

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO

Curso de Biomedicina

Pietro Vasconcellos Cazalini – RA: 011016

Viviane Scalise – RA: 011126

**UM FUTURO PROMISSOR COM O USO DE MIR-143 E SHRNAS NO
TRATAMENTO DE CÂNCER CERVICAL CAUSADO POR HPV 16 E 18.**

São Paulo

2022

Pietro Vasconcellos Cazalini

Viviane Scalise

**UM FUTURO PROMISSOR COM O USO DE MIR-143 E SHRNAS NO
TRATAMENTO DE CÂNCER CERVICAL CAUSADO POR HPV 16 E 18.**

**Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Biomedicina
do Centro Universitário São Camilo,
orientado pela Prof. Dr. Fábio Mitsuo
Lima, como requisito parcial para
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.**

São Paulo

2022

Ficha catalográfica elaborada pelas Bibliotecas São Camilo

Cazalini, Pietro Vasconcellos

Um futuro promissor com o uso de MIR-143 e SHRNAs no tratamento de câncer cervical causado por HPV 16 e 18 / Pietro Vasconcellos Cazalini, Viviane Scalise. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2022.

58 p.

Orientação de Fábio Mitsuo Lima.

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação), Centro Universitário São Camilo, 2022.

1. MicroRNAs 2. Neoplasias do colo do útero 3. Papillomaviridae 4. RNA interferente pequeno I. Scalise, Viviane II. Lima, Fábio Mitsuo III. Centro Universitário São Camilo IV. Título

CDD: 574.8

AGRADECIMENTOS

Ao nosso orientador Prof. Fábio Mitsuo Lima, pela parceria desenvolvida durante a realização deste trabalho, por todo o conhecimento que nos foi passado, pela paciência e pelo apoio as nossas ideias, tornando-as possíveis, sempre nos aconselhando e sanando nossas dúvidas. Agradecemos também por todas as conversas sobre a vida, onde pudemos partilhar nossas angústias, alegrias e experiências profissionais.

Aos nossos pais e irmãos, por sempre nos motivarem a estudar e nos darem condições para isso, pela força, amor, companheirismo e ensinamentos que permanecerão em nós para o resto de nossas vidas.

Ao nosso amigo Gabriel Dias França, pela parceria durante a faculdade, onde desenvolvemos trabalhos extraordinários juntos, por dividir o peso da vida, trocarmos experiências e pelas risadas.

A todos os nossos professores do curso e a Coordenadora de Biomedicina, pelo conhecimento passado que nos permitiu a realização desse trabalho e nossa formação profissional.

EPÍGRAFE

*Um cientista no seu laboratório
não é apenas um técnico: é, também,
uma criança colocada à frente de
fenômenos naturais que impressionam
como se fossem um conto de fadas.*

Marie Skłodowska-Curie.

RESUMO

Em condições fisiológicas normais, as proteínas supressoras tumorais pRb e p53 não permitem que uma célula alterada avance no ciclo celular; entretanto, quando há uma infecção por um HPV de alto risco oncogênico (HRHPV) (principalmente HPV-16 e 18) nas células cervicais, as oncoproteínas virais E6 e E7 as degradam, gerando células imortalizadas e iniciando a tumorigênese, dando origem ao câncer cervical (CC), uma neoplasia maligna caracterizada pelo crescimento desordenado de células em um tecido/órgão podendo disseminar-se pelo corpo (metástase). Em mais de 90% dos casos de CC há o envolvimento da infecção por HRHPV, a IST mais contagiosa existente, relacionando-se a 690 mil casos de câncer por ano. Atualmente são usados como tratamento a crioterapia, eletrocauterização, cirurgia de alta frequência (CAF), cirurgia a laser ou ainda a histerectomia, que podem impossibilitar uma gravidez futura ou levar ao reaparecimento de lesões, não curando as mulheres definitivamente. Tratamentos utilizando microRNAs (miR) e short hairpin RNAs (shRNAs) são abordagens menos invasivas, que mostraram ótima eficácia *in vitro* e *in vivo* devida sua ação focalizada. Ambos são pequenos RNAs não codificadores, um subtipo de RNA de interferência, capazes de controlar a tradução. Enquanto os microRNAs estão presentes fisiologicamente, o shRNA é artificial, inserido em plasmídeos. Esse trabalho tem como objetivo revisar a proposta de uma nova abordagem de tratamento para o CC causado por HPV-16 e HPV-18, utilizando-se miR-143 e/ou shRNAs, a partir de artigos publicados entre 2017-2022, em inglês, nas bases de dados Google Acadêmico e Pubmed, a fim de obter resultados recentes sobre a temática, utilizando-se o operador booleano AND, sendo selecionados 20 trabalhos que empregaram o miR e shRNA *in vitro* ou *in vivo* para fins de tratamento. Foram selecionados diferentes estudos demonstrando que o miR-143 encontrou-se subexpresso no CC, perdendo seu potencial inibitório sobre diversos alvos intracelulares, dentre eles: HIF-1 α , GOLM1 e BCL-2, responsáveis pela angiogênese, biossíntese/transporte de proteínas e inibição apoptótica, respectivamente e, em decorrência desses dados, alguns trabalhos visaram aumentar sua quantidade para retomar suas funções. Já o shRNA foi desenhado em diferentes estudos para ter como alvo: as oncoproteínas virais, degradando-as, com conseqüente retorno das funções de pRb e p53; além do NF90, regulador positivo da expressão de HIF-1 α , e a ASF1B, relacionada a progressão do ciclo celular. Foram obtidos uma redução da proliferação celular, maiores taxas de apoptose e redução do volume tumoral com o uso de ambas as intervenções; todavia, o uso de shRNA contra E6/E7, nos artigos revisados, levou a quase erradicação do tumor ou a reduções drásticas de tamanho. Portanto, concluiu-se que o miR-143 e shRNAE6/E7 mostraram ser promissores no tratamento de CC, além de menos invasivos. O sinergismo entre eles poderia ser considerado para possível aplicação em estudos futuros, na tentativa de trazer uma cura para pacientes com a doença.

Palavras-chave: Neoplasias do Colo do Útero; RNA Interferente Pequeno; MicroRNA; HPV.

ABSTRACT

In normal physiological conditions, tumor suppressor proteins pRb and p53 do not allow an altered cell to advance in the cell cycle; however, when there is an oncogenic high-risk HPV (HRHPV) infection (mainly HPV-16 and 18) in cervical cells, viral oncoproteins E6 and E7 degrade them, generating immortalized cells and initiating tumorigenesis, giving rise to cervical cancer (CC), a malignant neoplasm characterized by the disordered growth of cells in a tissue/ organ and can spread through the body (metastasis). In more than 90% of cases of CC there is the involvement of HRHPV infection, the most contagious STI existing, relating to 690,000 cases of cancer per year. Currently, cryotherapy, electrocautery, high-frequency surgery (LEEP), laser surgery and hysterectomy are used as treatment, which can make a future pregnancy impossible or lead to the reappearance of lesions, not curing women definitively. Treatments using microRNAs (miR) and short hairpin RNAs (shRNAs) are less invasive approaches, which showed great efficacy in vitro and in vivo due to their focused action. Both are small non-coding RNAs, a subtype of interference RNA, capable of controlling translation. While microRNAs are physiologically present, shRNA is artificial, inserted into plasmids. This paper aims to review the proposal of a new treatment approach for CC caused by HPV-16 and HPV-18, using miR-143 and/or shRNAs, from articles published between 2017-2022, in English, in the Google Scholar and Pubmed databases, in order to obtain recent results on the subject, using the Boolean operator AND, 20 studies were selected that used the miR and shRNA in vitro or in vivo for treatment purposes. While microRNAs are physiologically present, shRNA is artificial, inserted into plasmids. This work aims to review the proposal of a new treatment approach for CC caused by HPV-16 and HPV-18, using Mir-143 and/or shRNAs, from articles published between 2017-2022, in English, in the Google Scholar and Pubmed databases, in order to obtain recent results on the subject, using the Boolean operator AND, 20 studies were selected that used the Mir and shRNA in vitro or in vivo for treatment purposes. Different studies were selected demonstrating that the miR-143 was found to be underexpressed in CC, losing its inhibitory potential on several intracellular targets, among them: HIF-1 α , GOLM1 and BCL-2, responsible for angiogenesis, biosynthesis/transport of proteins and apoptotic inhibition, respectively, and as a result of these data, some studies aimed to overexpress miR-143 to resume their functions. The shRNA was designed in different studies to target: viral oncoproteins, degrading them, with consequent return of pRb and p53 functions; in addition to NF90, positive regulator of HIF-1 α expression, and ASF1B, related to cell cycle progression. Were obtained cell proliferation reduction, higher apoptosis rates, and tumor volume reduction with the use of both interventions; however, the use of shRNA against E6/E7 in the reviewed articles led to near tumor eradication or drastic reductions in size. Therefore, it was concluded that miR-143 and shRNAE6/E7 showed to be promising in the treatment of CC, as well as less invasive. Synergism between them could be considered for possible application in future studies, in an attempt to bring a cure to patients with CC.

Keywords: Cervical Neoplasms; Small Interfering RNA; MicroRNA; HPV.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo Celular.....	19
Figura 2 – Eletromicrografia do Papilomavírus Humano	20
Figura 3 – Mecanismos de entrada do HPV.....	21
Figura 4 – Progressão da doença causada pela infecção por HPV	23
Figura 5 – Citologia normal vs. efeitos citopáticos causados pelo HPV	24
Figura 6 – Integração do Genoma Viral ao DNA do hospedeiro	25
Figura 7 – Esquema acerca do genoma do HPV	26
Figura 8 – A ubiquitinação da p53.....	27
Figura 9 – Alvos de atuação das proteínas E5, E6 e E7	28
Figura 10 – Via do microRNA e do shRNA	31

Figura 11 – Sítios de ligação idênticos do HOTAIR e BCL-2 para o microRNA-143.....	36
Figura 12 – Representação esquemática das interações envolvendo HOTAIR e PRC2, E7 e miR-143.....	38
Figura 13 – Eficiência da transfecção plasmidial em células de câncer cervical utilizando diferentes sorotipos de AAV	39
Figura 14 – Representação de exossomos em células por eletromicrografia de transmissão.....	43

LISTA DE SIGLAS

AAV	Adenovírus Associado
AGC-NOS	Células glandulares atípicas não específicas
Ago2	Argonaute 2
AIS	Células glandulares atípicas, provavelmente adenocarcinoma <i>in situ</i>
ASC-H	Não se pode excluir lesão intraepitelial de alto grau
ASC-US	Células atípicas de significado indeterminado
ASF1B	Chaperona de Histona 1B anti-silenciamento
Bak	Antagonista/Assassina BCL-2
BCL-2	Células B2 de Linfoma
CAF	Cirurgia de alta frequência
CC	Câncer Cervical
CD1	Domínio bem conservado 1
CD2	Domínio bem conservado 2
CD3	Domínio bem conservado 3
CDKs	Cinase dependentes de ciclinas
ceRNA	RNA Competidor endógeno
CKI	Inibidores de Cinases dependentes de Ciclina
CRISPR	Conjunto de repetições palindrômicas curtas regularmente espaçadas
CyTB	Ciclofilina B

DNMT	DNA Metiltransferase
dsRNA	RNA de dupla fita
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FACs	Fibroblastos associados ao câncer
FNs	Fibroblastos normais
GOLM1	Proteína da membrana de Golgi 1
HIF-1 α	Fator induzido por hipóxia
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HOTAIR	RNA antisense transcrito pela HOX
HPV	Papilomavírus Humano
HRHPV	HPV de alto risco oncogênico
HSIL	Lesão intraepitelial de alto grau
HSPG	Glicoproteína sulfato de heparana (HSPG)
hTERT	Trasncriptase reversa da telomerase humana
IRE	Eletroporação Irreversível
IST	Infecção Sexualmente Transmissível
KD	Knockdown
KLK8	Calicreína-8
LCR	Região de controle longo
lncRNA	RNA longo não codificante
LRHPV	HPV de baixo risco oncogênico
LSIL	Lesão intraepitelial de baixo grau
MB	Membrana Basal

