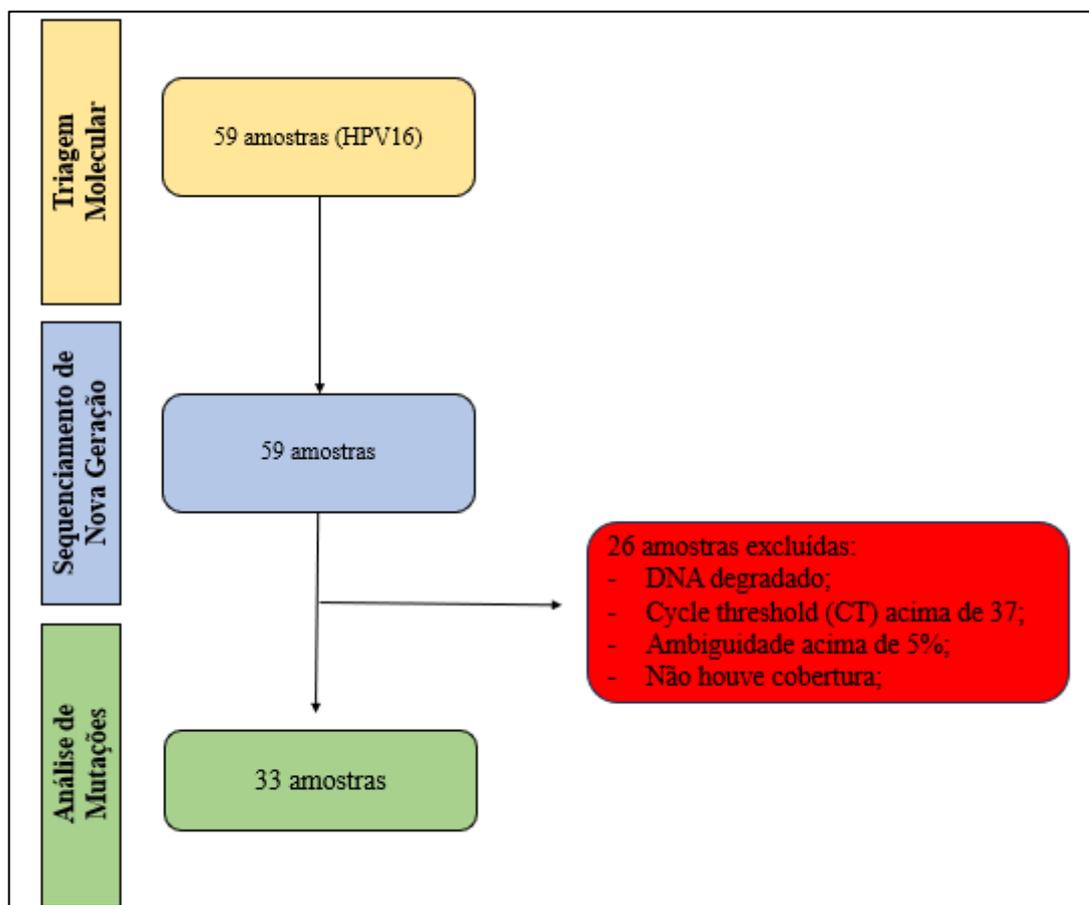


Figura 10. Fluxograma da seleção de amostras para análises de variantes e de mutações do HPV16.

Características epidemiológicas e clínicas das pacientes estudadas

A descrição das características epidemiológicas e clínicas das pacientes com CCU está demonstrada na tabela 01, na qual podemos observar que 27,2% das mulheres tinham entre 46 e 55 anos; cerca de 6,0% apresentavam idade inferior a 25 anos; e destas duas pacientes tinham 20 anos de idade no momento da coleta da amostra. Quanto à raça, 90,9% se declararam brancas; e 84,8% eram do interior do Estado do Amazonas.

Quanto à classificação histológica dos tumores de CCU, 72,5% foram classificados como carcinoma de células escamosas, seguidos de 27,5% de adenocarcinoma. De acordo com a classificação atual do estadiamento FIGO (BHATLA; DENNY, 2018) as mulheres chegaram à instituição com estadiamento variável, indo de IB até IVB, tendo sido o estadiamento mais frequente o IB1, com 18,6%, classificado em seis pacientes. Outra característica importante desse grupo é a classificação do estadiamento em estágio avançado, com metástases linfonodais pélvicas e paraórticas, propagação em órgãos adjacentes e metástases a distância, classificadas em IIIC1, IIIC2, IVA e IVB, totalizando 33,3% (11/33) da população estudada.

Observou-se que, das 33 pacientes do estudo, cinco (15,2%) foram a óbito por conta da doença, tendo sido registrada a CID539.

Tabela 01. Características sociodemográficas e clínicas das pacientes com câncer de colo do útero infectadas por HPV 16, atendidas na FCECON, Amazonas, Brasil

N = 33	% (f¹)	IC (95%)
Idade		
<25	6,0 (2)	0,7 – 20,2
25-35	15,2 (5)	5,1 – 31,9
36-45	21,2 (7)	8,9 – 38,9
46-55	27,2 (9)	13,3 – 45,5
56-64	15,2 (5)	9,8 – 20,8
>65	15,2 (5)	5,1 – 31,9
Tipo Histológico		
Carcinoma de células escamosas (CEC)	72,5 (24)	54,4 - 86,7
Adenocarcinoma (ADC)	27,5 (9)	13,3 - 45,6
Raça		
Branca	90,9 (30)	75,6 – 98,0
Não Branca	9,1 (3)	1,92 – 24,3
Estadiamento		
IB	3,0 (1)	0,08 – 15,7
IB1	18,1 (6)	6,9 – 35,4
IB2	15,1 (5)	5,11 – 31,9
IB3	3,0 (1)	0,08 – 15,7
IIA2	3,0 (1)	0,08 – 15,7
IIB	12,1 (4)	3,4 – 28,2
IIIB	12,1 (4)	3,4 – 28,2
IIIC1	15,1 (5)	5,11 – 31,9
IIIC2	3,0 (1)	0,08 – 15,7
IVA	12,1 (4)	3,4 – 28,2
IVB	3,0 (1)	0,08 – 15,7
Óbito		
Sim	15,2 (5)	5,1 – 31,9
Não	84,8 (28)	68,1 – 94,8

f¹ = frequência absoluta simples; IC - intervalo de confiança 95%

Classificação das variantes do HPV16

Para a construção da árvore filogenética, utilizaram-se as sequências referenciadas no PAVE (The Papillomavirus Episteme), tendo como representação uma sequência para cada sublinhagem. Dentre as 33 amostras analisadas, duas delas ficaram distantes dos clados de referência. Por esse motivo, não foi possível classificar a qual variante essas amostras pertenciam e, por isso, elas foram retiradas da análise para não afetarem a topologia da árvore.

Das 31 amostras analisadas, as variantes encontradas foram as das linhagens A, B, C e D (Figura 11). A linhagem A foi encontrada com maior frequência (51,6%), seguida da linhagem D (41,9%), das C e B (3,2% para cada uma delas). As sublinhagens encontradas foram: A1, B1, C1 e D3. A sublinhagem A1 foi encontrada em 16 amostras, com 51,6%; a sublinhagem D3 foi a segunda mais frequente, com 41,9%; as sublinhagens B1 e C1 foram encontradas – cada uma delas em uma amostra diferente.

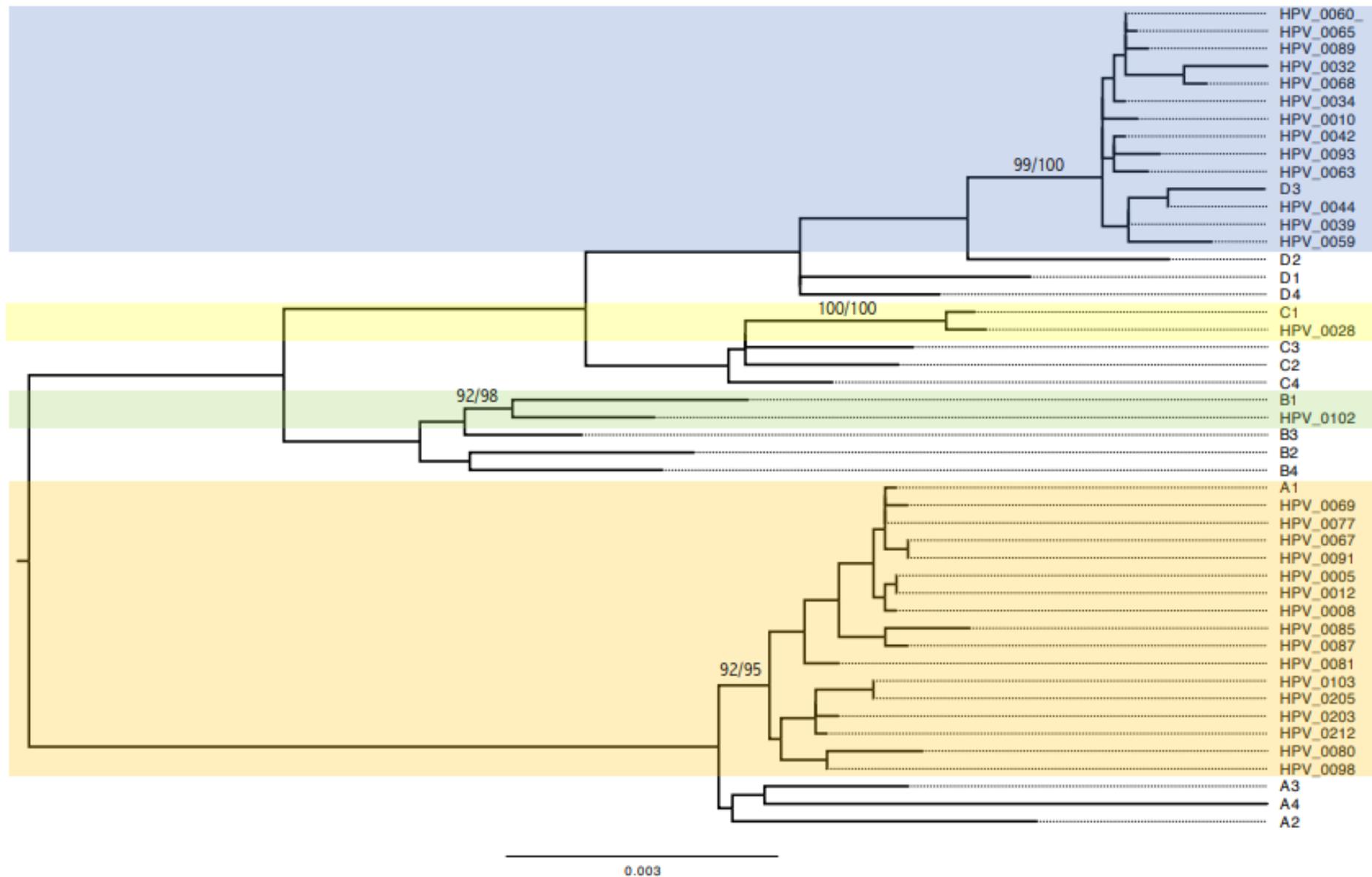


Figura 11. Árvore filogenética do HPV16 com identificação das linhagens. O método utilizado foi o Neighbour-Joining (para a construção das filogenias) os valores são de ultrafast bootstrap (UFB) e SH-aLRT. Em cor azul amostras da linhagem D3, em cor amarela amostras da linhagem C1, em cor verde amostras da linhagem B1 e em laranja amostras da linhagem

Relação das variantes encontradas com estadiamento da doença e tipo histológico

Por meio da análise descritiva da relação do grau de disseminação do tumor (estadiamento) das pacientes do estudo com as sublinhagens identificadas, observou-se que a sublinhagem A1 foi identificada em todos os graus de estadiamento. Em contrapartida, as sublinhagens B1 e C1 foram identificadas no estadio II e III (Tabela 02). Observou-se que o estadiamento I foi mais frequente em D3 e o estadiamento III mais frequente em A1. Houve diferença estatisticamente significativa entre as sublinhagens do HPV16 identificadas e o estadiamento FIGO da doença ($p=0,014$).

Tabela 02. Relação do estadiamento FIGO da doença com as sublinhagens de HPV16 encontradas nas mulheres com câncer de colo do útero atendidas na FCECON, Amazonas, Brasil.

Estadiamento	A1	B1	C1	D3	TOTAL
FIGO	% (fi)	% (fi)	%(fi)	%(fi)	
I	30,8% (4)	-	-	69,2% (9)	13
II	25,0% (1)	-	25,0% (1)	50,0% (2)	4
III	80,0% (8)	10,0% (1)	-	10,0% (1)	10
IV	75,0% (3)	-	-	25,0% (1)	4
TOTAL	16	1	1	13	31

fi: frequência absoluta; FIGO: *International Federation of Gynecology and Obstetrics*; CEC – carcinoma de células escamosas; ADC – adenocarcinoma; % calculada por linha.

Na tabela 03, está demonstrada a relação das sublinhagens encontradas e o tipo histológico do tumor. Observou-se que, nas amostras com diagnóstico de CEC, a sublinhagem mais frequente foi a A1, com 59,1%; e que, nas amostras com diagnóstico de ADC, a sublinhagem mais frequente foi a D3, com 66,7%. Ao realizar a relação das sublinhagens do HPV16 identificadas com o tipo histológico do tumor, não houve diferença estatisticamente significativa entre elas ($p = 0,362$).

Tabela 03. Relação das sublinhagens do HPV16 com os tipos histológicos dos tumores em mulheres com câncer de colo do útero atendidas na FCECON, Amazonas, Brasil.

Sublinhagem N =31	Tipo Histológico			
	CEC (n=22)		ADC (n=9)	
	%	fi	%	fi
A1	59,1	13	33,3	3
B1	4,5	1	-	-
C1	4,5	1	-	-
D3	31,8	7	66,7	6

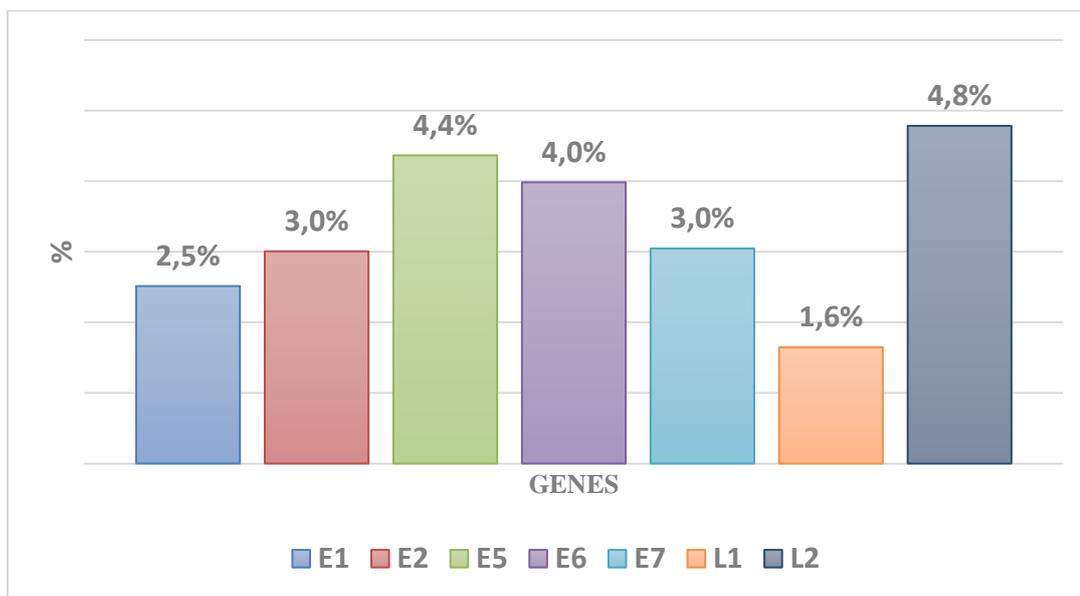
fi: frequência absoluta; CEC – carcinoma de células escamosas; ADC – adenocarcinoma

Descrição de mutações encontradas no genoma completo do HPV16

Para a avaliação das mutações no genoma completo do HPV16, optou-se por classificá-las em mutações sinônimas/silenciosas e mutações missense/não silenciosas. Nas 33 amostras analisadas foram encontradas 1.628 mutações, das quais 55,4% foram de mutações sinônimas/silenciosas; e 44,6%, mutações missense/não silenciosas. As mutações identificadas no genoma completo foram descritas conforme a posição genômica e os correspondentes genes (Apêndice 3).

Foi avaliada a presença de polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs) nos genomas analisados. Essa avaliação considerou a substituição de um único nucleotídeo (adenina, guanina, citocina ou timina) por outro, comparada com a sequência referência NC_001526.4. Foram encontrados 211 SNPs no genoma; e, após realização do cálculo de normalização, identificou-se que o gene L2 apresentou 4,8% de SNPs, seguido do gene E5, com 4,4%, e do E6, com 4,0% (Gráfico 01).

Gráfico 01: Frequência dos SNPs encontrados nos genes E1, E2, E5, E6, E7, L1 e L2 após normalização, de acordo com o tamanho de cada gene.



Após a análise das mutações com mudança de aminoácidos em todo o genoma, foram encontradas 71 mutações missense/não silenciosas. A frequência e a posição no gene das mutações encontradas estão descritas na tabela 4. Dentre as mutações mais frequentes nas 33 amostras analisadas, destacam-se: A3115C (I44L) isoleucina>leucina, A5570G (T266A) treonina>alanina e A3178G (I65V) isoleucina>valina, encontradas em 60,6% das amostras analisadas, respectivamente; e a mutação A4362C (L330F) leucina>fenilalanina encontrada em 19 amostras (57,6%).

Tabela 04. Mutações missense/não silenciosas encontradas no genoma completo do HPV16.

	GENE	Posição no Genoma	Variação	MS	N.º de Amostras	%
1	E1	189	A/C	E63D	1	3,0
2	E1	232	C/G	Q78E*	13	39,4
3	E1	299	G/A	G100E*	13	39,4
4	E1	502	T/A	C168S*	14	42,4
5	E1	532	G/A	E178K	1	3,0
6	E1	562	C/G	Q188E*	11	33,3
7	E1	658	T/A	S220T	13	39,4
8	E1	880	C/A	L294M*	12	36,4
9	E1	978	A/G	I326M	14	42,4
10	E1	1356	G/C	E452D*	13	39,4
11	E1	1373	C/G	T458S*	12	36,4
12	E1	1385	G/A	R462K*	13	39,4
13	E1	1786	G/A	E596K	11	33,3
14	E2	1996	C/A	H35Q*	14	42,4
15	E2	2295	C/A	T135K	13	39,4
16	E2	2297	C/T	H136Y	3	9,1
17	E2	2317	A/C	E142D	10	30,3
18	E2	2318	G/A	A143T	14	42,4
19	E2	2360	T/A	L157I	11	33,3
20	E2	2385	G/A	R165Q	13	39,4
21	E2	2652	C/A	L59T	13	39,4
22	E2	2674	A/C	Q66P	12	36,4
23	E2	2702	T/G	H75Q	14	42,4
24	E2	2820	C/A	T310K*	13	39,4
25	E2	2914	G/T	W341C	13	39,4
26	E2	2923	C/A	D344E*	14	42,4
27	E5	2995	C/T	L4F	4	12,1
28	E5	3004	G/A	A7T	1	3,0
29	E5	3115	A/C	I44L	20	60,6
30	E5	3127	C/G	L48V	12	36,4
31	E5	3178	A/G	I65V*	20	60,6
32	L2	3422	A/G	K8R	3	9,1
33	L2	3736	T/C	S122P*	13	39,4
34	L2	3886	C/T	P172S	1	3,0
35	L2	4099	G/A	V243I*	4	12,1
36	L2	4105	A/G	T245A*	8	24,2
37	L2	4170	A/T	L266F*	10	30,3
38	L2	4177	T/C	S269P*	13	39,4
39	L2	4186	G/C	D272H	2	6,1
40	L2	4362	A/C	L330F*	19	57,6
41	L2	4367	C/G	T332S	5	15,2
42	L2	4372	G/A	D334N*	13	39,4
43	L2	4375	C/T	P335S	2	6,1

44	L2	4403	T/A	I344K	1	3,0
45	L2	4426	A/C	T352P*	4	12,1
46	L2	4505	C/T	S378V	12	36,4
47	L2	4522	T/G	S384A*	10	30,3
48	L2	4525	G/A	V385I*	12	36,4
49	L2	4542	A/C	L390F	2	6,1
50	L2	4631	T/C	I420T*	13	39,4
51	L2	4642	G/A	A424T*	12	36,4
52	L2	4656	T/G	I428M	1	3,0
53	L2	4700	C/G	A443G	13	39,4
54	L1	5000	C/T	H76Y*	13	39,4
55	L1	5301	C/A	T176N*	12	36,4
56	L1	5316	A/C	N181T*	11	33,3
57	L1	5570	A/G	T266A*	20	60,6
58	L1	5618	T/C	S282P*	2	6,1
59	L1	5831	A/C	T353P*	10	30,3
60	L1	5939	A/T	T389S*	9	27,3
61	L1	6196	G/T	L474F*	13	39,4
62	E6	7140	A/C	T6P	2	6,1
63	E6	7174	G/T	R17I	3	9,1
64	E6	7179	T/G	L19V	1	3,0
66	E6	7187	G/T	Q21H	13	39,4
67	E6	7362	A/C	I80L	2	6,1
68	E6	7377	C/T	H85Y*	13	39,4
69	E6	7392	T/G	L90V	15	45,5
70	E7	7689	A/G	N29S*	1	3,0
71	E7	7810	G/A	G43E	2	6,1

MS: Mutações missense/não silenciosas – A: adenina – G: guanina – C: citosina; T: timina. Em verde mutações com maior frequência nos genomas analisados. * mutações descritas na literatura; % frequência da mutação encontrada no grupo amostral.

Os genes E6 e E7 possuem papel importante no processo de carcinogênese; atuam interagindo e inibindo as atividades dos supressores tumorais e permitindo a transformação maligna das células. No gene E6 foram identificadas sete mutações missense. As mutações com maior frequência foram: T7392G (L90V) leucina>valina (45,5%), C7377 (H85Y) histidina>tirosina (39,4%) e G7187T (Q21H) glutamina>histina (39,4%). A mutação C7377 (H85Y) foi encontrada em 13 amostras analisadas (39,4%).

Já no gene E7 foram encontradas duas mutações missense: a mutação G7810A (G43E) glicina>glutamato e A7689G (N29S) asparagina>serina (Tabela 04).

Um dado relevante encontrado neste estudo foi a presença de mutações missense no gene E5. Foram identificadas três mutações com maior frequência: A3115C (I44L) isoleucina>leucina (60,6%), A3178G (I65V) isoleucina>valina (60,6%) e C3127G (L48V) leucina>valina (36,4%).

Relação das características clínicas e histopatológicas com as mutações encontradas no genoma completo do HPV16

As características clínicas – idade, óbito pela doença, estadiamento FIGO e prognóstico da paciente – observadas em cada uma das pacientes, juntamente com a avaliação da presença ou da ausência das mutações missense no gene E6, E7 e E5 do HPV16, estão descritas no quadro 3. A descrição completa das mutações encontradas está no apêndice 4.

Quanto à análise do prognóstico, observou-se que 60,6% das pacientes foram consideradas com prognóstico avançado da doença. Salienta-se que cinco (15,1%) pacientes foram a óbito devido ao CCU, e todas apresentavam CEC e estágio avançado da doença. Quando se fez a análise das variantes encontradas nessas pacientes, observou-se que a sublinhagem A1 foi encontrada em quatro delas; e em uma não foi possível identificar a sublinhagem. Dentre essas pacientes, a maioria apresentava idade superior a 50 anos; e uma tinha idade de 26 anos.

A sobrevida global das pacientes incluídas no estudo foi de 82,0% (IC95% 69,0% - 98,0%). A figura 12 demonstra o tempo em meses de sobrevida de cada paciente do estudo. A relação entre a sobrevida global e as mutações identificadas não apresentou diferenças estatísticas (dados não apresentados).