MHC	Complexo de Histocompatibilidade Humana
miR	MicroRNA
miRNA	MicroRNA
MMP	Metaloproteinases de matriz
ncRNA	RNA não codificante
NF-90	Fator nuclear 90
NIC1	Neoplasia intraepitelial cervical I
NIC2	Neoplasia intraepitelial cervical II
NIC3	Neoplasia intraepitelial cervical III
NK	Natural Killer
PBAE	Nanopartículas poli β -amino éster
pRb	Proteína retinoblastoma
PRC2	Complexo Repressivo Polycomb 2
PV	Papillomaviridae
RE	Eletroporação Reversível
RER	Retículo Endoplasmático Rugoso
RISC	Complexo de silenciamento induzido por RNA
RNAi	RNA de Interferência
RNAm	RNA mensageiro
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa
shRNA	Short Hairpin RNA
siRNA	Pequeno RNA de interferência
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVO	15
3 METODOLOGIA	16
4 DESENVOLVIMENTO	17
4.1 EPIDEMIOLOGIA	17
4.2 CICLO CELULAR E OS SUPRESSORES TUMORAIS	18
4.3 O HPV	19
4.3.1 Características	19
4.3.2 Ciclo de vida viral	20
4.3.3 Proteínas virais	24
4.3.4 Processo de carcinogênese	25
4.3.5 Tipos de lesões	29
4.4 TRATAMENTOS ATUAIS	30
4.4.1 MicroRNA (miRNA ou miR) e Short Hairpin RNA (shRNA)	31
4.4.1.1 Definição	31
4.4.1.2 Aplicação no câncer	32
4.4.1.3 Informações sobre o miR-143	35
4.4.1.4 Sobre shRNA	38
4.4.1.5 Formas de entrega	42
5 CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

O câncer de colo do útero, também chamado de câncer cervical (CC), é uma neoplasia maligna de células da cérvix caracterizada pelo seu crescimento desordenado podendo disseminar-se pelo corpo (metástase), sendo um grave problema de saúde pública, por ser o terceiro tipo de câncer com maior incidência em mulheres, estando presente principalmente em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, onde muitas mulheres não têm acesso a informações sobre os fatores de risco para o desenvolvimento da doença ou não realizam a busca preventiva de lesões uterinas através da colposcopia, Papanicolaou e biópsia (CARVALHO et al., 2018; GUIMARÃES, 2019; INCA 2021). Estimou-se 16.710 casos novos para o ano de 2022, o que representa uma um risco considerado de 15,38 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2021). Na análise regional brasileira, o CC é o primeiro mais incidente na região Norte (26,24/100 mil) e o segundo nas regiões Nordeste (16,10/100 mil) e Centro-Oeste (12,35/100 mil). Já na região Sul ocupa a quarta posição (12,60/100 mil) e, na região Sudeste (8,61/100 mil), a quinta posição (INCA, 2019). O exame Papanicolaou foi determinado pelo Ministério da Saúde para o rastreamento de câncer uterino, permitindo a obtenção de um diagnóstico precoce pela capacidade de descobrir lesões precursoras com potencial de levar ao desenvolvimento neoplásico e tratá-las antecipadamente, não permitindo sua evolução para um câncer, além de diferenciá-las de lesões benignas causadas por inflamação e processos infecciosos (DE SÁ e SILVA, 2019).

O Papilomavírus Humano (HPV) é um pré-requisito primário para o desenvolvimento neoplásico uterino, apresentando cerca de 200 genótipos diferentes, sendo que apenas dezoito estão relacionados ao câncer cervical, com destaque para os tipos 16 e 18 que são os principais envolvidos, acometendo 90% dos casos (PAL, KUNDU, 2020; DE SÁ e SILVA, 2019). O processo de tumorigênese ocorre pela produção das oncoproteínas virais E6 e E7, que levam a degradação das supressoras tumorais p53 e proteína do retinoblastoma (pRb), respectivamente.

Os tratamentos existentes até o momento não são capazes de curar definitivamente o portador da doença, por não agirem diretamente no vírus do HPV e, por não serem célula-específico, podendo levar à infertilidade ou ao reaparecimento de lesões subsequentemente (SIMÕES e JUNIOR, 2019; PAL, KUNDU, 2020;

CARVALHO et al., 2020). No presente trabalho, foi realizada uma revisão bibliográfica de tratamentos experimentais para o câncer de colo de útero utilizando microRNA-143 e short hairpin RNA, a fim de investigar a possibilidade de aplicar as técnicas em pacientes no futuro. Ambos são subtipos de RNA de interferência (RNAi) que controlam a tradução, impedindo a formação de determinadas proteínas e vem sendo amplamente estudados para diversas finalidades, como em terapias contra o câncer (ALBERTS et al., 2017; RODWELL et al, 2018; SHARMA et al., 2020).

2 OBJETIVO

Trazer um levantamento sobre a associação entre a infecção por HPV e o desenvolvimento do câncer de colo de útero, envolvendo os tipos 16 e 18, abordando novos tratamentos com a utilização da engenharia genética, com enfoque no microRNA-143 e shRNAs.

3 METODOLOGIA

Foi elaborada uma revisão de literatura baseada em artigos publicados há 5 anos nas bases de dados Google Acadêmico e Pubmed, em língua portuguesa e inglesa, utilizando o operador booleano AND, empregando as seguintes palavras-chave: “HPV”, “câncer cervical”, “miRNA-143” e “shRNA”, assim como seus sinônimos. Além disso, foram utilizados livros como material de apoio.

Como foco, foram escolhidos trabalhos que usaram o miRNA e shRNA *in vitro* ou *in vivo* com fins de tratamento, ou seja, visando obter uma redução tumoral, sendo retirados da busca: artigos que empregaram tais técnicas como biomarcador para diagnóstico, estudos onde o miR ou shRNA foram aplicados para entender o funcionamento de proteínas e processos, como também terapias de associação a rádio ou quimioterapia.

4 DESENVOLVIMENTO

4.1 EPIDEMIOLOGIA

Os HPVs de alto risco oncogênico (HRHPV) estão associados com cerca de 90% dos casos de câncer de colo de útero, sendo um pré-requisito primário para o seu desenvolvimento (PAL, KUNDU, 2020). Por ano, existe uma incidência de 690 mil casos de câncer em decorrência da infecção pelo HPV no mundo (HAREŽA, WILCZYŃSKI e PARADOWSKA, 2022). Embora as vacinas profiláticas contra os tipos de HPV mais frequentemente associados à neoplasia cervical já estejam disponíveis nos países há alguns anos, a taxa de mortalidade por tal problema não foi reduzida de maneira desejável e dados mostraram que mais de 250 mil mulheres morrem com este tipo de câncer por ano (SIMÕES e JUNIOR, 2019). Isso ocorre, pois, as vacinas não surtem efeitos sobre os milhares de indivíduos que já se infectaram antes de sua existência (já que esta não interrompe o curso da doença) ou ainda sobre os que não tiveram acesso à vacinação, sendo que, até o momento, não há um tratamento que leve à cura, o que significa que o combate da doença, com novas terapias e métodos de diagnóstico precoce, deve continuar (SIMÕES e JUNIOR, 2019).

Dentre os tipos de câncer ocasionados por infecções virais, o HPV é responsável por um total de 5% dos casos (VONSKY, et al., 2019). O HPV 16 está presente em aproximadamente 60,5% das mulheres acometidas por câncer cervical, com o segundo maior número de casos sendo causado pelo HPV 18, com uma incidência de 14,2% (SERRANO, et al., 2018; VONSKY, et al., 2019). O tempo entre a instalação da doença e surgimento do processo de tumorigênese varia, podendo ocorrer após 10-20 anos (CARVALHO et al., 2020).

Os motivos para a doença continuar existindo e para a taxa de mortalidade não ter uma diminuição considerável em países subdesenvolvidos muitas vezes ocorre pela falta de diagnóstico precoce, sem um acompanhamento por exames de rotina como o Papanicolaou, além da distribuição desigual de informações perante a classe social envolvida, o que leva a um aumento do número de infecções pelo desconhecimento de como a doença é transmitida, por exemplo pela ocorrência de relação sexual desprotegida (PAL, KUNDU, 2020).

Segundo estudos, o HPV é a infecção sexualmente transmissível (IST) mais contagiosa, existindo uma chance de 15-25% de se infectar pelo vírus a cada novo parceiro sexual, ou seja, sua transmissão mostrou ser ainda mais elevada do que vírus da imunodeficiência humana (HIV) e herpes genital; entretanto, a maior parte dos infectados seguem uma via assintomática e apenas 2% evoluem com alterações citopatológicas (CARVALHO et al., 2020).

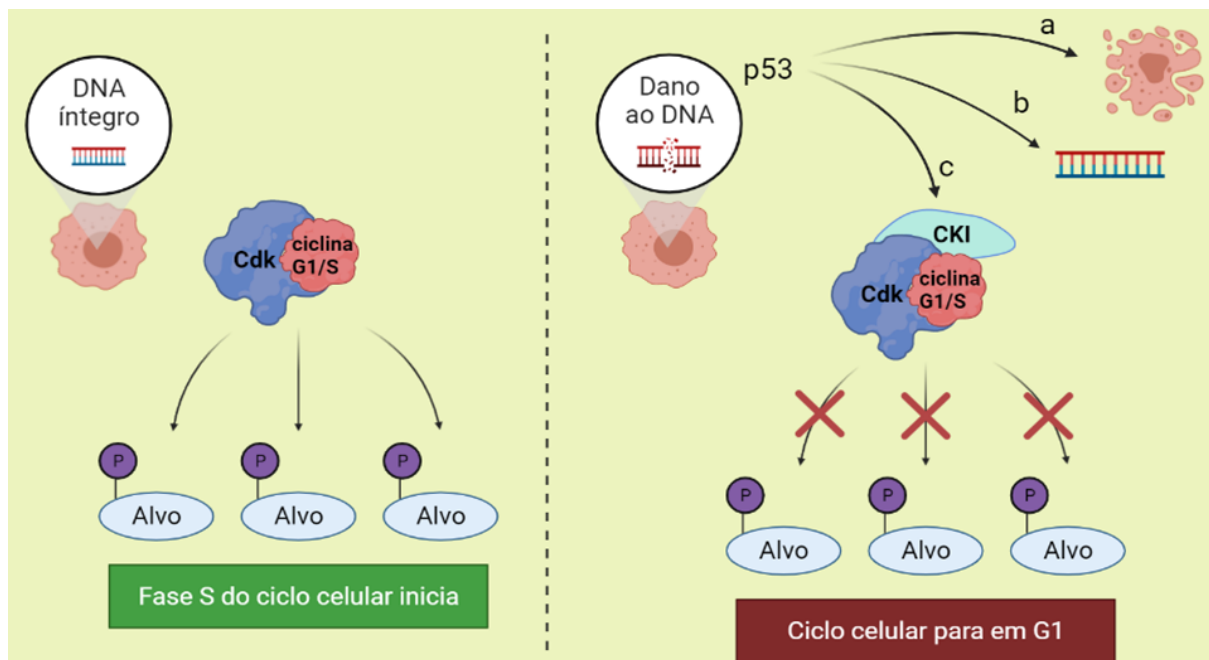
4.2 CICLO CELULAR E OS SUPRESSORES TUMORAIS

Nossas células se encontram na fase de interfase, ou seja, de crescimento e preparo para a divisão, na maior parte do tempo, fase a qual é dividida em G1, S e G2. Por vezes, podem apresentar-se também no intervalo G0, uma fase de repouso. Com os estímulos certos, a célula avançará para a fase G1, preparando os maquinários necessários para que haja a síntese de DNA em seguida. A fase S é o momento no qual o DNA será replicado por inteiro no núcleo e há formação do centrossomo. Após a síntese de DNA, a célula avança para a fase G2, quando haverá a síntese de proteínas/lipídeos responsáveis pela mitose que ocorrerá em seguida (WANG, 2021b).

As fases G1 e G2 possuem pontos de checagem, em G1 a fim de verificar se os requisitos para a síntese de DNA foram atingidos e em G2 para garantir que não houve erros na cópia do DNA. Para auxiliar nesse controle, existem proteínas denominadas supressoras tumorais, sendo elas: a pRB e a p53, também conhecida como “guardiã do genoma”. A primeira, quando não está fosforilada, liga-se a um fator de transcrição responsável pela síntese de DNA, denominado E2F; entretanto, quando fosforilada, a pRB desliga-se de E2F, deixando-a livre, permitindo que a célula avance de G1 para S (RIFAI, HORVATH, WITTEW, 2018). Já a p53, contribui com a manutenção celular por levar a prisão do ciclo celular em G1 via p53-DREAM e por ativar a transcrição de proteínas pró-apoptóticas (PUMA e NOXA) em resposta a estímulos estressantes, como danos ao DNA, resultando na inibição da via BCL-2 (células B2 de linfoma) com conseqüente apoptose (AUBREY, et. al, 2018; ENGELAND, 2018). Quando sua presença não se faz necessária, a proteína MDM2 (murine double minute 2), ativada transcricionalmente pela própria p53 (via de feedback negativo), leva a sua degradação proteossômica, mantendo-a em níveis baixos na célula (HAREŽA, WILCZYŃSKI e PARADOWSKA; 2022). Além disso, a p53

também produz inibidores de Cdk (CKI - Inibidor de quinases dependentes de ciclinas), que se ligam ao complexo Cdk-ciclinas, interrompendo o ciclo celular no ponto de checagem G1 por impedir a fosforilação de proteínas alvo-específicas (RIZZOTTO, ENGLMAIER e VILLUNGER, 2021). A figura 1 elucida as ações da p53 citadas de forma simplificada.