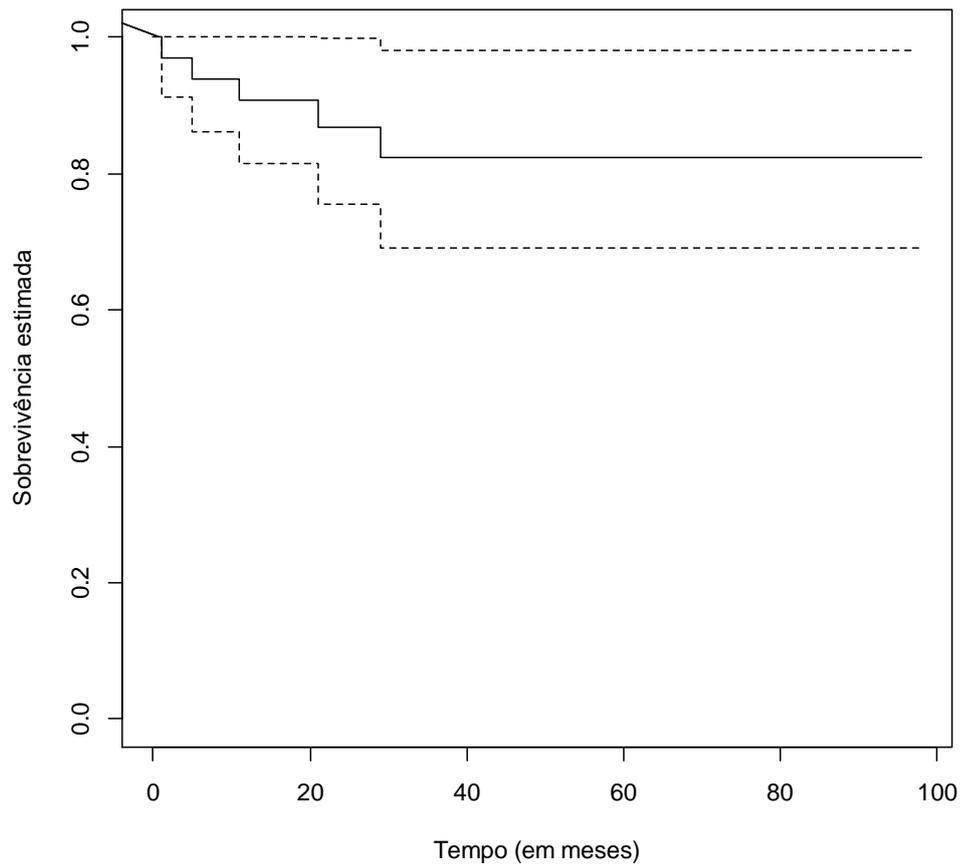


Figura 12 – Análise de sobrevida global das pacientes do estudo pelo método de Kaplan-Meier. A linha preta representa o intervalo de confiança (IC 95%).

Ao analisarmos o prognóstico da doença e a presença da mutação missense E6 nas pacientes, não foram observadas diferenças estatísticas ($p=0.174$). O mesmo aconteceu quando analisamos o prognóstico da doença com a mutação missense E7 ($p=0.188$).

Quadro 03. Relação das mutações do HPV 16 encontradas de acordo com as características clínicas das pacientes analisadas.

Paciente	Idade	Variante	ÓBITO	FIGO	Agressividade tumor	TIPO HISTOLÓGICO	MS E6	MS E7	MS E5
CCU 01	78	A1	S	IVB	A	CEC	N	N	N
CCU 02	59	A1	S	IIIC1	A	CEC	S	S	N
CCU 03	37	D3	N	IVA	A	CEC	S	N	S
CCU 04	72	A1	N	IVA	A	CEC	N	N	N
CCU 05*	50	SI	N	IIB	A	CEC	-	-	-
CCU 06	53	C1	N	IIB	A	CEC	S	S	S
CCU 07	32	D3	N	IB	NA	CEC	S	N	S
CCU 08	52	D3	N	IB1	NA	ADC	S	N	S
CCU 09	73	D3	N	IB2	NA	ADC	S	N	S
CCU 10	58	D3	N	IB1	NA	CEC	S	N	S
CCU 11	20	D3	N	IB1	NA	ADC	S	N	S
CCU 12	37	D3	N	IB2	NA	CEC	S	N	S
CCU 13	36	D3	N	IIA2	A	ADC	S	N	S
CCU 14	61	D3	N	IB2	NA	ADC	S	N	S
CCU 15	52	D3	N	IB3	NA	ADC	S	N	S
CCU 16	46	A1	N	IB1	NA	CEC	N	N	S
CCU 17	37	D3	N	IB2	NA	CEC	N	N	S
CCU 18	48	A1	N	IB1	NA	CEC	N	N	N
CCU 19	38	A1	N	IB2	NA	CEC	N	N	N
CCU 20	42	A1	N	IIIC1	A	ADC	S	N	S
CCU 21	34	A1	N	IB1	NA	CEC	S	N	N
CCU 22	54	A1	N	IIIC1	A	ADC	N	N	N
CCU 23	50	A1	N	IIIB	A	CEC	N	N	N
CCU 24	39	D3	N	IIB	A	CEC	S	N	S
CCU 25	61	A1	N	IIIC1	A	CEC	N	N	S
CCU 26	74	SI	S	IVA	A	CEC	N	N	N
CCU 27	52	D3	N	IIIC2	A	CEC	S	N	S
CCU 28	24	A1	N	IIIB	A	CEC	N	N	S
CCU 29	79	B1	N	IIIB	A	CEC	S	N	S
CCU 30	35	A1	N	IIIB	A	ADC	S	N	S
CCU 31	30	A1	N	IIB	A	CEC	S	N	S
CCU 32	26	A1	S	IVA	A	CEC	S	N	S
CCU 33	59	A1	S	IIIC1	A	CEC	S	N	S

CCU: câncer de colo do útero; CEC: carcinoma de células escamosas; ADC: adenocarcinoma; M: mutação; S: sim; N: não; A: avançado; NA: não avançado; SI: sem informação; FIGO: International Federation of Gynecology and Obstetrics; *paciente da qual não foi possível analisar as mutações no genoma.

7 DISCUSSÃO

Este estudo descreveu as variantes circulantes e as mutações do HPV 16 em mulheres amazônicas com câncer de colo do útero e as relacionou com o perfil clínico histopatológico das mulheres em tratamento na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas.

O uso de uma técnica de alto rendimento – o sequenciamento de nova geração (NGS) – permitiu obter centenas de leituras de sequências individuais de cada paciente. Essa é uma vantagem em relação à metodologia de Sanger, que fornece 25% da sequência analisada, evidenciando-se assim a relevância de utilizar o NGS, pois a ferramenta permite uma análise mais completa, ou seja, fornece dados sobre o material analisado, que poderão ter ou não interpretação clínica. No caso do HPV16, pode determinar a variabilidade nos diferentes pacientes, ou até evidenciar que em diferentes regiões geográficas o processo carcinogênico causado pelo vírus pode ter nuances diferentes (CULLEN; BOLAND; SCHIFFMAN; ZHANG *et al.*, 2015).

No presente estudo, 26 amostras sequenciadas não atenderam aos critérios de qualidade para o alcance do seu objetivo. É sabido que o NGS apresenta taxas de erros (>0,1-1%), e estas podem estar relacionadas a várias etapas no fluxo do seu trabalho. Para essas amostras, não foi possível extrair novamente o DNA, e o DNA utilizado poderia estar degradado ou ter carga viral baixa (amostras com CT (Cycle Threshold) acima de 36) (QUICK; GRUBAUGH; PULLAN; CLARO *et al.*, 2017). Além disso, especificamente nas regiões em que não foi possível uma cobertura ideal, isso pode ter relação com a limitação dos *primers* sobrepostos, a qual é propensa a quedas de cobertura que podem resultar em cobertura incompleta do genoma, especialmente em taxas mais baixas, e a perda de regiões 5' e 3', que caem em regiões não cobertas por pares de *primers*, o que acreditamos que possa ter acontecido em algumas das amostras sequenciadas (QUICK; GRUBAUGH; PULLAN; CLARO *et al.*, 2017). Neste estudo, seguiram-se medidas para assegurar a qualidade das sequências obtidas.

Avaliaram-se os dados sociodemográficos e clínicos das pacientes com diagnóstico de câncer de colo do útero. Levando-se em consideração a história natural da doença, é esperado encontrar uma prevalência da infecção por HPV na população geral, mais alta em mulheres mais jovens. Em regiões como África, América Central existe outro pico de infecção do HPV16 em mulheres com 40 anos de idade ou mais, que pode influenciar na alta prevalência

nesses países de CCU (SCHIFFMAN; DOORBAR; WENTZENSEN; DE SANJOSÉ *et al.*, 2016). Nesse estudo, observaram-se pacientes com câncer de colo do útero com idade mais jovem (<25 anos) e maior frequência em mulheres com idade entre 46-55 anos.

Embora o acesso ao exame preventivo tenha aumentado no Brasil e a vacina para HPV esteja disponível no Sistema Único de Saúde (SUS), a tendência aumentada da taxa de mortalidade nessa doença ainda é uma realidade na população amazônica. No Estado do Amazonas a Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas – FCECON é a instituição pública de referência em oncologia e recebe pacientes dos estados da Região Norte do Brasil e até imigrantes oriundos de países da América Latina (FCECON, 2019).

O diagnóstico tardio revela, sobretudo, as dificuldades de acesso aos serviços e aos programas de saúde; pouca capacidade do SUS em absorver a demanda; dificuldades dos gestores municipais e estaduais quanto à definição de fluxos na assistência que possibilitem encaminhamento adequado das mulheres com exame alterado (8;9). Observou-se neste estudo que as mulheres são diagnosticadas tardiamente e chegam à instituição com tumor avançado. Essa clínica afeta diretamente o prognóstico das pacientes e muitas vezes leva ao óbito, dado observado em cinco pacientes deste estudo.

O Ministério da Saúde calculou a proporção de casos de colo do útero no Brasil de 2000 a 2019 e observou que cerca de 35% dos casos são diagnósticos em estadiamento avançado III e IV (INCA, 2022). Neste estudo, a maioria (33,3%) das pacientes apresentaram estadiamento mais avançado, dado que se reflete na trajetória que a paciente tem até chegar ao atendimento e ao tratamento na instituição. Observou-se neste estudo que a maioria das mulheres eram oriundas do interior do Estado.

O HPV16 pode ser classificado em quatro linhagens – A, B, C e D –, que podem ser subdivididas em sublinhagens (A1-4, B1-4, C1-D e D1-4). Em classificações mais antigas as variantes do HPV eram divididas em variantes europeias, compreendendo a linhagem A; e as variantes não europeias, compreendendo as linhagens B, C e D (BURK; HARARI; CHEN, 2013). As variantes do HPV16 vêm sendo associadas à persistência e à progressão do câncer de colo do útero, sendo as variantes não europeias (asiáticas, americanas e africanas) com um risco aumentado para o CCU. Destaca-se ainda um risco aumentado de 3,8 vezes em mulheres brancas, negras e hispânicas de desenvolver a doença invasiva quando associada a essas variantes (ZUNA; TULLER; WENTZENSEN; MATHEWS *et al.*, 2011). Em outros casos as variações genéticas do HPV16 vêm sendo classificadas com risco diferencial para

adenocarcinoma/adenocarcinoma *versus* carcinoma de células escamosas (BURK; TERAI; GRAVITT; BRINTON *et al.*, 2003).

A diferença da distribuição dessas variantes do HPV16 vem sendo evidenciada em países e em regiões. No presente estudo, a linhagem A foi encontrada com maior frequência (51,6%), seguida da linhagem D (41,9%).

No Brasil, estudos já relataram a prevalência das variantes do HPV16 em determinadas regiões, em mulheres com citologia normal ou citologia alterada, lesões de alto grau, câncer de colo do útero (NICOLÁS-PÁRRAGA; GANDINI; PIMENOFF; ALEMANY *et al.*, 2016; SCHIFFMAN; RODRIGUEZ; CHEN; WACHOLDER *et al.*, 2010; XI; KIVIAT; HILDESHEIM; GALLOWAY *et al.*, 2006). Um estudo realizado na Região Nordeste com mulheres do Estado do Maranhão incluiu 120 mulheres com diagnóstico de câncer de colo do útero. Destas, 47 foram positivas para HPV16 e foram encaminhadas ao sequenciamento automatizado; e observou-se que a variante A foi encontrada em 49% nas amostras identificadas, seguida da variante D, com 43% (DA SILVA; DA SILVA BATISTA; BASTOS; CUNHA *et al.*, 2020).

No Rio de Janeiro, um estudo de coorte incluiu 594 mulheres diagnosticadas com câncer de colo do útero, o qual tinha como objetivo relatar a diversidade genética do HPV16 e HPV18. Da população incluída, 378 (63,6%) apresentavam infecção pelo HPV16 e foram encaminhadas ao sequenciamento pela metodologia capilar, de Sanger, e o sequenciamento foi realizado dos fragmentos LCR e E6. A variante A foi a mais frequente, em cerca de 57% das amostras, seguida da linhagem D, com 25%; e as variantes C e B foram encontradas em cerca de 5% das amostras (VIDAL; FELIX; CHAVES; PATURY *et al.*, 2016).

Na Região Norte, foi realizado um estudo na cidade de Belém, que investigou a prevalência de variantes do HPV16 em biópsias de 228 mulheres com NIC3 e câncer invasor, no período de 1992 a 1996. As variantes foram analisadas pela sequência de LCR, e foram detectadas as variantes europeias, asiáticas, americanas e africanas, porém a mais frequente foi a linhagem asiático-americana, com 39,5% (JUNES-GILL; SICHERO; MACIAG; MELLO *et al.*, 2008).

Outro estudo, realizado em Juruti, município do Estado do Pará, incluiu 143 mulheres e obteve oito amostras positivas para HPV16. Estas foram sequenciadas utilizando-se a sequência E6 do genoma viral; e como resultado a variante mais frequente foi classificada

como europeia (87,5%), seguida da variante americana (12,5%) (TAMEGÃO-LOPES; SOUSA-JÚNIOR; PASSETTI; FERREIRA *et al.*, 2014).

A sublinhagem mais frequente nesse estudo foi a A1 (51,6%); já a sublinhagem D3 foi a segunda mais frequente (41,9%). Um dos maiores estudos que descreveram isolados do HPV 16 foi realizado em 2019 e envolveu 7.116 amostras de diversos biobancos (biobanco da Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), Instituto Catalão de Oncologia, Instituto Nacional do Câncer dos EUA, Clínica de Displasia da Universidade de Oklahoma, Proyeto Guanacaste). As amostras foram amplificadas por meio da metodologia NGS e foram classificadas de acordo com a variante encontrada. Os isolados sequenciados pertenciam predominantemente à linhagem A, com 78,7%, seguida da linhagem D, com 9,2%. O mesmo estudo demonstrou a dispersão das sublinhagens do HPV 16 de acordo com a região geográfica; e globalmente a prevalente foi a sublinhagem A1, com cerca de 70%, encontrada na Europa, América do Sul/Central, América do Norte, Sul da Ásia e presente até no norte da África, África subsaariana e leste da Ásia, com 15-30%. Especificamente na América do Sul/Central a linhagem D foi a mais comum, representando 23,8%, e a sublinhagem D3 foi a predominante na maioria das regiões (CULLEN; BOLAND; SCHIFFMAN; ZHANG *et al.*, 2015).

No atual estudo, a sublinhagem A1 foi encontrada nos dois tipos histológicos CEC e ADC. Um estudo realizado na Itália incluiu 171 amostras de biópsias, das quais 39 tumores com resultado histopatológico de adenocarcinoma e 132 com resultado histopatológico de CEC. No total 63 amostras foram sequenciadas para identificação das variantes; e como resultado a variante europeia foi a mais comum em adenocarcinoma (61,0%) do que em CEC (58,0%), o que sugere uma forte associação dessa variante com o tipo histológico ADC (TORNESELLO; LOSITO; BENINCASA; FULCINITI *et al.*, 2011). O mesmo aconteceu em um estudo multicêntrico que comparou a distribuição das variantes do HPV 16 e 18 com os tipos histológicos CEC e ADC. Para o HPV 16, o estudo sequenciou a região longa de controle não codificante e o gene E6 das amostras e classificou-os em grupos de linhagem: europeu, asiático-americano e africano 1 e africano 2; identificou ainda que variantes não europeias foram observadas em 42% dos ADC e 16% nos tipos histológicos CEC, o que sugere que as variantes intratípicas da linhagem asiático-americana do HPV16 foram responsáveis pela diferença entre os grupos histológicos (BURK; TERAJ; GRAVITT; BRINTON *et al.*, 2003).

Quanto a distribuição geográfica das sublinhagens e dos tipos histológicos. um estudo realizado com amostras parafinadas do Instituto Catalão de Oncologia (ICB), em Barcelona, selecionaram-se 118 amostras de tumor com resultado histopatológico de CEC; 120 para ADC; e 53 para o tipo histológico adenoescamoso, a partir de uma análise geográfica dos continentes da Europa, América Central-Sul e África. Como alvo para o sequenciamento, optou-se pela região codificante – os genes E6 e L2 do HPV 16. Observou-se a prevalência da variante A1 em CEC, com 76,9% a 97% para diferentes regiões geográficas, do que quando comparadas com ADC (28,6% a 63,3%). No entanto o estudo demonstrou um aumento das variantes D em ADC e em adenoescamoso, quando feita a comparação com CEC. Na América Central-Sul esse acréscimo foi de 63,3% (NICOLÁS-PÁRRAGA; ALEMANY; DE SANJOSÉ; BOSCH *et al.*, 2017).

Mirabello *et. al* (2016) analisaram mulheres de um consórcio do projeto KPNC e incluíram 1.107 indivíduos controle, 906 NIC2, 1.008 NIC3, 69 CEC, 85 adeno *in situ*, 40 ADC e classificaram as variantes encontradas nessa população. Nesse estudo, chama a atenção uma forte associação da sublinhagem A4 a um risco aumentado de câncer, especificamente com o tipo histológico ADC (OR=9,81, IC95%); e a sublinhagem D2 com maior risco aumentado de lesões glandulares, adeno *in situ* (OR=29,22 / IC 95%) e adenocarcinoma (OR = 137,34 / IC 95%). Esses estudos demonstram a diversidade das variantes do HPV16, correlacionadas com os tipos histológicos; e nosso estudo descreve informações sobre essas variantes em nossa região (MIRABELLO, LISA; YEAGER, MEREDITH; CULLEN, MICHAEL; BOLAND, JOSEPH F *et al.*, 2016).

Quanto à relação do estadiamento FIGO com as sublinhagens, no presente estudo observaram diferenças estatísticas. Observou-se que nas sublinhagens A1 e D3 encontrou-se estadiamentos de I ao IV. Em um estudo realizado no Maranhão, o estadiamento foi bastante diversificado, e identificou a maior frequência da variante A no estágio III, não sendo encontradas diferenças estatísticas entre o FIGO e as sublinhagens (DA SILVA; DA SILVA BATISTA; BASTOS; CUNHA *et al.*, 2020).

A relação da infecção persistente pelo HPV de alto risco já é bem elucidada e caracterizada como maior risco para o desenvolvimento do CCU. Sabe-se ainda que diversos fatores irão influenciar nessa persistência, tais como a imunidade do hospedeiro, o genótipo do HPV, a instabilidade genômica, entre outros. Especificamente, o HPV 16 é o genótipo mais carcinogênico, e este é composto por linhagens variantes e sublinhagens filogenéticas

que podem conduzir a um risco de desenvolvimento de lesões precursoras e de CCU (SCHIFFMAN; DOORBAR; WENTZENSEN; DE SANJOSÉ *et al.*, 2016).

Cullen *et al.* (2015) usaram o método de sequenciamento de nova geração para elucidarem ainda mais os mecanismos de risco e usaram as análises moleculares do HPV para avaliar as associações desses dados genéticos com a carcinogênese do HPV (CULLEN; BOLAND; SCHIFFMAN; ZHANG *et al.*, 2015). O presente estudo, que também utilizou o sequenciamento de nova geração, descreveu os SNPs e as mutações no genoma completo do HPV16 na população amazônica, trazendo dados ainda não descritos nessa região. Sabe-se que variações de nucleotídeos e substituições são amplamente associadas com as linhagens específicas do HPV16. O presente estudo não se propôs a analisar os SNPs encontrados e relacioná-los com as linhagens do HPV16.

Mutações missense ou não silenciosas acontecem quando uma substituição de nucleotídeos leva a uma substituição de aminoácidos. Isso pode ou não resultar em variante patogênica, ou seja, em alguns casos a substituição daquele aminoácido não altera a estrutura da proteína; e, dependendo dessas alterações, isso pode impactar no desenvolvimento do CCU. As regiões E1 e E2 do HPV 16 têm papel fundamental para o ciclo de vida viral, sendo essenciais na replicação e na amplificação do epissomo viral no núcleo das células infectadas, na regulação da transcrição, na iniciação da replicação do DNA (BURK; CHEN; VAN DOORSLAER, 2009). No atual estudo, não analisamos o gene E4, pois este está sobreposto nos genes E1 e E2; consideramos apenas os genes E1 e E2.

Também no presente estudo, foram encontradas mutações no gene E1. Estas foram também descritas em um estudo realizado na população chinesa, o qual associou essas mutações a um risco de lesões precursoras e a CCU. Dentre as mutações encontradas, 27 não silenciosas foram estatisticamente significativas quando se comparou com os grupos controle e casos de CCU. As mutações encontradas foram: C1096G (Q78E), G1163A (G100E), T1366A (C168S), C1426G (Q188E), T1522A (S220T), C2237G (T458S), G2220C (E452D) e G2249A (R462K). Além disso, mutações como A1668G (A268A) e G2650A (E596K) foram encontradas apenas no grupo controle do estudo, o que sugere que essas mutações podem desempenhar um papel importante no processo (YAO; YAN; DAI; LI *et al.*, 2019).

Outro estudo analisou o polimorfismo de 91 amostras nos genes E1 e E2 para tentar entender melhor a relação entre essas variações do gene e o CCU. Especificamente foram encontradas mutações missense no domínio de transativação de HPV 16, que desempenha um papel importante no ciclo de vida viral. As mutações encontradas foram: G1964A, G2129A,

G2204A, C2295A, G2385A, T2410G; e a troca de aminoácidos foi, respectivamente, de ácido aspártico em asparagina (D25N), ácido glutâmico em lisina (E80K), alanina em treonina (A105T), treonina em lisina (T135K), arginina em glutamina (R165Q) e ácido aspártico em glutâmico ácido (D173E) (WANG; WANG; FU; ZHANG *et al.*, 2021).

A mutação missense T310K encontrada no presente estudo (troca de treonina em lisina) está localizada no domínio de ligação ao DNA do HPV 16. Essa mutação pode alterar os fatores de transcrição celular, e estes interagem com o LCR, resultando assim no aumento da expressão das proteínas E6 e E7, o que pode aumentar ainda mais o processo carcinogênico (CHEUNG; CHEUNG; YU; CHAN, 2013).

Estudos sugerem que deleções da estrutura do E2 podem acarretar um prognóstico ruim em pacientes com tumor de HPV16 positivo, assim como a integração do DNA viral, a destruição dos genes E1 ou E2 e a perda da atividade inibitória da proteína E2 no promotor precoce também serão etapas importantes no processo da transformação maligna (EVANS; JAMES; BRISTOL; NULTON *et al.*, 2019). Em nosso estudo foram encontradas algumas mutações missense não descritas na literatura, que podem futuramente ajudar a entender a relação delas no desenvolvimento do CCU.

Os HPVs são agrupados em gêneros com base no gene L1. Além disso, as vacinas recombinantes contra o HPV foram projetadas com base nessa mesma proteína. Observa-se que variações na sequência do gene L1 do HPV podem induzir alterações estruturais na proteína, podendo alterar a afinidade e a interação de anticorpos monoclonais com os epítomos da proteína L1 e influenciar na resposta imune, assim como no reconhecimento do hospedeiro ao vírus (OUMESLAKHT; ABABOU; BADAoui; QMICHOU, 2021).

Uma metanálise analisou estudos que buscaram descrever as variações nas sequências do gene L1 de HPVs alvos de vacinas tais como HPV 16, HPV 18, HPV 58, HPV 45, HPV52; e como resultado encontraram quatro mutações missense no HPV16 nas sequências do gene L1: T353P, H228D, T266A e T292A – todas localizadas nos epítomos de ligação do peptídeo, levando a uma modificação dele, o que sugere uma alteração nos anticorpos monoclonais (OUMESLAKHT; ABABOU; BADAoui; QMICHOU, 2021). No presente estudo, a mutação T2666A foi encontrada em 20 amostras analisadas.

Um estudo que analisou várias substituições de aminoácidos dentro das alças imunodominantes do gene L1 encontrou cinco alterações localizadas em regiões hipervariáveis, encontradas em áreas geográficas específicas. As mutações T176N, N181T e

T353P são predominantes na América e na Ásia; a T266A prevalente nas regiões da Europa e da América; e a mutação T389S, nas Américas (TSAKOGIANNIS; NIKOLAIDIS; ZAGOURI; ZOGRAFOS *et al.*, 2022). Essas mutações também foram encontradas na população do estudo; e salienta-se que são necessários estudos mais aprofundados para entender o impacto dessas mudanças na resposta imune do hospedeiro, assim como entender se essas mutações propiciam ao vírus uma evasão da vacina.