Figura 1: Ciclo Celular.



Fonte: Os Autores.

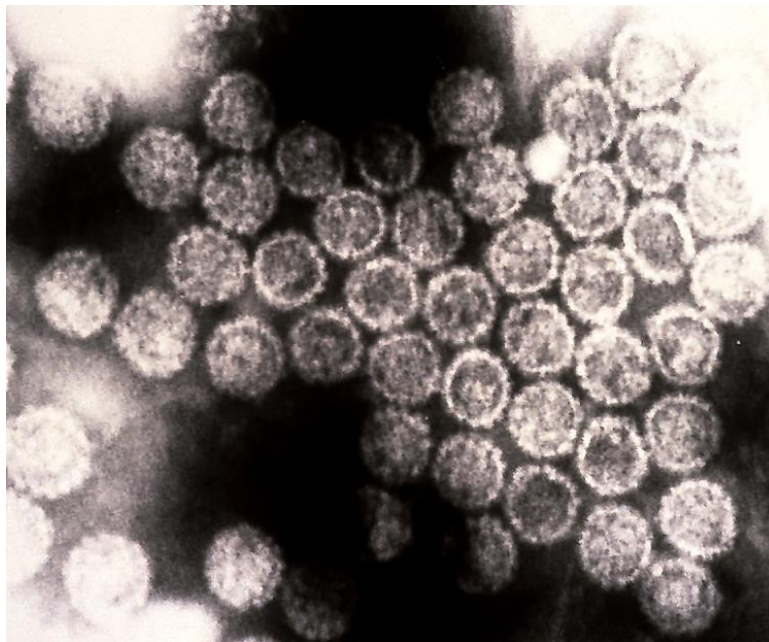
Nota: Diferença na continuidade do ciclo celular quando há resposta ao dano no DNA, onde a p53 é ativada podendo levar a: a) apoptose, b) vias de reparo do DNA e c) estimular produção de inibidores de cinase dependentes de ciclinas (CKI), que irão impedir a fosforilação de proteínas alvo importantes para a fase S do ciclo celular. De forma generalizada, o ciclo celular é regulado por proteínas das classes Cdk's (quinases dependentes de ciclinas) e ciclinas.

4.3 O HPV

4.3.1 Características

Os HPVs fazem parte da família Papillomaviridae (PV), os quais infectam queratinócitos da pele e mucosa de diferentes espécies, já o HPV, apenas de humanos. Há aproximadamente 450 tipos de HPV distintos, agrupados em cinco gêneros diferentes, sendo o gênero alfa o mais estudado, por estarem mais relacionados ao aparecimento de cânceres. São formados por DNA dupla fita circular, não envelopados, com capsídeo de simetria icosaédrica (BRIANTI et al., 2017; SANTACROCE et al., 2021).

Figura 2: Eletromicrografia do Papilomavírus Humano.



Fonte: WHO, 2017.

Nota: HPV visualizado por microscopia de transmissão mostrando estrutura viral.

Existem HPVs de baixo risco oncogênico (LRHPV), que não costumam se acoplar ao DNA do hospedeiro, e alto risco (HRHPV), considerados oncogênicos. A maioria destes vírus são de baixo risco, não tendo grande importância clínica, associados a lesões benignas como papilomas, que comumente são os HPVs 6 e 11. Já os vírus de alto risco são responsáveis por lesões malignas que geralmente são anais, genitais e algumas vezes orais, sendo ocasionados em sua grande maioria pelos HPV 16 e 18 (SANTACROCE et al., 2021).

Sua transmissão ocorre majoritariamente através da atividade sexual, podendo ser passado de um indivíduo para outro por contato entre mãos com depósito de vírus e genital ou vice-versa, além do contágio durante o parto (CARVALHO et al., 2020).

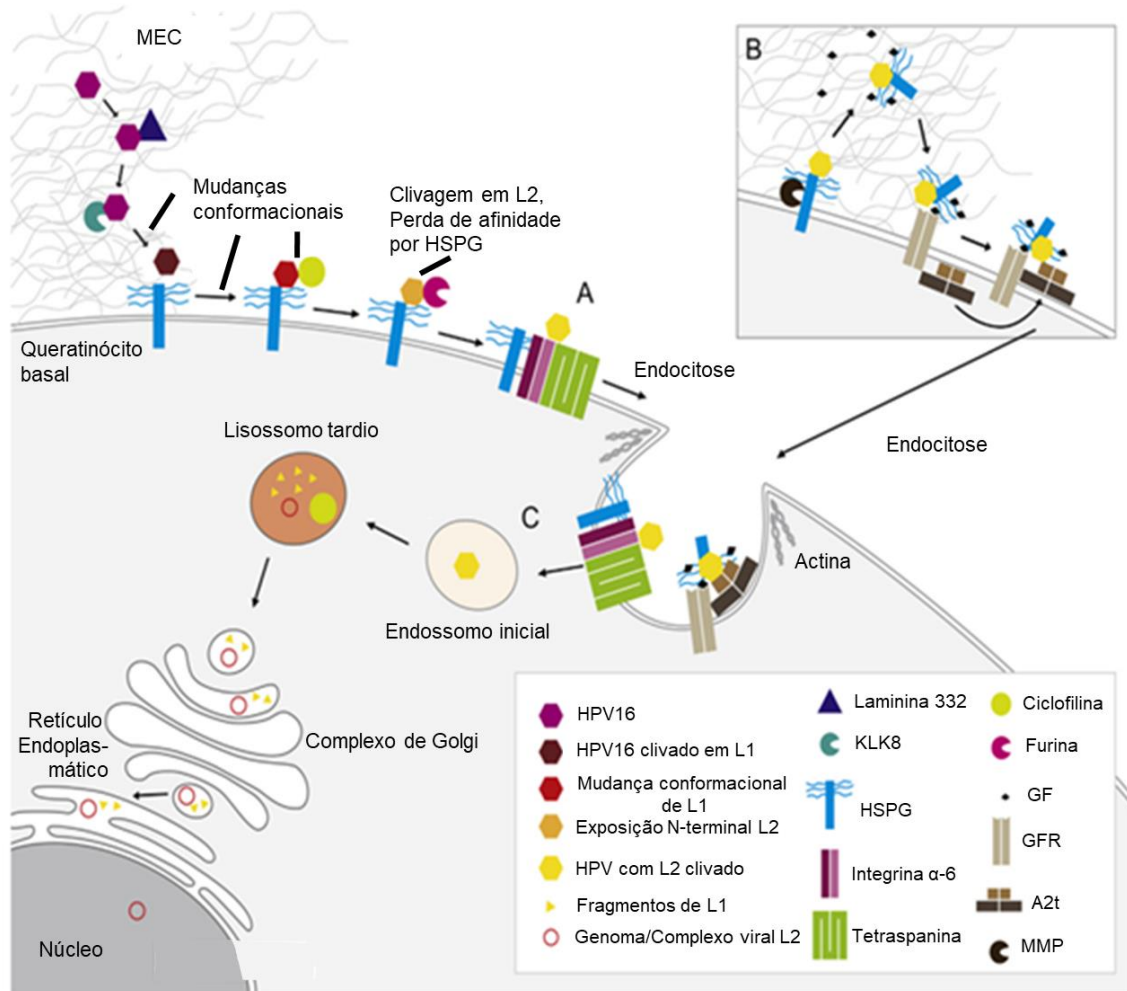
4.3.2 Ciclo de vida viral

Quando o vírus encontra uma micro lesão no epitélio, é o suficiente para sua transmissão, pois encontrará a membrana basal (MB) e queratinócitos basais (célula permissiva e suscetível à infecção). Adicionalmente, foi encontrado que o processo de regeneração do tecido é um pré-requisito para a infecção. A MB serve como um guia

para o HPV encontrar células permissivas, no caso, queratinócitos basais - células mitoticamente ativas (LIU, et al. 2019).

Ao chegar na MB, a proteína estrutural L1 do HPV é clivada por uma protease, calicreína-8 (KLK8), extracelularmente. Essa clivagem facilita a ligação da L1 com a glicoproteína sulfato de heparana (HSPG) presente na superfície das células. Foi provado que esta glicoproteína é um receptor para o HPV. Em seguida, o HPV, ainda na superfície da célula, sofrerá ação da Ciclofilina B (CyTB), levando à exposição da região N-terminal de L2, que possui um sítio de clivagem da Furina, uma convertase de pró-proteínas, que além de permitir a entrada do vírus, expõe um epítipo que escapará da digestão no endossomo. Após a clivagem, o HPV perde a afinidade pela HSPG e passa ter afinidade por um outro receptor que levará a sua entrada na célula: integrina alfa-6, ou alternativamente se complexando à fatores de crescimento e entrando por receptores de fator de crescimento. Após estes eventos e mudanças conformacionais, o HPV entra na célula por macropinocitose. No endossomo, L1 é fragmentada e L2 permanece associada ao DNA viral e é levada até o aparelho de Golgi, transportada até o retículo endoplasmático e finalmente internalizada no núcleo. (AKSOY et al. 2019; LIU et al. 2019). Uma representação esquemática pode ser observada na figura 3. Na infecção inicial, o vírus faz cerca de 200 cópias por célula, mantendo o DNA viral epissomático criando uma espécie de reservatório de infecção (GRAHAM, 2017).

Figura 3: Mecanismos de entrada do HPV.



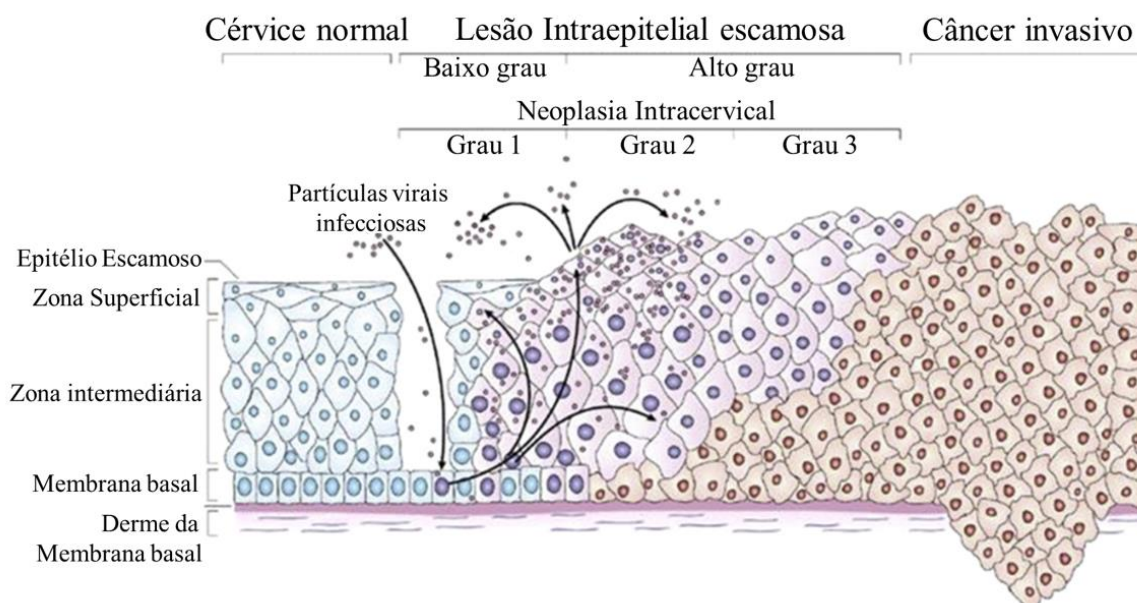
Adaptado de: AKSOY et al., 2019.