Quando ao gene L2, a variabilidade genética descrita em amostras clínicas é limitada. No presente estudo, foi possível encontrar uma grande variedade de mutações missense. Um estudo relatou encontrar 17 mutações de aminoácidos com alta frequência na população observada (D43E, S122P, V243I, T245A, L266F/V, S269P, L330F, D334N, T351P/S, T352P/A, S378V/F, S384A, V385I, I420T, A424T, I428L, A443G). A mutação missense S122P (serina>prolina) já foi encontrada em isolados de HPV 16, sendo mais comum na América do Sul, em cerca de 46% dos isolados. Essa mutação sugere que essa troca de aminoácido é comum a uma região do epítopo do MHC I e do MHC II, no entanto ainda não se sabe como essa alteração pode influenciar na resposta imune de células B e T. Outras mutações com maior frequência encontradas foram a S269P e a L330F, observadas em isolados asiáticos (TSAKOGIANNIS; NIKOLAIDIS; ZAGOURI; ZOGRAFOS *et al.*, 2022).

O gene E5 contribui na transformação e no processo de tumorigênese, e a expressão de sua proteína pode ter funções de supressão do IFN, suprimindo a resposta viral do hospedeiro. Estudos que correlacionassem a resposta imunológica e as variações do gene E5 seriam necessários para entender melhor o processo carcinogênico (DIMAIIO; PETTI, 2013). Atualmente as alterações nos genes E5 se associam às sublinhagens do HPV16. O presente estudo descreve cinco mutações missense com alta frequência na população estudada.

Os genes E6 e E7 possuem papel importante no processo de carcinogênese e atuam interagindo e inibindo as atividades dos supressores tumorais e permitindo a transformação maligna das células. O gene E6 codifica oncoproteínas, que facilitam a degradação proteossomal mediada por ubiquitina da proteína supressora de tumor, a p53; e a oncoproteína E7 se liga e inativa a pRb para desencadear a progressão do ciclo celular (CHEUNG; CHEUNG; YU; CHAN, 2013). Mutações no oncogene E6/E7 poderiam potencialmente alterar sua capacidade de degradar a p53 e, assim, alterar o seu nível de expressão.

O gene E7 foi mais conservado em relação às mutações missense encontradas no atual estudo. Essa conservação de E7, que interrompe a função do Rb, é crítica para a carcinogênese do HPV16; ainda assim estudo mais robustos são necessários para analisar

essas poucas alterações específicas no DNA e investigar se são causadas devido à atividade antiviral das citidinas deaminases humanas da APOBEC3 (MIRABELLO; YEAGER; YU; CLIFFORD *et al.*, 2017).

8 CONCLUSÕES

Este estudo descreveu as variantes circulantes e as mutações do HPV 16 e relacionou-as com as características clínicas e patológicas de mulheres com câncer de colo do útero na Região Amazônica.

Os dados apresentam informações sobre a diversidade das variantes, bem como os SNPs e as mutações missense encontradas no genoma do HPV 16. A metodologia de sequenciamento completo do genoma do HPV 16 por sequenciamento de nova geração (NGS) permitiu, em larga escala, identificar características na variabilidade intratípica do HPV 16, as quais talvez, com uso de outras metodologias, poderiam passar despercebidas.

Este estudo forneceu informações sobre a diversidade intratípica das variantes circulantes do HPV 16 nas mulheres amazônidas. Os dados descritos fornecem informações regionais que podem ser utilizadas futuramente para a ampliação do entendimento da relação das variantes circulantes na Região Amazônica com o processo de transformação, o papel desempenhado por proteínas-chave na persistência viral, além do entendimento da resposta imune contra a infecção do HPV 16.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALDWIN, D. A.; FELDMAN, M.; ALWINE, J. C.; ROBERTSON, E. S. Metagenomic assay for identification of microbial pathogens in tumor tissues. *mBio*, 5, n. 5, p. e01714-01714, Sep 16 2014.
- BERNARD, H. U.; BURK, R. D.; CHEN, Z.; VAN DOORSLAER, K. et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, 401, n. 1, p. 70-79, May 25 2010.
- BERUMEN, J.; ORDOÑEZ, R. M.; LAZCANO, E.; SALMERON, J. et al. Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J Natl Cancer Inst*, 93, n. 17, p. 1325-1330, Sep 05 2001.
- BHATLA, N.; AOKI, D.; SHARMA, D. N.; SANKARANARAYANAN, R. Cancer of the cervix uteri: 2021 update. *Int J Gynaecol Obstet*, 155 Suppl 1, n. Suppl 1, p. 28-44, Oct 2021.
- BHATLA, N.; DENNY, L. FIGO Cancer Report 2018. *Int J Gynaecol Obstet*, 143 Suppl 2, p. 2-3, Oct 2018.
- BOSCH, F. X.; MANOS, M. M.; MUÑOZ, N.; SHERMAN, M. et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst*, 87, n. 11, p. 796-802, Jun 07 1995.
- BOSCH, F. X.; MUÑOZ, N. The viral etiology of cervical cancer. *Virus Res*, 89, n. 2, p. 183-190, Nov 2002.
- BOSCH, F. X.; MUÑOZ, N.; DE SANJOSÉ, S. Human papillomavirus and other risk factors for cervical cancer. *Biomed Pharmacother*, 51, n. 6-7, p. 268-275, 1997.
- BRUNI, L.; DIAZ, M.; CASTELLSAGUÉ, M.; FERRER, E. et al. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *Journal of Infectious Diseases*, 202, n. 12, p. 1789-1799, 2010.
- BURK, R. D.; CHEN, Z.; VAN DOORSLAER, K. Human papillomaviruses: genetic basis of carcinogenicity. *Public Health Genomics*, 12, n. 5-6, p. 281-290, 2009.
- BURK, R. D.; HARARI, A.; CHEN, Z. Human papillomavirus genome variants. *Virology*, 445, n. 1-2, p. 232-243, 2013.

BURK, R. D.; TERAJ, M.; GRAVITT, P. E.; BRINTON, L. A. et al. Distribution of human papillomavirus types 16 and 18 variants in squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the cervix. *Cancer Res*, 63, n. 21, p. 7215-7220, Nov 01 2003.

CAMPOS, N. G.; DEMARCO, M.; BRUNI, L.; DESAI, K. T. et al. A proposed new generation of evidence-based microsimulation models to inform global control of cervical cancer. *Prev Med*, 144, p. 106438, Mar 2021.

CASTLE, P. E.; RODRIGUEZ, A. C.; PORRAS, C.; HERRERO, R. et al. A comparison of cervical and vaginal human papillomavirus. *Sex Transm Dis*, 34, n. 11, p. 849-855, Nov 2007.

CASTRO, M.; FARIAS, I.; BORBOREMA-SANTOS, C.; CORREIA, G. et al. Prevalence of human papillomavirus (HPV) type 16 variants and rare HPV types in the central Amazon region. *Genet Mol Res*, 10, n. 1, p. 186-196, 2011.

CHEUNG, J. L.; CHEUNG, T. H.; YU, M. Y.; CHAN, P. K. Virological characteristics of cervical cancers carrying pure episomal form of HPV16 genome. *Gynecol Oncol*, 131, n. 2, p. 374-379, Nov 2013.

CLIFFORD, G. M.; SMITH, J. S.; PLUMMER, M.; MUÑOZ, N. et al. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer*, 88, n. 1, p. 63-73, Jan 13 2003.

COLPANI, V.; SOARES FALCETTA, F.; BACELO BIDINOTTO, A.; KOPS, N. L. et al. Prevalence of human papillomavirus (HPV) in Brazil: A systematic review and meta-analysis. *PloS one*, 15, n. 2, p. e0229154, 2020.

COMBES, J. D.; GUAN, P.; FRANCESCHI, S.; CLIFFORD, G. M. Judging the carcinogenicity of rare human papillomavirus types. *Int J Cancer*, 136, n. 3, p. 740-742, Feb 01 2015.

CORRÊA, D. A. D.; VILLELA, W. V.; ALMEIDA, A. M. D. Desafios à organização de programa de rastreamento do câncer do colo do útero em Manaus-AM. *Texto & Contexto-Enfermagem*, 21, n. 2, p. 395-400, 2012.

CORRÊA, G. J.; TALHARI, S.; SANTOS, C. Prevalência do Papilomavírus Humano (HPV) em mulheres portadoras de lesões intra-epiteliais escamosas de alto grau e carcinoma epidermóide invasor de colo uterino [Thesis]. Manaus: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas, 2005.

COSTA-LIRA, E.; JACINTO, A.; SILVA, L.; NAPOLEÃ, P. et al. Prevalence of human papillomavirus, Chlamydia trachomatis, and Trichomonas vaginalis infections in Amazonian women with normal and abnormal cytology. *Genetics and Molecular Research*, 16, n. 2, 2017.

CULLEN, M.; BOLAND, J. F.; SCHIFFMAN, M.; ZHANG, X. et al. Deep sequencing of HPV16 genomes: A new high-throughput tool for exploring the carcinogenicity and natural history of HPV16 infection. *Papillomavirus Res*, 1, p. 3-11, Dec 01 2015.

DA SILVA, R. L.; DA SILVA BATISTA, Z.; BASTOS, G. R.; CUNHA, A. P. A. et al. Role of HPV 16 variants among cervical carcinoma samples from Northeastern Brazil. *BMC Womens Health*, 20, n. 1, p. 162, Aug 01 2020.

DE ARAUJO SOUZA, P. S.; SICHERO, L.; MACIAG, P. C. HPV variants and HLA polymorphisms: the role of variability on the risk of cervical cancer. *Future Oncol*, 5, n. 3, p. 359-370, Apr 2009.

DE OLIVEIRA, C. M.; BRAVO, I. G.; SANTIAGO E SOUZA, N. C.; GENTA, M. L. et al. High-level of viral genomic diversity in cervical cancers: A Brazilian study on human papillomavirus type 16. *Infect Genet Evol*, 34, p. 44-51, Aug 2015.

DE OLIVEIRA, C. M.; FREGNANI, J. H. T. G.; CARVALHO, J. P.; LONGATTO-FILHO, A. et al. Human papillomavirus genotypes distribution in 175 invasive cervical cancer cases from Brazil. *BMC Cancer*, 13, n. 1, p. 1-8, 2013.

DE OLIVEIRA, G. R.; VIEIRA, V. C.; ÁVILA, E. C.; FINGER-JARDIM, F. et al. Human papillomavirus type distribution and HPV16 intratype diversity in southern Brazil in women with and without cervical lesions. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 112, n. 7, p. 492-498, Jul 2017.

DE SANJOSE, S.; BROTONS, M.; PAVON, M. A. The natural history of human papillomavirus infection. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*, 47, p. 2-13, 2018.

DE SANJOSE, S.; QUINT, W. G.; ALEMANY, L.; GERAETS, D. T. et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *The lancet oncology*, 11, n. 11, p. 1048-1056, 2010.

DE SANJOSE, S.; QUINT, W. G.; ALEMANY, L.; GERAETS, D. T. et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol*, 11, n. 11, p. 1048-1056, Nov 2010.

DE SANJOSE, S.; WHEELER, C. M.; QUINT, W. G. V.; HUNT, W. C. et al. Age-specific occurrence of HPV16- and HPV18-related cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 22, n. 7, p. 1313-1318, Jul 2013.

DE SANJOSÉ, S.; DIAZ, M.; CASTELLSAGUÉ, X.; CLIFFORD, G. et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *The Lancet infectious diseases*, 7, n. 7, p. 453-459, 2007.

DE SANJOSÉ, S.; SERRANO, B.; TOUS, S.; ALEJO, M. et al. Burden of Human Papillomavirus (HPV)-Related Cancers Attributable to HPVs 6/11/16/18/31/33/45/52 and 58. *JNCI Cancer Spectr*, 2, n. 4, p. pky045, Oct 2018.

DE VILLIERS, E.-M.; FAUQUET, C.; BROKER, T. R.; BERNARD, H.-U. et al. Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324, n. 1, p. 17-27, 2004.

DE VILLIERS, E. M. Relationship between steroid hormone contraceptives and HPV, cervical intraepithelial neoplasia and cervical carcinoma. *Int J Cancer*, 103, n. 6, p. 705-708, Mar 01 2003.

DE VILLIERS, E. M. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology*, 445, n. 1-2, p. 2-10, Oct 2013.