Nota: mecanismo do qual o vírus infecta uma célula permissiva (queratinócito basal). A): após clivagens e mudanças conformacionais no vírus, é exposto um epítipo em L2 permitindo o escape da digestão no endossomo, deixando também de ser reconhecida pelo primeiro receptor, HSPG, e passa a ser reconhecida e interagir com a integrina alfa-6, entrando na célula por macropinocitose. B): alternativamente, o HPV após clivagens e L2 com epítipo exposto pode complexar-se a fatores de crescimento e entrar na célula por macropinocitose. C): formação do endossomo precoce, seguido do endossomo tardio, ou lisossomo, com o escape do vírus, degradando L1 e exposição de seu material genético associado à L2, em seguida adentra o complexo de Golgi, sendo processado e internalizada no núcleo pelo retículo endoplasmático posteriormente.

Neste estágio, dependendo da diferenciação e maturação dos queratinócitos, o vírus agirá de forma correspondente. Nas camadas mais baixas do epitélio (células basais e parabasais), E6 e E7 são expressas a fim de estimular a divisão celular, principalmente pela E7 estar envolvida na liberação de E2F permitindo a divisão celular. Nas camadas intermediárias, com o genoma amplificando, as proteínas E1, E2, E4, E5, E6 e E7 aumentam drasticamente. Já nas camadas mais superiores as proteínas expressas predominantemente são E4, L1 e L2, visto que são as responsáveis pelo empacotamento viral sendo liberadas posteriormente pelas células

senescentes ou pela ação da E4, a qual desestabiliza a membrana pela formação de fibras amilóides, levando a re-infecção pelo HPV. Isto traduz à infecção inicial do HPV nas células, entretanto o fator chave que leva a progressão da lesão, ou de doença, é a integração genômica do HPV, com conseqüente perda da E2 e parte da E4, incapacitando o empacotamento viral, mas promovendo a superexpressão dos genes E6 e E7, devido a perda do gene regulador de sua expressão (E2) e o começo da carcinogênese pela proliferação exagerada das células basais, a qual se torna a forma do vírus se replicar (DE SANJOSE, BROTONS, PAVON, 2018, LIU et al. 2019).

Figura 4: Progressão da doença causada pela infecção por HPV.



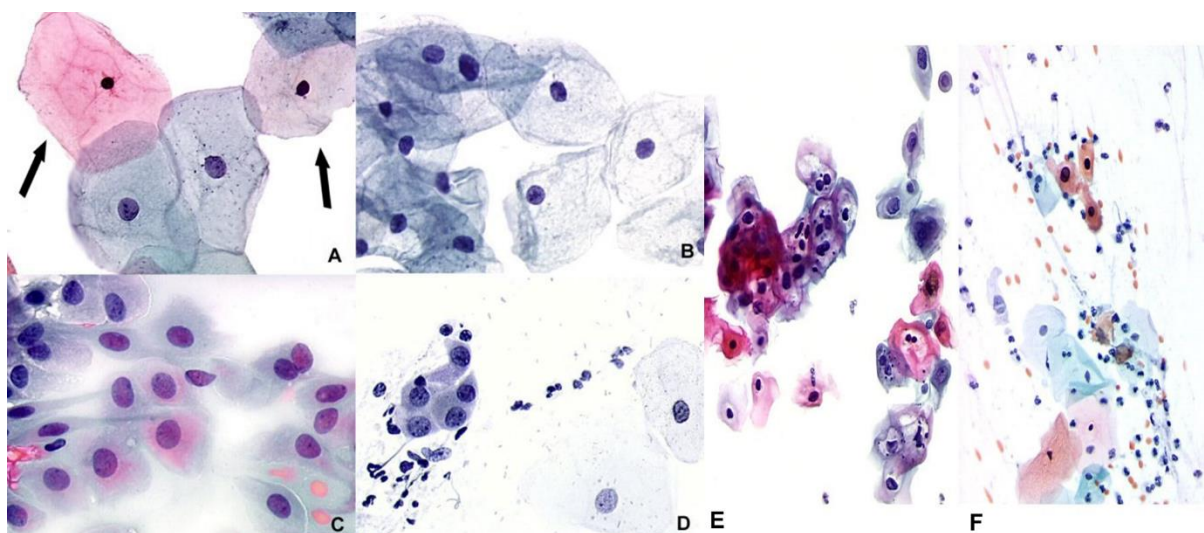
Fonte: DE SANJOSE, BROTONS, PAVON, 2018.

Nota: representa o início da infecção, sendo necessário uma micro lesão, na membrana basal, nos queratinócitos, seguido de sua progressão nas camadas superiores adjacentes, passando pelos graus 1, 2 e 3 de lesão até o câncer invasivo, rompendo a membrana basal.

Acerca das placas amilóides, provocadas pela E4, levando a formação de coilócitos, tem muito se estudado a atuação de E5 e E6 na formação dos coilócitos (VONSKY et al. 2019, LIU et al. 2019, KRAUSE, NEELON, BUTLER 2021). O epitélio escamoso cervical quando submetido ao estresse responde com alterações nucleares e citoplasmáticas observáveis pela citologia, como o caso dos coilócitos, cujo é um efeito citopático presente em células infectadas pelo HPV (OLIVEIRA, 2017). Os coilócitos são células epiteliais escamosas de núcleo hiper cromático de borda irregular e maior em relação ao tamanho de células escamosas intermediárias, com

halo coilocitótico visível, podendo apresentar ou não binucleação. Acredita-se que este fenômeno ocorra devido a síntese de DNA não programada por células diferenciadas (“erro” no ciclo celular), na falha da citocinese induzida por oncoproteínas (ação de E6 e E7). E há disqueratoses: alterações na quantidade de queratina tornando-as intensamente coradas e irregulares quando observadas na citologia oncótica (OLIVEIRA, 2017, KRAUSE, NEELON, BUTLER 2021).

Figura 5: Citologia normal vs. efeitos citopáticos causados pelo HPV.



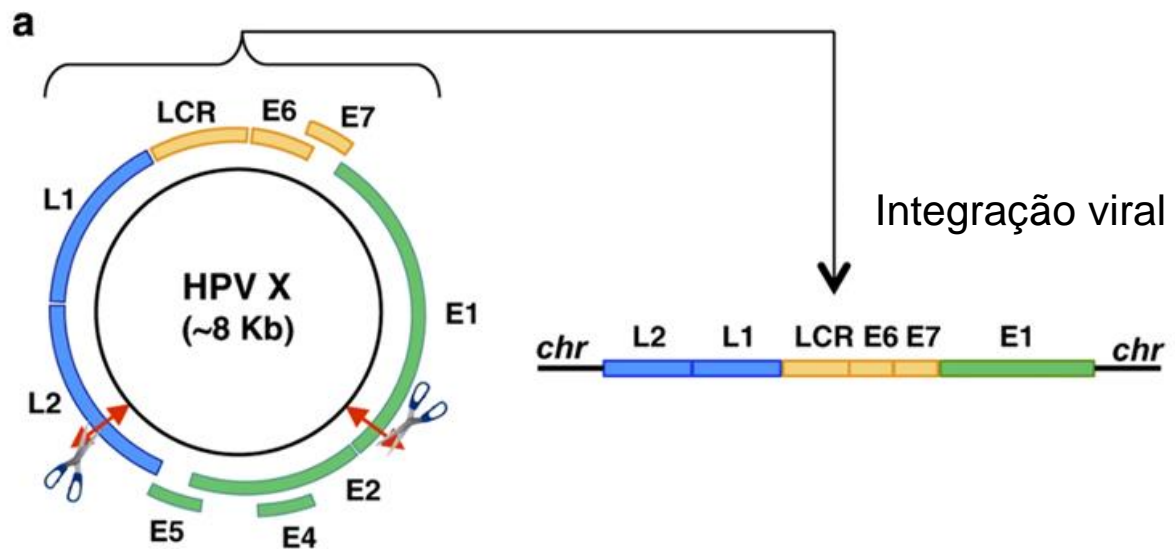
Fonte: INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2022.

Nota: O exame de Papanicolaou analisado ao microscópio. As figuras de A a D são representações normais, E e F são representações anormais característica de lesão por HPV. A) células superficiais apontadas com a seta; B) células intermediárias; C) células parabasais; D) células metaplásicas; E) e F) coilocitose, células com disqueratose, halo coilocitótico, binucleação, discoiose e células disformes.

4.3.3 Proteínas virais

O genoma do HPV é composto por três regiões, sendo elas: codificadora tardia/late (L), que expressa as proteínas estruturais L1 e L2 do capsídeo; codificadora precoce/ early (E), responsável pela produção de E1, E2, E4, E5, E6 e E7 e, por fim, pela região de controle longo (LCR), onde se encontram a origem de replicação e vários sítios de ligação para fatores de transcrição, que podem ser enhancers ou silencers (PAL, KUNDU, 2020).

Figura 6: Integração do Genoma Viral ao DNA do hospedeiro.



Fonte: HOLMES et al., 2016

Nota: Ponto de quebra no genoma viral observado com maior frequência nas células estudadas, levando a tumorigênese, onde o gene E2 é cortado e, com isso, há perda da inibição na expressão de E6 e E7.

Em prosa, E1 e E2 regulam a replicação viral e controlam a transcrição das proteínas early, mas E1 apresenta ainda o papel de DNA helicase (HAREŽA, WILCZYŃSKI e PARADOWSKA; 2022). Enquanto o material genético viral está íntegro, a proteína E2, que é um fator de transcrição, inibe a expressão de E6 e E7 por se ligar a região do promotor desses genes, mas a partir do momento em que o HPV se incorpora ao DNA, ocorre a repartição da sequência que codifica E2 e sua função, conseqüentemente, é perdida. Além disso, através do auxílio indireto da E5, as proteínas E6 e E7 começam a atuar na célula, induzindo o perfil oncológico (PAL, KUNDU, 2020; HAREŽA, WILCZYŃSKI e PARADOWSKA; 2022).

E4 é a última proteína, antes da fase tardia, sintetizada em larga escala na camada suprabasal e do epitélio granular, que interage com o citoesqueleto celular, formando filamentos amilóides associados à queratina nas células que estão na camada superior e/ou camada média, fragilizando-as, o que facilita a disseminação e liberação dos vírions (VONSKY, et al. 2019).

4.3.4 Processo de carcinogênese

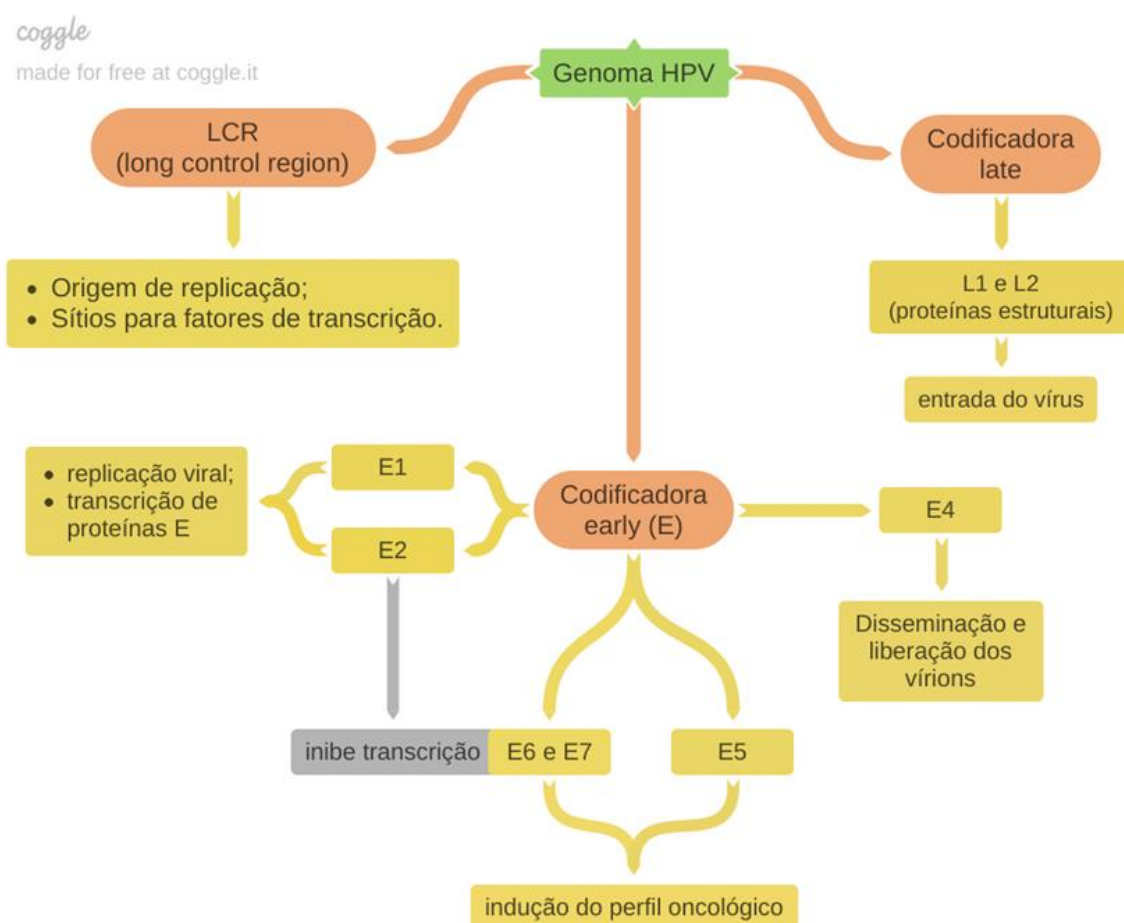
Dentre as funções da proteína E5 estão: ativar o fator de crescimento EGFR; inibir a apoptose ao degradar os receptores Fas (CD95) localizados na superfície de várias células e responsáveis por ativar uma via de sinalização que leva à apoptose;

modula a motilidade e adesão celular; leva ao escape do sistema imune reduzindo a expressão do complexo principal de histocompatibilidade humana (MHC) classe I e II, inibindo a ação de células natural killers (NK) e a resposta ao interferon (PAL, KUNDU, 2020; KASHYAP, GARG, GOEL, 2021).

Além disso, vem sendo proposto denominar E5 como viroporina, visto que ela é uma proteína transmembranar, influenciando a homeostase de íons e transferência de vesículas (VONSKY, et al. 2019).

Enquanto isso, as proteínas E6 e E7 atuam sinergicamente, induzindo o processo de carcinogênese por meio de seis mecanismos diferentes, sendo eles: degradação/inibição de supressores tumorais; imortalização das células; indução da angiogênese; invasão de outros tecidos e sinalização proliferativa mantida (PAL, KUNDU, 2020). Embora E5 não atue diretamente no processo de carcinogênese, ela aprimora os danos causados pela E6 e E7 (HAREŻA, WILCZYŃSKI e PARADOWSKA; 2022).

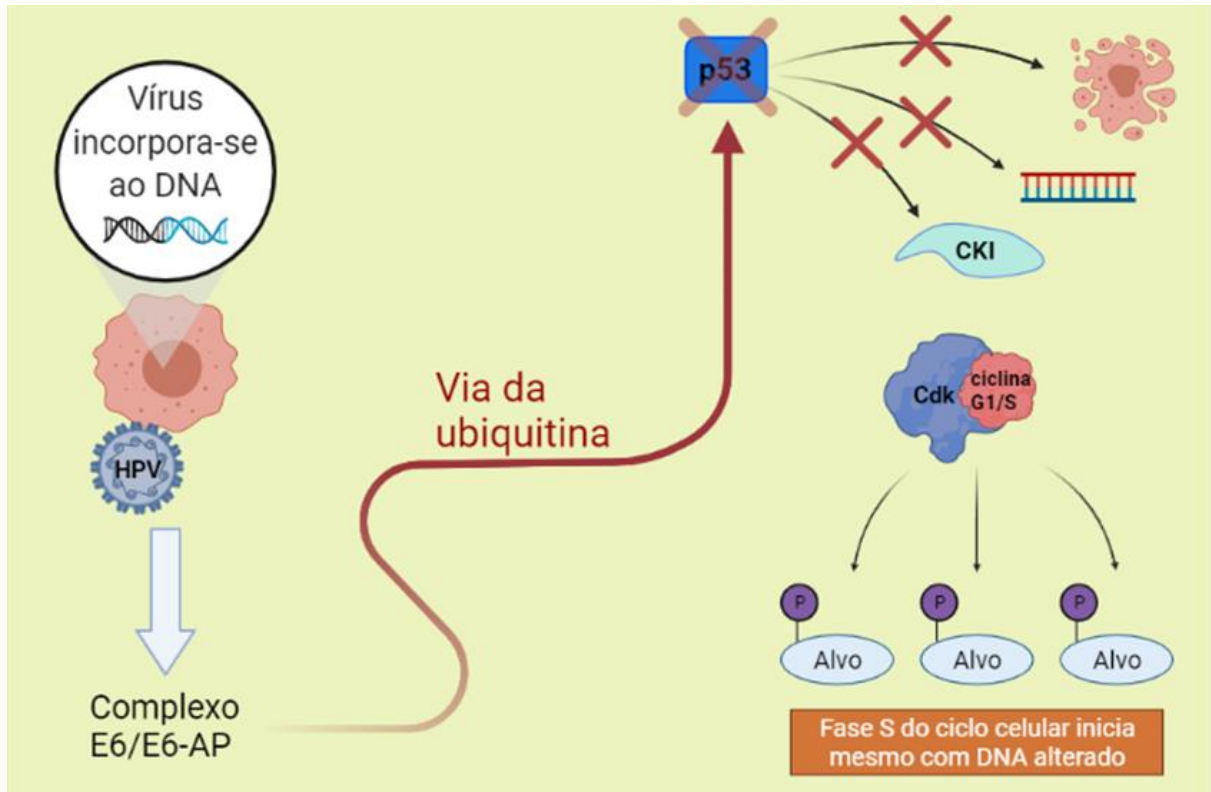
Figura 7: Esquema acerca do genoma do HPV.



Fonte: Os Autores.

A proteína E6, promove a ubiquitinação exagerada de p53, levando a sua degradação com a consequente desregulação de indutores e inibidores de angiogênese, promovendo a nutrição e oxigenação do tecido, corroborando com o crescimento exacerbado das células tumorais. A E6 também possui como alvo a Bak (Antagonista/Assassina BCL-2), uma proteína que induz a produção de citocromo C (um sinalizador de morte celular programada) criando uma ação sinérgica com E5 em promover a inibição da apoptose (ALMEIDA et al., 2019; VONSKY, et al. 2019). Além disso, foi observado uma outra ação imortalizadora em que E6 desregula o processo de replicação de DNA por ativar a transcriptase reversa da telomerase humana (hTERT), controlando o encurtamento telomérico e o envelhecimento celular (KATZENELLENBOGEN, 2017).

Figura 8: A ubiquitinação da p53.



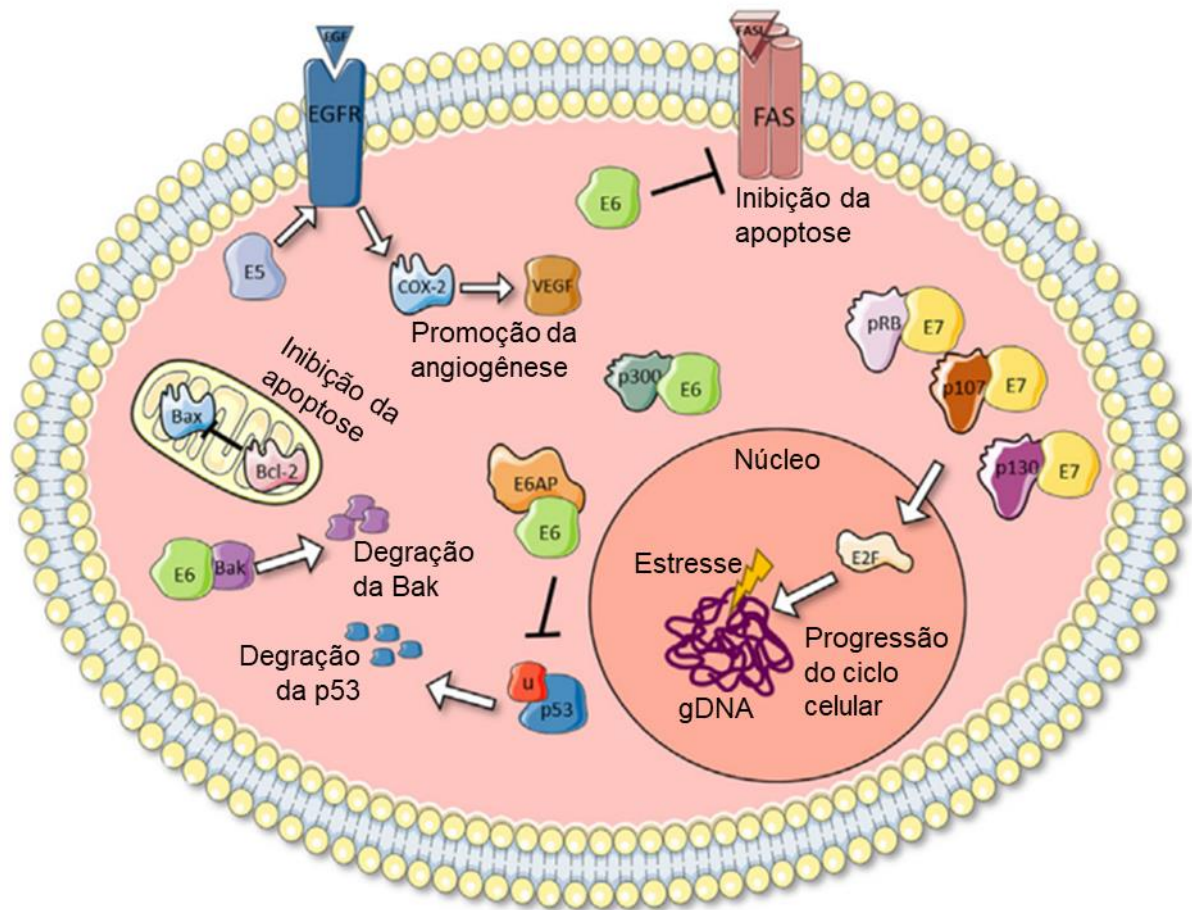
Fonte: Os Autores.

Nota: incorporação do HPV ao genoma, consequente formação do complexo E6/E6-AP (proteína associada a E6) levando a ubiquitinação da p53, impedindo a apoptose, reparo do DNA e inibição de CKI, levando à progressão do ciclo celular mesmo com DNA alterado.

Já a E7 possui 3 domínios bem conservados (CD1, CD2 e CD3), sendo os dois últimos os mais importantes. O domínio CD2 tem a capacidade de se ligar a partir do motif LxCxE nas proteínas pRb, p107 e p130, as quais fazem parte da família “pocket proteins”, direcionando-as para a ubiquitinação e suprimindo-as. Como citado anteriormente, a pRb é importante por impedir que o ciclo celular avance da fase G1 para S quando há danos no DNA. Por isso, com sua degradação, o complexo pRb-E2F é quebrado deixando E2F livre, o que promove condições para os vírus se replicarem, havendo a quebra do ciclo celular e favorecendo a malignização tecidual (VONSKY, 2019; SANTACROCE 2021).

O Domínio CD3 interage com inibidores de CDKs (CKIs), como a p21 e a p27 suprimindo-as e inibindo a parada do ciclo celular, além de se ligar à DNA Metiltransferase (DNMT) levando ao aumento incontrolado da metilação do DNA e a ruptura da regulação epigenética (SEN, GANGULY, GANGULY 2018).

Figura 9: Alvos de atuação das proteínas E5, E6 e E7



Adaptado de: ALMEIDA, et al., 2019.

Nota: Em uma célula infectada pelo HPV, temos a produção das oncoproteínas E5, E6 e E7. Neste cenário, E5 leva ao aumento da angiogênese por estimular receptores para fatores de crescimento, aumentando a produção de VEGF. E6 leva a ruptura de diversas funções: forma um complexo com a proteína E6AP levando a ubiquitinação da p53, promovendo a divisão celular mesmo com DNA alterado; degrada a Bak, responsável pela ativação de vias apoptóticas. A degradação da p53 leva a produção de BCL-2 aumentar, inibindo a Bax que, por sua vez, também ativa vias apoptóticas; por fim E6 pode ligar-se à FAS acelerando sua degradação, dessa forma maximizando a inibição da apoptose. E7 por outro lado atua na pRB, p107 e p130 (família *pocket proteins*, similares à pRB), responsáveis em impedir o ciclo celular havendo falhas no DNA por regularem o fator de transcrição E2F, levando a proliferação descontrolada de células infectadas.