DEMARCO, M.; HYUN, N.; CARTER-POKRAS, O.; RAINE-BENNETT, T. R. et al. A study of type-specific HPV natural history and implications for contemporary cervical cancer screening programs. *EClinicalMedicine*, 22, p. 100293, May 2020.

DIGIUSEPPE, S.; BIENKOWSKA-HABA, M.; GUION, L. G.; SAPP, M. Cruising the cellular highways: How human papillomavirus travels from the surface to the nucleus. *Virus Res*, 231, p. 1-9, Mar 02 2017.

DIMAIO, D.; PETTI, L. M. The E5 proteins. *Virology*, 445, n. 1-2, p. 99-114, Oct 2013.

DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical science*, 110, n. 5, p. 525-541, 2006.

DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)*, 110, n. 5, p. 525-541, May 2006.

DOORBAR, J.; CUBIE, H. Molecular basis for advances in cervical screening. *Mol Diagn*, 9, n. 3, p. 129-142, 2005.

- DOORBAR, J.; EGAWA, N.; GRIFFIN, H.; KRANJEC, C. et al. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev Med Virol*, 25 Suppl 1, n. Suppl Suppl 1, p. 2-23, Mar 2015.
- DOORBAR, J.; QUINT, W.; BANKS, L.; BRAVO, I. G. et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*, 30, p. F55-F70, 2012.
- DUARTE, D. V.; VIEIRA, R. C.; BRITO, E. B. D.; PINHEIRO, M. D. C. N. et al. Prevalence of human papillomavirus infection and cervical cancer screening among riverside women of the Brazilian amazon. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, 39, n. 7, p. 350-357, 2017.
- EGAWA, N.; EGAWA, K.; GRIFFIN, H.; DOORBAR, J. Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. *Viruses*, 7, n. 7, p. 3863-3890, Jul 16 2015.
- EL ALIANI, A.; EL ABID, H.; KASSAL, Y.; KHYATTI, M. et al. HPV16 L1 diversity and its potential impact on the vaccination-induced immunity. *Gene*, 747, p. 144682, Jul 15 2020.
- EVANDER, M.; FRAZER, I. H.; PAYNE, E.; QI, Y. M. et al. Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol*, 71, n. 3, p. 2449-2456, Mar 1997.
- EVANS, M. R.; JAMES, C. D.; BRISTOL, M. L.; NULTON, T. J. et al. Human Papillomavirus 16 E2 Regulates Keratinocyte Gene Expression Relevant to Cancer and the Viral Life Cycle. *J Virol*, 93, n. 4, Feb 15 2019.
- FCECON. Relatório de gestão da Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas - FCECON. Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas: 44 p. 2019.
- FONSECA, A. J.; TAEKO, D.; CHAVES, T. A.; AMORIM, L. D. et al. HPV Infection and Cervical Screening in Socially Isolated Indigenous Women Inhabitants of the Amazonian Rainforest. *PLoS One*, 10, n. 7, p. e0133635, 2015.
- GUAN, P.; HOWELL-JONES, R.; LI, N.; BRUNI, L. et al. Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: a meta-analysis from cervical infection to cancer. *Int J Cancer*, 131, n. 10, p. 2349-2359, Nov 15 2012.

GUAN, Y.-F.; LI, G.-R.; WANG, R.-J.; YI, Y.-T. et al. Application of next-generation sequencing in clinical oncology to advance personalized treatment of cancer. Chinese journal of cancer, 31, n. 10, p. 463, 2012.

HAMMER, A.; DE KONING, M. N.; BLAAKAER, J.; STEINICHE, T. et al. Whole tissue cervical mapping of HPV infection: molecular evidence for focal latent HPV infection in humans. Papillomavirus Research, 7, p. 82-87, 2019.

HERRINGTON, C. S. Do HPV-negative cervical carcinomas exist?—revisited. Wiley Online Library 1999.

HILDESHEIM, A.; SCHIFFMAN, M.; BROMLEY, C.; WACHOLDER, S. et al. Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer. Journal of the National Cancer Institute, 93, n. 4, p. 315-318, 2001.

HOLL, K.; NOWAKOWSKI, A. M.; POWELL, N.; MCCLUGGAGE, W. G. et al. Human papillomavirus prevalence and type-distribution in cervical glandular neoplasias: Results from a European multinational epidemiological study. International journal of cancer, 137, n. 12, p. 2858-2868, 2015.

HORVATH, C. A.; BOULET, G. A.; RENOUX, V. M.; DELVENNE, P. O. et al. Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. Virol J, 7, p. 11, Jan 20 2010.

INCA. Câncer do colo do útero - Conduas INCA. Revista brasileira de cancerologia: 2010. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/controlado-cancer-do-colo-do-utero/acoes-de-controlado-tratamento>.

INCA. Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Rio de Janeiro: 2016. DOI 978-85-7318-296-5. 114p. : il. p.

INCA, I. N. D. C.-. Mortalidade. 30/09/2022, 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/gestor-e-profissional-de-saude/controlado-cancer-do-colo-do-utero/dados-e-numeros/mortalidade>.

INCA, I. N. D. C.-. Estadiamento. Ministério da Saúde, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/gestor-e-profissional-de-saude/controlado-cancer-do-colo-do-utero/dados-e-numeros/estadiamento>.

INCA, I. N. D. C.-. Incidência estimada conforme a localização primária do tumor e sexo. Ministério da Saúde, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros>.

JUNES-GILL, K.; SICHERO, L.; MACIAG, P. C.; MELLO, W. et al. Human papillomavirus type 16 variants in cervical cancer from an admixed population in Brazil. *J Med Virol*, 80, n. 9, p. 1639-1645, Sep 2008.

KALYAANAMOORTHY, S.; MINH, B. Q.; WONG, T. K. F.; VON HAESELER, A. et al. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat Methods*, 14, n. 6, p. 587-589, Jun 2017.

MELDRUM, C.; DOYLE, M. A.; TOTHILL, R. W. Next-generation sequencing for cancer diagnostics: a practical perspective. *Clin Biochem Rev*, 32, n. 4, p. 177-195, Nov 2011.

MIRABELLO, L.; YEAGER, M.; CULLEN, M.; BOLAND, J. F. et al. HPV16 sublineage associations with histology-specific cancer risk using HPV whole-genome sequences in 3200 women. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 108, n. 9, p. djw100, 2016.

MIRABELLO, L.; YEAGER, M.; CULLEN, M.; BOLAND, J. F. et al. HPV16 Sublineage Associations With Histology-Specific Cancer Risk Using HPV Whole-Genome Sequences in 3200 Women. *J Natl Cancer Inst*, 108, n. 9, Sep 2016.

MIRABELLO, L.; YEAGER, M.; YU, K.; CLIFFORD, G. M. et al. HPV16 E7 Genetic Conservation Is Critical to Carcinogenesis. *Cell*, 170, n. 6, p. 1164-1174.e1166, Sep 07 2017.

MUÑOZ, N.; BOSCH, F. X. HPV and cervical neoplasia: review of case-control and cohort studies. *IARC Sci Publ*, n. 119, p. 251-261, 1992.

MUÑOZ, N.; BOSCH, F. X.; DE SANJOSÉ, S.; HERRERO, R. et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*, 348, n. 6, p. 518-527, Feb 06 2003.

NASCIMENTO, M. D. D. S. B.; VIDAL, F. C. B.; DA SILVA, M. A. C. N.; BATISTA, J. E. et al. Prevalence of human papillomavirus infection among women from quilombo communities in northeastern Brazil. *BMC women's health*, 18, n. 1, p. 1-10, 2018.

NAVECA, F. G.; NASCIMENTO, V.; DE SOUZA, V. C.; CORADO, A. L. et al. COVID-19 in Amazonas, Brazil, was driven by the persistence of endemic lineages and P.1 emergence. *Nat Med*, 27, n. 7, p. 1230-1238, Jul 2021.

NICOLÁS-PÁRRAGA, S.; ALEMANY, L.; DE SANJOSÉ, S.; BOSCH, F. X. et al. Differential HPV16 variant distribution in squamous cell carcinoma, adenocarcinoma and adenosquamous cell carcinoma. *Int J Cancer*, 140, n. 9, p. 2092-2100, May 01 2017.

NICOLÁS-PÁRRAGA, S.; GANDINI, C.; PIMENOFF, V. N.; ALEMANY, L. et al. HPV16 variants distribution in invasive cancers of the cervix, vulva, vagina, penis, and anus. *Cancer Med*, 5, n. 10, p. 2909-2919, Oct 2016.

OLIVEIRA, C. M. D. Existe câncer cervical HPV negativo? 2011. -, Universidade de São Paulo.

OPAS. HPV e câncer do colo do útero. 2022. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/hpv-e-cancer-do-colo-do-utero>. Acesso em: 22/06.

ORGANIZATION, W. H. Cervical cancer elimination initiative. 17/11/2020, 2020. ISBN: 9789240014107. Disponível em: https://www.who.int/publications/i/item/9789240014107?utm_source=UICC+Masterlist&utm_campaign=1536d6390a-221114_Cervical_cancer_COPY_01&utm_medium=email&utm_term=0_0a3c6c0a92-1536d6390a-393344853.

OUMESLAKHT, L.; ABABOU, M.; BADAoui, B.; QMICHOU, Z. Worldwide genetic variations in high-risk human papillomaviruses capsid L1 gene and their impact on vaccine efficiency. *Gene*, 782, p. 145533, May 25 2021.

QUICK, J.; GRUBAUGH, N. D.; PULLAN, S. T.; CLARO, I. M. et al. Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples. *Nat Protoc*, 12, n. 6, p. 1261-1276, Jun 2017.

REICH, O.; REGAUER, S.; MCCLUGGAGE, W.; BERGERON, C. et al. Defining the cervical transformation zone and squamocolumnar junction: can we reach a common colposcopic and histologic definition? *International Journal of Gynecological Pathology*, 36, n. 6, p. 517-522, 2017.

REMSCHMIDT, C.; KAUFMANN, A. M.; HAGEMANN, I.; VARTAZAROVA, E. et al. Risk factors for cervical human papillomavirus infection and high-grade intraepithelial lesion in women aged 20 to 31 years in Germany. *International Journal of Gynecologic Cancer*, 23, n. 3, 2013.

SABOUR, L.; SABOUR, M.; GHORBIAN, S. Clinical Applications of Next-Generation Sequencing in Cancer Diagnosis. *Pathol Oncol Res*, 23, n. 2, p. 225-234, Apr 2017.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, n. 12, p. 5463-5467, Dec 1977.

SASAGAWA, T.; TAKAGI, H.; MAKINODA, S. Immune responses against human papillomavirus (HPV) infection and evasion of host defense in cervical cancer. *J Infect Chemother*, 18, n. 6, p. 807-815, Dec 2012.

SCHIFFMAN, M.; DOORBAR, J.; WENTZENSEN, N.; DE SANJOSÉ, S. et al. Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nature Reviews Disease Primers*, 2, n. 1, p. 1-20, 2016.

SCHIFFMAN, M.; RODRIGUEZ, A. C.; CHEN, Z.; WACHOLDER, S. et al. A population-based prospective study of carcinogenic human papillomavirus variant lineages, viral persistence, and cervical neoplasia. *Cancer Res*, 70, n. 8, p. 3159-3169, Apr 15 2010.

SMITH, B.; CHEN, Z.; REIMERS, L.; VAN DOORSLAER, K. et al. Sequence imputation of HPV16 genomes for genetic association studies. *PLoS One*, 6, n. 6, p. e21375, 2011.

STEINBACH, A.; RIEMER, A. B. Immune evasion mechanisms of human papillomavirus: An update. *Int J Cancer*, 142, n. 2, p. 224-229, Jan 15 2018.

SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; LAVERSANNE, M. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, 71, n. 3, p. 209-249, May 2021.

SYKES, P.; GOPALA, K.; TAN, A. L.; KENWRIGHT, D. et al. Type distribution of human papillomavirus among adult women diagnosed with invasive cervical cancer (stage 1b or higher) in New Zealand. *BMC Infect Dis*, 14, n. 1, p. 1-9, 2014.

TAKEDA, M.; SAKAI, K.; TERASHIMA, M.; KANEDA, H. et al. Clinical application of amplicon-based next-generation sequencing to therapeutic decision making in lung cancer. *Ann Oncol*, 26, n. 12, p. 2477-2482, Dec 2015.