Em prosa, E6 e E7 atuam de forma sinérgica induzindo instabilidade genética, desestabilizando complexos transcricionais e promovendo a proliferação celular descontrolada. Esta hiperproliferação causada pelas oncoproteínas leva ao estresse replicativo, o que também desestabiliza o genoma (ARALDI 2018).

4.3.5 Tipos de lesões

O HPV pode infectar queratinócitos do epitélio escamoso estratificado humano, como os tecidos cutâneos e/ou de mucosa e, como citado anteriormente, são divididos

em HPVs de baixo (LRHPV) e alto risco oncogênico (HRHPV), de acordo com seu potencial carcinogênico. Uma microlesão é o suficiente para a transmissão por atingir a membrana basal e os queratinócitos basais. Foi encontrado que células apoptóticas com vírions em seu interior promovem a infecção/transmissão (LIU, et al. 2019; VONSKY, et al. 2019).

De acordo com a classificação Bethesda (2001) de citologia cervical, existem as seguintes categorias:

- Células atípicas de significado indeterminado (ASC-US);
- Não se pode excluir lesão intraepitelial de alto grau (ASC-H);
- Lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL);
- Lesão intraepitelial de alto grau (HSIL);
- Células glandulares atípicas não especificadas (AGC-NOS);
- Células glandulares atípicas, provavelmente adenocarcinoma *in situ* (AIS).

A ausência de células atípicas/ anormais e citologia atípica sem evidência de malignidade é considerada como dentro dos limites de normalidade. Já neoplasias intraepiteliais cervicais I (NIC1) são consideradas LSIL, sugestivas de uma infecção por HPV, mas podendo curar-se espontaneamente. Em seguida, NIC2 e NIC3 correspondem à moderada ou severa neoplasia intraepitelial cervical e, por fim, há o carcinoma invasor. Os HRHPV são responsáveis por aproximadamente 75% de todos os cânceres de células escamosas (VONSKY, et al. 2019).

4.4 TRATAMENTOS ATUAIS

Os tratamentos existentes em uso para os casos de câncer de colo de útero incluem a crioterapia, eletrocauterização, cirurgia de alta frequência (CAF), cirurgia a laser ou ainda a remoção parcial/completa do órgão (histerectomia). Tais intervenções embora funcionais e vistas como a melhor alternativa para o momento, são invasivas e têm sua ação apenas sobre o processo oncológico, não curando o indivíduo da doença, visto que o DNA viral permanece nas células do hospedeiro, podendo ocorrer o reaparecimento das manifestações subsequentemente ou impossibilitar uma gravidez (SIMÕES e JUNIOR, 2019; PAL, KUNDU, 2020; CARVALHO et al., 2020).

Além disso, são usados a quimioterapia e a radioterapia, que infelizmente inviabilizam uma boa qualidade de vida por seus efeitos colaterais, debilitando o paciente com câncer (AKWIDITYA et al., 2021).

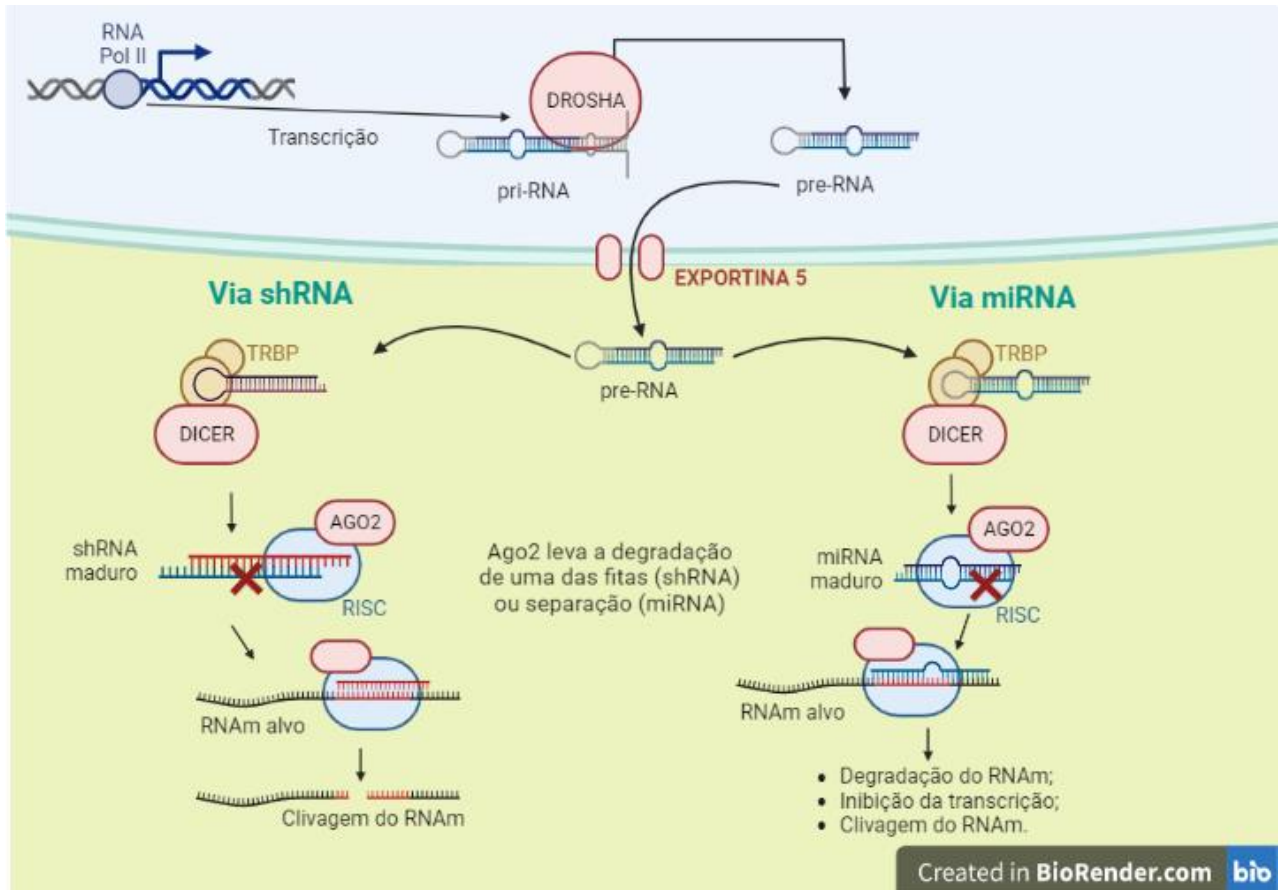
4.4.1 MicroRNA (miRNA ou miR) e Short Hairpin RNA (shRNA)

4.4.1.1 Definição

Os microRNAs foram descobertos em 1993 e, assim como os shRNAs fazem parte da classe de RNAs pequenos não codificadores (ncRNA), ou seja, são um subtipo de RNAi, formados por cerca de 20 a 22 nucleotídeos (nt), os quais têm seus precursores transcritos pela RNA polimerase II (RODWELL et al, 2018). Ambos controlam a tradução, ou seja, regulam a formação de proteínas, de forma a impedi-la e, para isso, se anelam a uma região específica a do RNA mensageiro (RNAm) alvo e as degradam. O shRNA é desenhado de forma que suas sequências se pareiem por complementaridade de bases, formando uma dupla fita de RNA (dsRNA) em forma de gancho, dadas pelas regiões que não se anelaram. Ambos ao serem processados na célula, originam o complexo RISC (RNA induced silencing complex), uma estrutura catabolicamente ativa formada pela enzima Argonaute 2 (Ago2) e a fita simples de RNA (chamada a partir desse momento de fita guia), a qual clivará toda a sequência que parear (ALBERTS et al., 2017; SHARMA et al., 2020). Os microRNAs podem ainda hibridizar a sequências de RNAm que não sejam integralmente complementares, exercendo a função de bloqueio da tradução ou levar a degradação do RNAm (RIFAI, HORVATH, WITTEWER, 2018).

Enquanto os microRNAs participam da regulação fisiológica da expressão gênica pós-transcricional de uma variedade de proteínas, os shRNA foram criados em laboratório, por meio da inserção de gene em plasmídeo.

Figura 10: Via do microRNA e do shRNA.



Fonte: Os Autores.

Nota: ao lado direito, via do microRNA desde sua produção, saída do núcleo e subsequentes processamentos até seus mecanismos de ação. Ao lado esquerdo, via do shRNA e seus subsequentes processamentos, similares aos do microRNA, até seu mecanismo de ação. Ambos são transcritos pela RNA polimerase II, formando um RNA primário (pri-RNA), que sofre ação da Droscha, uma enzima que corta dupla fita de RNA, formando uma extremidade 3' overhang e dando origem ao pre-RNA, que é transportado para o citoplasma pela Exportina 5. Após isso, a proteína TRBP e a enzima Dicer se complexam a fita de RNA, formando a outra extremidade 3' overhang. Quando isso ocorre são formados shRNAs ou miRNAs maduros, encontrados pela Argonaute 2 (Ago2) que leva a degradação de uma das fitas no shRNA e a separação no miRNA, fita a qual recebe o nome de passenger strand. Então o complexo RISC (RNA induced silencing complex) juntamente com a fita guia de RNA se ligam ao RNA mensageiro alvo por complementaridade de bases, levando apenas a sua clivagem no caso do shRNA ou à degradação, inibição da transcrição e clivagem na via do microRNA.

4.4.1.2 Aplicação no câncer

A regulação por microRNAs está relacionada à expressão gênica de diversas proteínas envolvidas com o desenvolvimento e crescimento da célula e, quando há uma perturbação em suas funções devido a uma alteração em sua própria formação por modulação epigenética, por exemplo, diversas doenças podem surgir, inclusive o câncer (ARGHIANI e SHAH, 2022). Essas moléculas podem ser divididas em duas categorias, sendo elas: OncomiRs, superexpressos em células cancerosas e relacionados a progressão tumoral, como é o caso do miR-21 e MiR supressores

tumorais, que contribuem com a inibição da tumorigênese, como o miR-143 (TAN, et al., 2018).

Yang (2017), Wong (2018), Naorem (2019) e seus respectivos colaboradores estão de acordo que miRs são ótimos biomarcadores, sendo uma ferramenta para o diagnóstico de câncer, assim como seu prognóstico e tratamento, devido a sua desregulação em processos cancerosos e sua não uniformidade, visto que um mesmo miR pode ser encontrado desregulado em cânceres diferentes, tornando-o um alvo de estudo para futuras terapias muito promissoras. A expressão aberrante de miRs é muito observada em tumores, regulando processos celulares como a apoptose, ciclo celular, proliferação e diferenciação, auxiliando na evolução do câncer e piora do prognóstico (SHEN et al., 2020). Yang et al. (2017) conduziu um estudo acerca do microambiente tumoral e a expressão de miR destas células, dentre elas temos: fibroblastos normais (FNs) e fibroblastos associados ao câncer (FACs). Foi observado que células cancerosas, FACs e FNs podem secretar miRs exossomais que agem entre si e, estando desregulados, podem influenciar na ativação de FACs, promovendo migração tumoral, metástase, resistência farmacológica e um pior prognóstico, desta forma, a avaliação do microambiente tumoral permite uma intervenção mais precisa.

Este microambiente complexo é causado pela inflamação crônica do HPV, podendo interagir com citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e enzimas, como as ciclooxigenases e metaloproteinases de matriz (MMP), além de induzir alterações genéticas e epigenéticas, afetando criticamente vias de sinalização da homeostase (DA SILVA et al., 2021).

Especificamente sobre o câncer cervical, foi visto que as proteínas virais E6 e E7 podem estar envolvidas com a hipermetilação de determinados genes relacionados à expressão de OncoMiRs (upregulation) ou ainda, com a atenuação (downregulation) de outros tipos de miRNA (SHEN et al., 2020). O quadro 1 demonstra a complexidade dos principais microRNAs estudados no câncer cervical, apresentando suas diferentes funções, do qual um mesmo miR pode ter mais de um alvo conhecido e estudado.

Quadro 1. MicroRNA no Câncer Cervical (CC).

MiR	Expressão	Alvo estudado	Ações	Bibliografia
21	Upregulated	Supressor de tumor (PTEN)	Migração celular e metástase	(ZAMANI et al., 2019)
27	Upregulated	FBXW7 (silenciamento)	Proliferação e formação de colônias; progressão acelerada do ciclo celular	(BEN et al., 2020)
29a	Downregulated	Gene p16	Bloqueio da transição G1/S	(WANG et al., 2021a)
125	Upregulated	HMGA1	Promove tumorigênese e impede a apoptose	(SUN et al. 2019)
143	Downregulated	GOLM1	Biossíntese e transporte de proteínas	ZHOU et al., 2018.
	Downregulated	BCL-2	Autofagia e apoptose	LIU et al. 2018.
	Downregulated	HIF-1a (fator induzível por hipóxia 1 alfa)	Controle de angiogênese e proliferação celular	(ZHAO, LIU, LU; 2017)
214	Downregulated	BCL-2 (silenciamento)	↑ Sensibilidade ao tratamento quimioterápico com cisplatina	(NAHAND et al., 2019)
		Bax, Caspase 9, 8 e 3	Inibição da proliferação celular, leva a apoptose	
218	Downregulated em NIC2 e NIC3	AKT-mTOR	↑ Sensibilidade a cisplatina	(SHEN et al., 2020)
211	Downregulated	BCL-2	Autofagia e apoptose	(LIU et al. 2020a)
489	Downregulated	Via pi3K/AKT/P53	Supressão tumoral	(JUAN et al. 2018)
641	Downregulated	ZEB1	Inibe migração celular e invasão	(YAO et al., 2018)
1284	Downregulated	HMGB1 (silenciamento)	Apoptose; ↑ sensibilidade a cisplatina	(WANG e LIANG, 2020)

Fonte: Os Autores.

Nota: o quadro sintetiza os dados obtidos sobre os principais microRNAs estudados no câncer cervical, a fim de demonstrar sua complexidade. Nele, vemos a função de cada miR sobre seu determinado alvo, podendo estar relacionado com a supressão tumoral (como é o caso dos que se encontram downregulated/subexpressos no câncer) ou com a progressão do câncer (microRNAs upregulated/superexpressos).

Em relação ao short hairpin RNA, este foi criado com a finalidade de resolver determinadas limitações presentes na interferência de pequenos RNAs (siRNA), principalmente na questão do tempo de vida, que foi aumentado, pois diferentemente dos siRNAs, os shRNAs são produzidos intracelularmente, através da transfecção de um plasmídeo contendo o gene para sua confecção, havendo sua renovação durante o tempo, no momento de sua expressão, algo que não ocorre com o siRNA, por ser necessária sua reuplicação (ACHARYA, 2019). Sua aplicabilidade no câncer varia,

podendo ser utilizada tanto no silenciamento de oncoproteínas virais, como é o caso do HPV ou ainda, de genes mutantes que estão induzindo o perfil tumoral das células, a depender do alvo para o qual o shRNA em questão foi desenhado (KARIM et al., 2018).

4.4.1.3 Informações sobre o miR-143

Dois estudos experimentais com células de tumores removidos de pacientes testaram a utilização do miR-143 no câncer cervical. Ambos, através da reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa (RT-PCR), observaram a expressão de miR-143 em células normais/controle comparadas às células tumorais ou NIC I, II e III, constatando que possuem expressão reduzida deste microRNA, sendo o primeiro grupo mais notável. Observaram que, com a superexpressão do miR-143, as células cancerosas apresentaram uma menor proliferação celular, maior taxa de apoptose e principalmente grande redução na taxa de migração e invasão celular, reduzindo a malignidade (ZHAO, LIU e LU, 2017; ZHOU 2018).

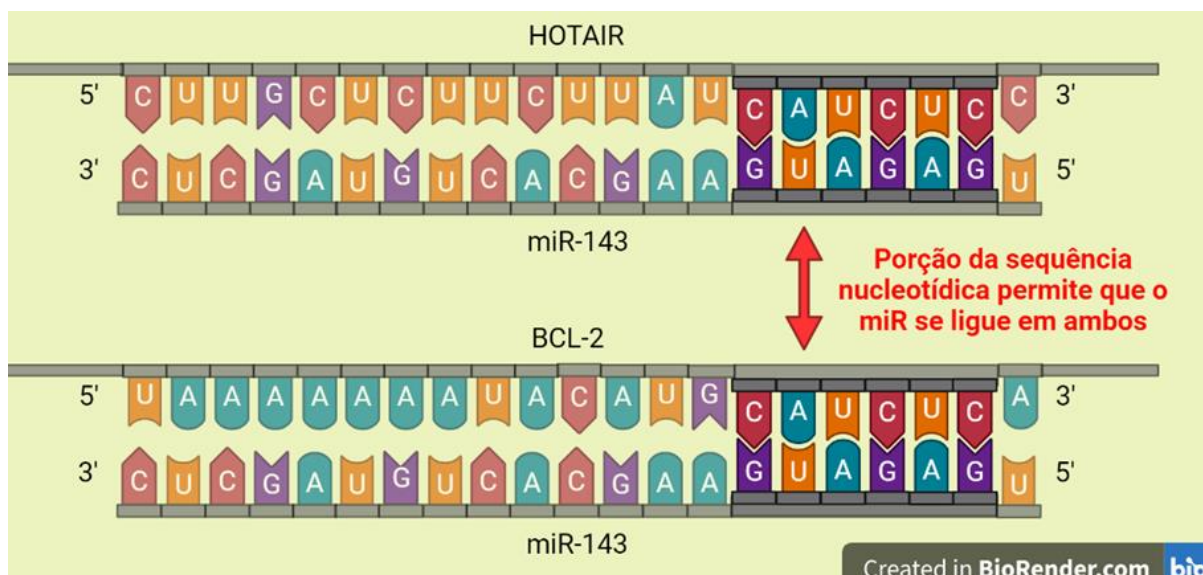
Contudo, seus focos quanto ao alvo direto do miR-143 foram diferentes. No estudo conduzido por Zhao e colaboradores (2017), constataram que o miR-143 têm como alvo direto o Fator 1 α de hipóxia induzido (HIF-1 α), proteína significativamente importante em tumores, pois é ativada quando há hipóxia, algo que é bem observado no microambiente tumoral, assim ativando o HIF-1 α , promovendo proliferação celular, angiogênese e metástase, devida a sua relação com o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF). Esta proteína é vista em diversos cânceres (devido ao metabolismo destas células ser bastante acelerado), não apenas no cervical, assim como o miR-143, que tem sua expressão amplamente reduzida (SONI, PADWAD, 2017; ZHANG, CHEN, ZHANG, 2019; HEMMAT, 2020).

Enquanto no estudo proposto por Zhou (2018), foi analisado a expressão de GOLM1 (proteína da membrana de Golgi 1) além do miR-143 nas células cancerosas, certificando que nestas células GOLM1 estava superexpressa e miR-143 pouco expresso. Após a transfecção de miR-143, observou-se uma queda drástica nos níveis de GOLM1 nas células cancerosas, mostrando que este é um alvo direto do miR-143. Esta proteína é responsável pela biossíntese no retículo endoplasmático rugoso (RER) e no transporte de proteínas pelo complexo de Golgi, tornando-se um alvo

interessante tendo em vista que o HPV invade o núcleo dessa forma e adicionalmente foi observado que a superexpressão desta promove alterações no citoesqueleto, levando a alterações na adesão celular e é capaz de fosforilar uma região específica da p53 (S315) inativando-a (SONG et al, 2021).

Por meio do software TargetScan, a fim de prever alvos do miR-143, foi encontrado o gene BCL-2. Para comprovar esta relação, um experimento foi feito por Liu e colaboradores (2018), utilizando de métodos similares aos estudos citados acima, com células tumorais de pacientes. Identificou-se que o miR-143 apresentava como alvo direto o BCL-2, o que poderia reduzir a proliferação, invasão, migração e elevar as taxas de apoptose. Entretanto, enquanto esse microRNA estava regulado negativamente, o BCL-2 apresentava-se em altos níveis. Foi demonstrado que isso ocorria por conta da interação com o RNA Antisense Transcrito pela HOX (HOTAIR), um RNA longo não-codificante (lncRNA) que atua como uma “esponja molecular”, sendo um RNA endógeno competidor (ceRNA) do miR-143, impedindo que o miR-143 interaja com o BCL-2. Isso deve-se pela sequência a qual o miR se liga à BCL-2 ser igual a uma região da HOTAIR, como mostra a Figura 11. Pelo modelo xenográfico de camundongos BALB/c nude, a transfecção de miR-143 somado a um shRNA inibidor do HOTAIR nos tumores e sua retirada após 31 dias, observou-se uma drástica redução do tumor comparado aos grupos controle e grupo com estimulador da expressão de HOTAIR. Desta forma, concluíram que o HOTAIR é potencialmente carcinogênico.

Figura 11: Sítios de ligação idênticos do HOTAIR e BCL-2 para o microRNA-143.



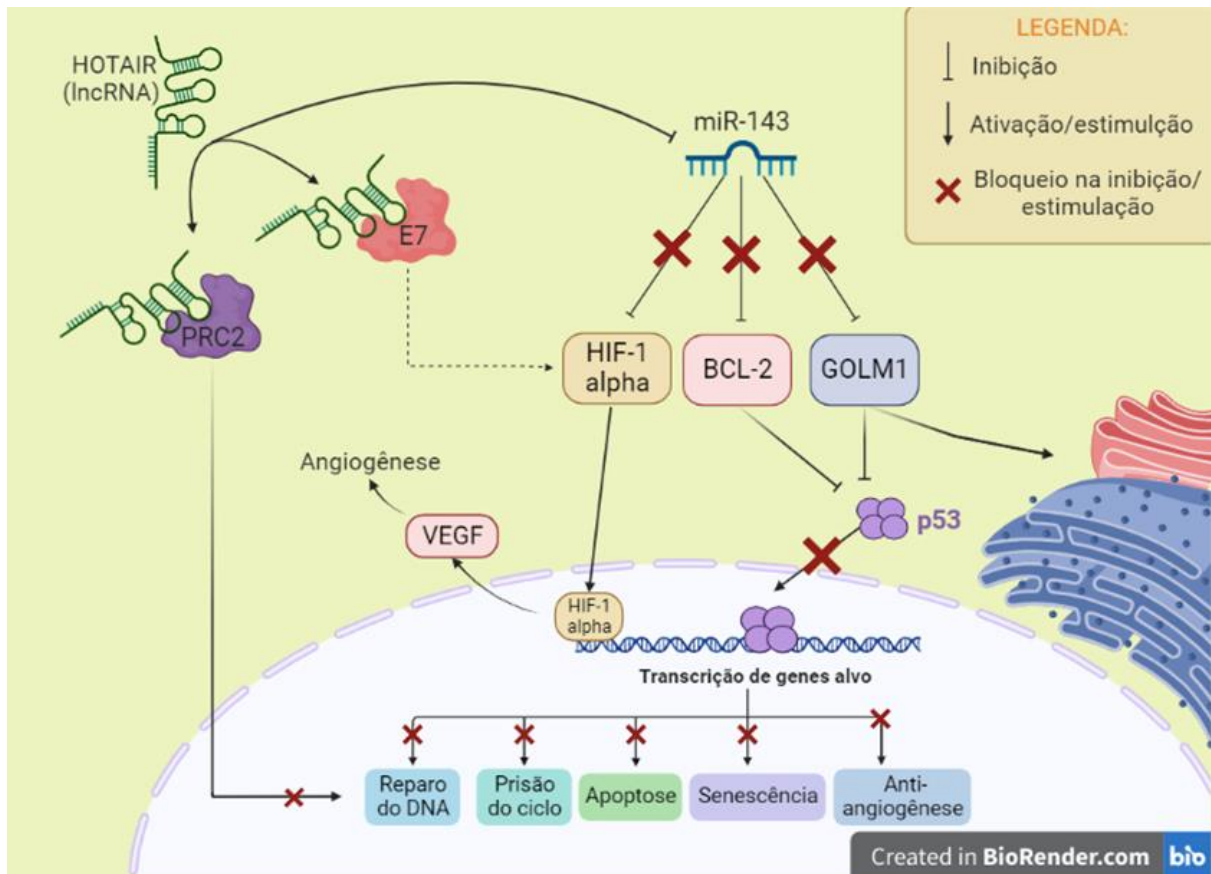
Adaptado de Liu et al., 2018.

Nota: HOTAIR atuando como esponja molecular do miR-143, por apresentar porção da sequência nucleotídica idêntica à de seu alvo, BCL-2.

A respeito do HOTAIR ser potencialmente carcinogênico, Li e companheiros (2018) puderam comprovar fazendo a transfecção de células HeLa em camundongos BALB/c nude que HOTAIR eleva a expressão da proteína HIF-1 α citada anteriormente. Descobriu-se também que HOTAIR aumenta a resistência à radioterapia, visto que sua superexpressão anulou os efeitos causados nos grupos controles tratados com radioterapia, contudo de forma indireta, pois a superexpressão de HOTAIR em BALB/c HIF-1 α knockdown não trouxe resistências. Desta forma, comprovou-se que a relação entre HOTAIR e HIF-1 α leva a resistência à radioterapia e ainda eleva a proliferação, invasão, migração, metástase e redução das taxas apoptóticas, porém a via da qual isso ocorre precisa ser mais estudada.