TAMEGÃO-LOPES, B. P.; SOUSA-JÚNIOR, E. C.; PASSETTI, F.; FERREIRA, C. G. et al. Prevalence of human papillomavirus infection and phylogenetic analysis of HPV-16 E6 variants among infected women from Northern Brazil. *Infect Agent Cancer*, 9, p. 25, 2014.

TORNESELLO, M. L.; LOSITO, S.; BENINCASA, G.; FULCINITI, F. et al. Human papillomavirus (HPV) genotypes and HPV16 variants and risk of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol*, 121, n. 1, p. 32-42, Apr 2011.

TORRES, K. L.; MARIÑO, J. M.; PIRES ROCHA, D. A.; DE MELLO, M. B. et al. Self-sampling coupled to the detection of HPV 16 and 18 E6 protein: A promising option for detection of cervical malignancies in remote areas. *PLoS One*, 13, n. 7, p. e0201262, 2018.

TSAKOGIANNIS, D.; NIKOLAIDIS, M.; ZAGOURI, F.; ZOGRAFOS, E. et al. Mutation Profile of HPV16 L1 and L2 Genes in Different Geographic Areas. *Viruses*, 15, n. 1, Dec 31 2022.

VAN DOORSLAER, K.; CHEN, Z.; BERNARD, H.-U.; CHAN, P. K. et al. ICTV virus taxonomy profile: Papillomaviridae. *Journal of General Virology*, 99, n. 8, p. 989-990, 2018.

VAN DOORSLAER, K.; CHEN, Z.; BERNARD, H. U.; CHAN, P. K. S. et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Papillomaviridae. *J Gen Virol*, 99, n. 8, p. 989-990, Aug 2018.

VAN DOORSLAER, K.; LI, Z.; XIRASAGAR, S.; MAES, P. et al. The Papillomavirus Episteme: a major update to the papillomavirus sequence database. *Nucleic Acids Res*, 45, n. D1, p. D499-D506, Jan 04 2017.

VELÁZQUEZ, E.; PEIX, A.; GÓMEZ-ALONSO, A. [Microorganisms and cancer: scientific evidence and new hypotheses]. *Cir Esp*, 89, n. 3, p. 136-144, Mar 2011.

VIDAL, J. P.; FELIX, S. P.; CHAVES, C. B.; PATURY, P. et al. Genetic diversity of HPV16 and HPV18 in Brazilian patients with invasive cervical cancer. *J Med Virol*, 88, n. 7, p. 1279-1287, Jul 2016.

WAARTS, M. R.; STONESTROM, A. J.; PARK, Y. C.; LEVINE, R. L. Targeting mutations in cancer. *J Clin Invest*, 132, n. 8, Apr 15 2022.

WANG, L.; WANG, F.; FU, S.; ZHANG, C. et al. Analysis of genetic variation in human papillomavirus type 16 E1 and E2 in women with cervical infection in Xinjiang, China. *BMC Med Genomics*, 14, n. 1, p. 268, Nov 12 2021.

WHO. Classification of Tumours. IARC: 2022, 2022. 978-92-832-4512-4. Disponível em: <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Classification-Of-Tumours/Urinary-And-Male-Genital-Tumours-2022>.

XI, L. F.; KIVIAT, N. B.; HILDESHEIM, A.; GALLOWAY, D. A. et al. Human papillomavirus type 16 and 18 variants: race-related distribution and persistence. *Journal of the National Cancer Institute*, 98, n. 15, p. 1045-1052, 2006.

YAO, Y.; YAN, Z.; DAI, S.; LI, C. et al. Human Papillomavirus Type 16. *Int J Med Sci*, 16, n. 7, p. 1042-1049, 2019.

ZHANG, S.; XU, H.; ZHANG, L.; QIAO, Y. Cervical cancer: Epidemiology, risk factors and screening. *Chinese Journal of Cancer Research*, 32, n. 6, p. 720, 2020.

ZUNA, R. E.; TULLER, E.; WENTZENSEN, N.; MATHEWS, C. et al. HPV16 variant lineage, clinical stage, and survival in women with invasive cervical cancer. *Infect Agent Cancer*, 6, p. 19, Oct 28 2011.

10 APÊNDICES

Apêndice 1 - Descrição dos indicadores de qualidade das sequências de HPV 16 obtidas.

Paciente	Número de <i>reads</i>	Cobertura	Q30	HQ%	Tamanho da sequência
CCU 01	560.573	19.332	99,90%	100	7.905
CCU 02	8.525	499	99,90%	98,8	7.906
CCU 03	75.543	2.985	99,90%	98,0	7.906
CCU 04	6.362	427	99,90%	99,9	7.906
CCU 05	32.971	1.294	99,90%	99,7	7.905
CCU 06	194.436	6.674	99,90%	100,0	7.907
CCU 07	226.915	7.989	99,90%	98,0	7.904
CCU 08	406.126	14.825	99,90%	99,9	7.906
CCU 09	206.567	7.335	99,90%	99,9	7.906
CCU 10	180.419	6.111	99,90%	99,9	7.906
CCU 11	9.692	637	99,90%	100,0	7.906
CCU 12	65.307	4.987	99,90%	97,7	7.907
CCU 13	239.241	8.111	99,90%	99,96	7.906
CCU 14	416.996	14.462	99,90%	99,9	7.906
CCU 15	462.11	15.382	99,90%	99,9	7.906
CCU 16	133.254	4.596	99,90%	100,0	7.906
CCU 17	128.819	6.673	99,90%	99,99	7.906
CCU 18	107.835	4.1	99,90%	100,0	7.906
CCU 19	55.934	2.494	99,90%	100,0	7.906
CCU 20	45.081	1.877	99,90%	97,1	7.908
CCU 21	126.984	3.838	99,90%	100,0	7.907
CCU 22	134.617	5.033	99,90%	95,6	7.905
CCU 23	316.884	11.866	99,90%	100,0	7.905
CCU 24	285.184	10.079	99,90%	99,9	7.906
CCU 25	82.497	3.347	99,90%	100,0	7.906
CCU 26	189.475	8.491	99,90%	95,7	7.906
CCU 27	172.618	5.455	99,90%	99,9	7.906
CCU 28	383.191	11.796	99,90%	100,0	7.906
CCU 29	300.282	10.384	99,90%	100,0	7.907
CCU 30	1.795	82	99,90%	97,7	7.908
CCU 31	225.346	6.625	99,90%	100,0	7.907
CCU 32	318.135	10.171	99,90%	100,0	7.908
CCU 33	430.882	13.427	99,90%	100,0	7.906

Q30: Qualidade da sequência. HQ: Porcentagem da qualidade consensus x contig

Apêndice 2 – Estratégia de triagem molecular utilizada para detecção do HPV 16, descrita no seguinte artigo: HUMAN PAPILLOMAVIRUS (HPV) GENOTYPING AND CLINICAL FEATURES IN CERVICAL CANCER: HOSPITAL IN THE STATE OF AMAZONAS

Heidy Halanna de Melo Farah Rondon¹, Valquíria do Carmo Alves Martins^{2,8}, Michele de Souza Bastos³, Paloma Menezes⁴, Daniel Oliveira Brown⁵, Carolina Soares⁷, Daniel Lira², Marcos Bruno Lima⁶, José Eduardo Levi⁷, Kátia Luz Torres*^{1,2,8}

1. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazon, Brazil,
2. Department of Education and Research, Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas, Manaus, Amazon, Brazil
3. Department of Bacteriology, Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Doutorado, Manaus, Amazon, Brazil
4. Santa Casa de Misericórdia Hospital in Ribeirão Preto, Department of General Surgery, São Paulo, Brazil
5. Clinical Hospital of Itajubá, Minas Gerais, Brazil.
6. National Institute for Research in the Amazon, Manaus, Amazon, Brasil.
7. Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil
8. Genomic Health Surveillance Network: Optimization of Assistance and Research in the State of Amazonas – REGESAM, Manaus, Amazon, Brazil.

* Corresponding authors: Heidy Halanna de Melo Farah Rondon: fheidyhalanna@yahoo.com

KEYWORDS: Cervical cancer; HPV; genotype.

Apêndice 3 – Mutações encontradas por gene (E1, E2, E5, E6, E7, L1, L2) nas 33 amostras sequenciadas.

Região	SNPs	Mutação Missense
E1	A1024C	-
E1	A1470G	-
E1	A1744C	-
E1	A177G	-
E1	A189C	E63D
E1	A266G	-
E1	A591G	-
E1	A753T	-
E1	A804G	-
E1	A978G	I326M
E1	C1177T	-
E1	C1373G	T458S
E1	C1398T	-
E1	C1423T	-
E1	C1480T	-
E1	C1677T	-
E1	C232G	Q78E
E1	C513T	-
E1	C552T	-
E1	C562G	Q188E
E1	C735T	-
E1	C760T	-
E1	C880A	L294M
E1	G111A	-
E1	G11A	-
E1	G1260A	-
E1	G1356C	E452D
E1	G1385A	R462K
E1	G1862A	-
E1	G299A	G100E
E1	G532A	E178K
E1	T1390C	-
E1	T1479C	-
E1	T1491C	-
E1	T1512C	-
E1	T1722C	-
E1	T1767A	-
E1	T336C	-
E1	T502A	C168S
E1	T57C	-
E1	T622C	-

E1	T658A	S220T
E1	T6G	-
E1	T753A	-

Região	SNPs	Mutação Missense
E2	A2317C	E142D
E2	A2498G	-
E2	A2561C	-
E2	A2654C	-
E2	A2674C	Q66P
E2	A2735C	-
E2	C1996A	H35Q
E2	C2179T	-
E2	C2295A	T135K
E2	C2297T	H136Y
E2	C2513G	-
E2	C2546T	-
E2	C2652A	L59T
E2	C2652A	L59I
E2	C2820A	T310K
E2	C2842T	-
E2	C2923A	D344E
E2	C2995T	L4F
E2	C3021G	-
E2	G2318A	A143T
E2	G2385A	R165Q
E2	G2385A	R165K
E2	G2385A	R165Q
E2	G2567A	-
E2	G2585A	-
E2	G2914T	W341C
E2	T2360A	L157I
E2	T2371C	-
E2	T2523C	-
E2	T2702G	H75Q
E2	T2800C	-
E2	T2830A	-
E2	T2842C	-
E2	T2920G	-
E2	T2941G	-

Região	SNPs	Mutação Missense
E5	A3115C	I44L
E5	A3178G	I65V
E5	A3178T	I65L
E5	A3195C	-
E5	C2995T	L4F
E5	C3127G	L48V
E5	C3127T	-
E5	G3004A	A7T
E5	G3153A	-
E5	T2994C	-
E5	T3225C	-

Região	SNPs	Mutação Missense
E6	A7125C	-
E6	A7140C	T6P
E6	A7331G	-
E6	A7362C	I80L
E6	A7445G	-
E6	A7574G	-
E6	A7632C	I80L
E6	C7185G	Q21D
E6	C7377T	H85Y
E6	G7174C	R17I
E6	G7187T	Q21H
E6	T7151C	-
E6	T7179G	L19V
E6	T7328A	-
E6	T7392G	L90V
E6	T7774C	-
E6	T7831C	-
E6	T7837G	-

Região	SNPs	Mutação Missense
E7	7831C	-
E7	A7689G	N29S
E7	G7810A	G43E
E7	T7774C	-
E7	T7831C	-
E7	T7837G	-

Região	SNPs	Mutação Missense
L2	64074A	-
L2	A3422G	K8R
L2	A3570G	-
L2	A3654G	-
L2	A3729G	-
L2	A3735C	-
L2	A3786C	-
L2	A4023G	-
L2	A4047T	-
L2	A4080G	-
L2	A4105G	T245A
L2	A4105G	-
L2	A4105G	T245A
L2	A4170T	L266F
L2	A4362C	L330F
L2	A4395G	-
L2	A4409C	L330F
L2	A4426G	T352P
L2	A4431C	-
L2	A443G	-
L2	A4542C	L390F
L2	C3861T	-
L2	C3886T	P172S
L2	C3990T	-
L2	C4281T	-
L2	C4367G	T332S
L2	C4375T	P335S
L2	C4505T	S378F
L2	C4623T	-
L2	C4700G	A443G
L2	G3444A	-
L2	G3564A	-
L2	G3564T	-
L2	G3597A	-
L2	G3666A	-
L2	G4074A	-
L2	G4099A	V243I
L2	G4102A	-
L2	G4105A	-
L2	G4186C	D272H
L2	G4278A	-
L2	G4372A	D334N
L2	G4515A	-
L2	G4525A	V385I
L2	G4642A	A424T