Este lncRNA é amplamente estudado no HPV dada que a E7 é capaz de elevar os níveis de HOTAIR, servindo de esponja molecular para diversos miRs, não apenas o miR-143; todavia, essa característica não se repetiu entre todos os experimentos realizados (ZHOU et al., 2021). Simultaneamente observou-se que E7 pode ligar-se à uma região do HOTAIR, bloqueando seu sítio de ligação com o Complexo Repressivo Polycomb 2 (PRC2), retratado na figura 12, a qual pode atuar no ciclo celular e em reparos a danos no DNA (SHARMA, MUNGER, 2020). Este grupo de proteínas atua em uma gama de processos biológicos como a diferenciação celular, manutenção da identidade e proliferação celular, além da pluripotência de células tronco (YU et al., 2019).

Figura 12: Representação esquemática das interações envolvendo HOTAIR e PRC2, E7 e miR-143.



Fonte: Os Autores.

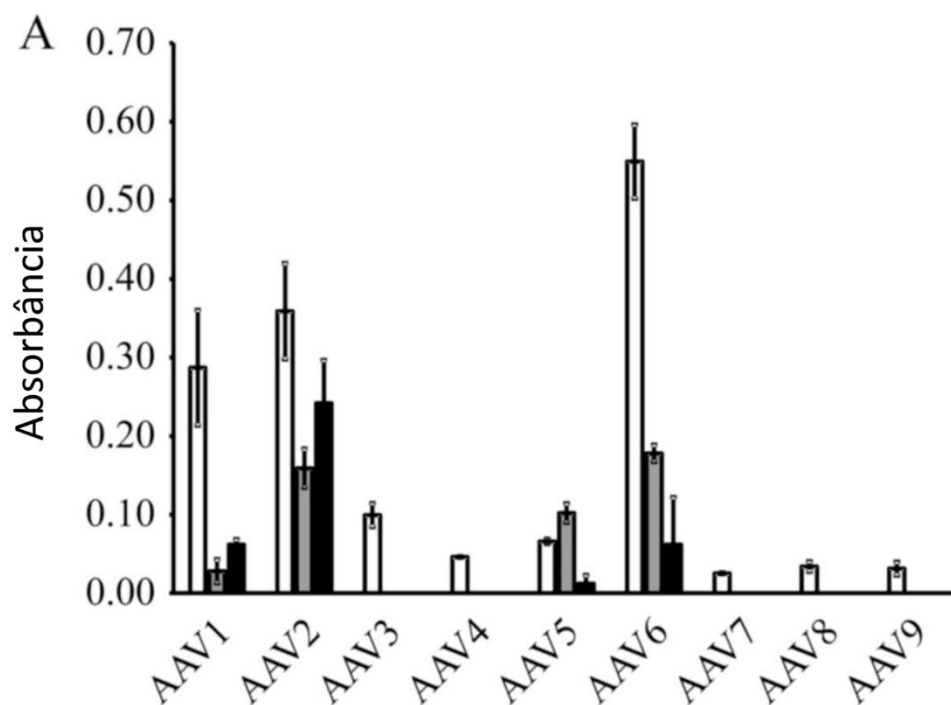
Nota: Representação esquemática da desregulação do miR-143 no processo de carcinogênese. A subexpressão do miR-143 faz com que ele pare de atuar devidamente em seus alvos: HIF-1, BCL-2 e GOLM1, levando, respectivamente, ao aumento da expressão de VEGF com conseqüente angiogênese, inibição da ação de p53 e ao estímulo da produção e transporte de proteínas pelo RER e complexo de Golgi. O HOTAIR age em contribuição para os baixos níveis de miR-143, por apresentar um sítio de ligação correspondente. Além disso, a E7 compete com PRC2 pelo sítio de ligação ao HOTAIR, inibindo a ação no reparo ao DNA e estimulando o crescimento tecidual através da angiogênese promovida por HIF-alpha. O aumento de miR-143 nas células promove o retorno de suas funções, sendo um bom alvo terapêutico.

4.4.1.4 Sobre shRNA

Dois trabalhos tiveram dados promissores com o uso de shRNA contra as proteínas oncogênicas do HPV, obtendo uma quase erradicação tumoral. O primeiro a ser citado obteve sucesso apenas com a utilização desse RNA de interferência, utilizando-se um vetor de adenovírus associado (AAV), conhecidos por serem altamente órgão-específico e inserindo um plasmídeo contendo a sequência do shRNA contra as oncoproteínas E6/E7 do HPV 16 em seu interior e os transfectaram em células (*in vitro*) e camundongos nude SCID (*in vivo*). Após isso, perceberam que

as 3 linhagens de células utilizadas (SiHa, BOKU e SKG-IIIa) apresentavam baixa expressão do RNAm de E6/E7, além do baixo nível dessas proteínas, enquanto, em consequência, houve uma elevação marcante dos níveis de p53, p21 e pRb. Observando-se a taxa de apoptose celular houve um aumento, decorrente do retorno das funções da p53. Já na análise do ciclo celular, devido a ação da pRb, muitas células se encontraram na fase de parada, em G0/G1, sendo que a minoria foi vista na fase S, na qual um novo DNA é sintetizado, o que resultou em uma menor taxa de divisão celular. Os achados em camundongos foram compatíveis e os tumores tiveram seu tamanho extremamente reduzido em relação ao grupo controle, quase eliminando-os completamente (SATO et al., 2018).

Figura 13: Eficiência da transfecção plasmidial em células de câncer cervical utilizando diferentes sorotipos de AAV.



Fonte: SATO et al., 2018.

Nota: nível de eficiência na transfecção de diferentes AAVs nas células BOKU, SiHa e SKG-IIIa, demonstrados nas cores branca, cinza e preto, respectivamente, mostrando o nível de expressão de β -galactosidase após 48h. Nesse estudo, implementaram a transfecção de shRNA contra E6 e E7 com vetor AAV tipo 2, que levou a uma quase erradicação tumoral.

O segundo estudo, conduzido por WANG e colaboradores (2017), a partir da investigação *in vitro* e *in vivo*, utilizou-se de uma técnica que obtém o aumento da

permeabilidade celular através da aplicação de pulsos elétricos no local alvo, denominada Eletroporação Irreversível (IRE), somada ao uso de um shRNA contra a oncoproteína E6 do HPV18. A IRE é um método utilizado no combate ao câncer por causar uma permeabilização das células alvo centrais de maneira permanente o que as leva à morte. Em relação às células que se encontram na periferia do local de aplicação, estas sofrem uma Eletroporação Reversível (RE), visto que dada a distância do local alvo, o campo elétrico diminui. É justamente nessa etapa que o shRNA faz o seu papel, atuando sobre as células tumorais residuais, visto que essa permeabilização da membrana plasmática leva a entrada forçada de plasmídeos carregando os genes para a transcrição deste RNAi contra a E6, ocasionando a volta da ação da p53 e a consequente apoptose das células. No estudo *in vitro*, as células HeLa tratadas com ambas as técnicas mostraram uma diminuição na expressão de E6 em relação aos outros grupos tratados com apenas um dos métodos e, após algumas horas, poucas sobreviveram. Os dados obtidos *in vivo* foram compatíveis: as quantidades de E6 encontraram-se significativamente menores e as de p53, por consequência, maiores; além disso em camundongos tratados com IRE + shRNA E6 eliminou-se o tumor residual.

Ainda usando as oncoproteínas como alvo, foi encontrada uma pesquisa que utilizou a junção de duas técnicas para tratar o câncer cervical induzido pelo HPV 16, sendo elas: shRNA e CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, ou conjunto de repetições palindrômicas curtas regularmente espaçadas). Nele foi comparado o uso de forma individual e conjunta, demonstrando que a terapia contra a E7 apenas com shRNA teve efeitos muito semelhantes aos de células tratadas com CRISPR e shRNA, concluindo que embora ambos tenham a possibilidade de levar a efeitos *off-target*, ou seja, atingir alvos não desejados, o uso isolado de shRNA além de mais eficiente é mais seguro, por levar apenas ao silenciamento do gene, ao contrário do CRISPR, onde a modificação é feita no DNA sendo, portanto, permanente. A estratégia foi capaz de reduzir os níveis de E7 e, em contrapartida, elevar os de pRb, diminuindo a viabilidade celular e o volume tumoral em camundongos (ZHU et al., 2022).

Como citado anteriormente, o HIF-1 α é muito importante no microambiente tumoral para sua proliferação e desenvolvimento, a partir disto, LEUNG e

colaboradores (2017) conduziram um estudo experimental xenográfico em camundongos com células FaDu (câncer de cabeça e pescoço) e ME180 (câncer cervical) utilizando shRNA para gerar o knockdown (KD) de HIF-1 α e analisar a eficácia da radioterapia de fração única de alta dose. Averiguou-se que o KD de HIF-1 α reduziu a produção de lactato (forçando a geração de energia através de glicólise) mantendo a hipóxia por mais tempo, reduziu a revascularização e houve maior morte celular no tumor comparado ao grupo controle (camundongos não KD HIF-1 α). Embora *in vivo* seja complexo criar um ambiente de hipóxia agudo no tumor, estes resultados são promissores pelo fato da HIF-1 α ser importante na proliferação tumoral e sua vascularização, não apenas, a hipóxia mantida por mais tempo pode levar à morte celular por hipóxia, aprimorando a morte celular tumoral.

Kim e colegas (2018) estudaram a relação da HIF-1 α e a radioresistência em células tumorais, constatando que a exposição à radiação induz à hipóxia direta e indiretamente, uma vez que a radiação ionizante causa danos diretos ao DNA estimulando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e o dano em células endoteliais vasculares, provocando uma queda nos níveis de oxigênio, ativando a HIF-1 α e toda sua via de sinalização e genes, incluindo o VEGF levando a uma revascularização.

Além disso, foi demonstrado por ZHANG e colegas (2018) que a Fator Nuclear 90 (NF90) é ativado em situações de hipóxia, comum em tecidos tumorais, modulando a expressão de HIF- α , que regula a expressão de vários fatores pró-angiogênicos como o VEGF. Por conta de seus estudos, comprovaram ainda que o NF90 seria um bom alvo para o shRNA, visto que em modelos xenográficos de camundongo BALB/c nude, o knockdown desse fator foi capaz de impedir a angiogênese e, conseqüentemente, o crescimento tumoral em linhagens de células de câncer cervical (HeLa - HPV18 e SiHa - HPV 16), por baixar as quantidades de HIF- α e VEGF. Também se encontrou ligação entre o NF90 e a via PIK3/Akt, sendo possível que a expressão e secreção de VEGF esteja relacionada adicionalmente a essa via. De forma a complementar as funções do NF90, foi encontrado um outro estudo recente conduzido por Nourreddine e colaboradores (2020) em células HeLa, onde descobriu-se que esse fator regula positivamente o RNAm de proteínas importantes para o ciclo

celular, interferindo em sua progressão, de forma que sua ausência gera defeitos mitóticos e leva até mesmo a falha da citocinese celular.

Alternativamente, Liu et al. (2020b) realizou um estudo experimental em modelos xenográfico de camundongos nude, assim como em células CaSki e HeLa, a fim de observar os efeitos do knockdown da Chaperona de Histona 1B anti-silenciamento (ASF1B), tendo como resultado a inibição da proliferação celular dos tumores, da migração e a redução drástica do tumor. Ao averiguar os mecanismos envolvidos nisto, encontraram sua relação com o ciclo celular; desta forma através da citometria de fluxo das células tratadas com shASF1B e das células tumorais controle, constataram a parada do ciclo celular em G2, o que levou a inibição do crescimento tumoral. Contudo, observaram também que os níveis apoptóticos estavam elevados. A fim de investigar o real motivo, analisaram a proteína BCL-2, encontrando bandas mais fracas no Western Blot nas células shASF1B, sugerindo uma mão dupla no knockdown de ASF1B: a parada do ciclo celular e a redução da expressão de BCL-2, tornando-a uma terapia promissora.

4.4.1.5 Formas de entrega

A eficiência no tratamento empregando-se microRNA e shRNA depende de um sistema de entrega que os protejam contra a degradação por