L2	G4834A	-
L2	T3417C	-
L2	T3588C	-
L2	T3681G	-
L2	T3693G	-
L2	T3736C	S122P
L2	T3780A	-
L2	T3960A	-
L2	T4177C	S269P
L2	T4403A	I344K
L2	T4422A	-
L2	T4446A	-
L2	T4446C	-
L2	T446C	-
L2	T4522G	S384A
L2	T4539C	-
L2	T4611A	-
L2	T4631C	I420T
L2	T4656G	I428M

Região	SNPs	Mutação Missense
L1	A5316C	N181T
L1	A5452G	-
L1	A5570G	T266A
L1	A5831C	T353P
L1	A5939T	T389S
L1	C5000T	H76Y
L1	C5301A	T176N
L1	C5695T	-
L1	C5911T	-
L1	C5990T	-
L1	C6001T	-
L1	C6106T	-
L1	G4834A	-
L1	G5119A	-
L1	G5857A	-
L1	G6130A	-
L1	G6196T	L474F
L1	T4795C	-
L1	T5047C	-
L1	T5323G	-
L1	T5383C	-
L1	T5618C	S282P
L1	T5620C	-
L1	T5704A	-

Apêndice 4 – Relação das mutações com as características clínicas das pacientes analisadas

Paciente	Idade	Variante	ÓBITO	FIGO	Agressividade tumor	Tipo histológico	Mutação NS	MS E6	MS E7
CCU 01	78	A1	S	IVB	A	CEC	K8R - D272H - L330F	N	N
CCU 02	59	A1	S	IIIC1	A	CEC	K8R- G43E- L330F	S	S
CCU 03	37	D3	N	IVA	A	CEC	Q78E - G100E - C168S - Q188E - L293M - I326M - E452D - T458S - R462K - H35Q - T135K - H136Y - A143T - R165Q - L59T - Q66P - H75Q - T310K - W341C - D344E - I44L - L48V - I65V - R17I - Q21H - H85Y - H76Y - T176N - N181T - T266A - S282P - T353P - L474F - S122P - S269P - D334N - P335S - T352P - S378F - V385I - I420T - A424T - A443G	S	N
CCU 04	72	A1	N	IVA	A	CEC	K8H - D272H- L330F	N	N
CCU 05*	50	SI	N	IIB	A	CEC	0		
CCU 06	53	C1	N	IIB	A	CEC	Q78E - G100E - C168S - Q188E - L293M - I326M - E452D - T458S - R462K - H35Q - T135K - H136Y - A143T - R165Q - L59T - Q66P - H75Q - T310K - W341C - D344E - I44L - L48V - I65V - R17I - Q21D - H85Y - N29S- H76Y - T176N - N181T - T266A - S282P - T353P - L474F - S122P - S269P - D334N - P335S - T352P - S378F - V385I - I420T - A424T - A443G	S	S
CCU 07	32	D3	N	IB	NA	CEC	Q78E - G100E - C168S - Q188E - S220T - L294M - I326M - E452D - T458S - R462K - E596K - H35Q - T135K - E142D - A143T - L157I - R165Q - L59T - Q66P - H75Q - T310K - W341C - D344E - I44L - Q21H - L90V - H85Y	S	N

CCU 08	52	D3	N	IB1	NA	ADC	Q78E - G100E - C168S - Q188E - S220T - L294M - I326M - E452D - T458S - R462K - E596K - H35Q - T135K - E142D - A143T - L157I - R165Q - L59T - Q66P - H75Q - T310K - W341C - D344E - I44L - L48V - I65V - Q21H - L90V - H76Y - T176N - N181T - T266A - T353P - T389S - L474F - S122P - T245A - L266F - S269P - D334N - S378V - S384A - V385I - I420T - A443G	S	N
CCU 09	73	D3	N	IB2	NA	ADC	Q78E - G100E - C168S - Q188E - S220T - I326M - E452D - T458S - R462K - E596K - H35Q - T135K - E142D - A143T - L157I - R165Q - L59T - Q66P - H75Q - T310K - W341C - D344E - I44L - L48V - I65V - Q21H - H85Y - L90V - H76Y - T176N - N181T - T266A - T353P - T389S - L474F - S122P - T245A - L266F - S269P - D344N - S378V - S384A - V385I - I420T - A443G	S	N
CCU 10	58	D3	N	IB1	NA	CEC	Q78E - G100E - C168S - Q188E - S220T - L294M - I326M - E452D - T458S - R462K - E596K - H35Q - T135K - E142D - A143T - L157I - R165Q - L59T - Q66P - H75Q - T310K - W341C - D344E - I44L - L48V - I65V - Q21H - H85Y - L90V - H76Y - T176N - N181T - T353P - T389S - L474F - S122P - T245A - L266F - S269P - T332S - D334N - S378V - S384A - V385I - I420T - A424T - A443G	S	N
CCU 11	20	D3	N	IB1	NA	ADC	Q78E - G100E - C168S - Q188E - S220T - L294M - I326M - E452D - T458S - R462K - E596K - H35Q - T135K - E142D - A143T - L157I - R165Q - L59T - Q66P - H75Q - T310K - W341C - D344E - I44L - L48V - I65V - Q21H - H85Y - L90V - H76Y - T176N - N181T - T353P - T389S - L474F - S122P - T245A - L266F - S269P - T332S - D334N - S378V - S384A - V385I - I420T - A424T - A443G	S	N

CCU 12	37	D3	N	IB2	NA	CEC	Q78E - G100E - C168S - Q188E - S220T - L294M - I326M - E452D - T458S - R462K - E596K - H35Q - T135K - E142D - A143T - L157I - R165Q - L59T - Q66P - H75Q - T310K - W341C - D344E - I44L - L48V - I65V - Q21H - H85Y - L90V - H76Y - T176N - N181T - T353P - T389S - L474F - S122P - T245A - L266F - S269P - T332S - D334N - S378V - S384A - V385I - I420T - A424T - A443G	S	N
CCU 13	36	D3	N	IIA2	A	ADC	Q78E - G100E - C168S - Q188E - S220T - L294M - I326M - E452D - T458S - R462K - E596K - H35Q - T135K - E142D - A143T - L157I - R165Q - L59T - Q66P - H75Q - T310K - W341C - D344E - I44L - L48V - I65V - Q21H - H85Y - L90V - H76Y - T176N - N181T - T353P - T389S - L474F - S122P - T245A - L266F - S269P - T332S - D334N - S378V - S384A - V385I - I420T - A424T - A443G	S	N
CCU 14	61	D3	N	IB2	NA	ADC	Q78E - G100E - C168S - Q188E - S220T - L294M - I326M - E452D - T458S - R462K - E596K - H35Q - T135K - E142D - A143T - L157I - R165Q - L59T - Q66P - H75Q - T310K - W341C - D344E - I44L - L48V - I65V - Q21H - H85Y - L90V - H76Y - T176N - N181T - T353P - T389S - L474F - S122P - T245A - L266F - S269P - T332S - D334N - S378V - S384A - V385I - I420T - A424T - A443G	S	N
CCU 15	52	D3	N	IB3	NA	ADC	Q78E - G100E - C168S - Q188E - S220T - L294M - I326M - E452D - T458S - R462K - E596K - H35Q - T135K - E142D - A143T - L157I - R165Q - L59T - Q66P - H75Q - T310K - W341C - D344E - I44L - L48V - I65V - Q21H - H85Y - L90V - H76Y - T176N - N181T - T353P - T389S - L474F - S122P - T245A - L266F - S269P - T332S - D334N - S378V - S384A - V385I - I420T - A424T - A443G	S	N
CCU 16	46	A1	N	IB1	NA	CEC	L4F - L330F	N	N
CCU 17	37	D3	N	IB2	NA	CEC	L4F - L330F	N	N

CCU 18	48	A1	N	IB1	NA	CEC	L330F	N	N
CCU 19	38	A1	N	IB2	NA	CEC	L330F	N	N
CCU 20	42	A1	N	IIIC1	A	ADC	I44L - L330F - L390F - L90V	S	N
CCU 21	34	A1	N	IB1	NA	CEC	L48V - I65V - T6P - T266A - L330F	S	N
CCU 22	54	A1	N	IIIC1	A	ADC	E178K - S220T - T266A	N	N
CCU 23	50	A1	N	IIIB	A	CEC	S220T - T266A - L330F	N	N
CCU 24	39	D3	N	IIIB	A	CEC	Q77E - G100E - C168S - S220T - L294M - I326M - E452D - T458S - R462K - E596K - H35Q - T135K - E142D - A143T - I157L - R165Q - L59T - Q66P - H75Q - T310K - W341C - D344E - I44L - L48V - I65V - Q21H - H85Y - L90V - H76Y - T176N - N181T - T266A - T353P - T389S - L474F - S122P - T245A - L266F - S269P - D334N - S378V - V385I - I420T - A424T - I428M - A443G	S	N
CCU 25	61	A1	N	IIIC1	A	CEC	L4F - L330F	N	N
CCU 26	74	SI	S	IVA	A	CEC	L330F	N	N
CCU 27	52	D3	N	IIIC2	A	CEC	Q78E - G100E - C168S - Q188E - S220T - L294M - I326M - E452D - T458S - R462K - E596K - H35Q - T135K - E142D - A143T - L157I - R165Q - L59T - Q66P - H75Q - T310K - W341C - D344E - I44L - L48V - I65V - Q21H - H85Y - L90V - H76Y - T176N - N181T - T353P - T389S - L474F - S122P - T245A - L266F - S269P - T332S - D334N - S378V - S384A - V385I - I420T - A424T - A443G	S	N
CCU 28	24	A1	N	IIIB	A	CEC	E63D - I44L - I65V - T266A - L330F	N	N
CCU 29	79	B1	N	IIIB	A	CEC	Q78E - C168S - I326M - E452D - H35Q - T135K - H136Y - A143T - R165Q - L59I - H75Q - T310K - W341C - D344E - A7T - I44L - I65L - R17T - Q21D - H85Y - H76Y - T176N - T266A - L474T - S122P - S269P - D334N - I344K - T352A - V385I - I420T - A424T - A443G	S	N
CCU 30	35	A1	N	IIIB	A	ADC	I44L - I65V - L90V - T266A - V243I - L330F	S	N
CCU 31	30	A1	N	IIIB	A	CEC	I44L - I65V - T266A - V243I - L330F - L90V	S	N

CCU 32	26	A1	S	IVA	A	CEC	I44L - I65V - L19V - L90V - T266A- V243I- L330F	S	N
CCU 33	59	A1	S	IIIC1	A	CEC	I44L- I65V- L90V- T266A- P172S- V243I- L330F	S	N

CCU: câncer de colo do útero; CEC: carcinoma de células escamosas; ADC: adenocarcinoma; M: mutação; S: sim; N: não; A: avançado; NA: não avançado; SI: sem informação; FIGO: International Federation of Gynecology and Obstetrics; *paciente da qual não foi possível analisar as mutações no genoma.

11 ANEXOS

Aprovação do projeto: “Caracterização dos genótipos de HPV e população de rastreo em pacientes com câncer de colo uterino do Estado do Amazonas”.

CONFIRMAR APROVAÇÃO PELO CAAE OU PARECER

Informe o número do CAAE ou do Parecer:

Número do CAAE: Número do Parecer:

Esta consulta retorna somente pareceres aprovados. Caso não apresente nenhum resultado, o número do parecer informado não é válido ou não corresponde a um parecer aprovado.

DETALHAMENTO

Título do Projeto de Pesquisa:

Número do CAAE: Número do Parecer:

Quem Assinou o Parecer: Pesquisador Responsável:

Data Início do Cronograma: Data Fim do Cronograma: Contato Público:

Aprovação do Projeto: “Caracterização da infecção por Papilomavirus Humano (HPV) e da coinfeção pelo Epstein-Barr vírus (EBV) nas mulheres com câncer de colo do útero invasor referenciadas para a FCECON”.

Você está em: Público > Confirmar Aprovação pelo CAAE ou Parecer

CONFIRMAR APROVAÇÃO PELO CAAE OU PARECER

Informe o número do CAAE ou do Parecer:

Número do CAAE: Número do Parecer:

Esta consulta retorna somente pareceres aprovados. Caso não apresente nenhum resultado, o número do parecer informado não é válido ou não corresponde a um parecer aprovado.

DETALHAMENTO

Título do Projeto de Pesquisa:

Número do CAAE: Número do Parecer:

Quem Assinou o Parecer: Pesquisador Responsável:

Data Início do Cronograma: Data Fim do Cronograma: Contato Público: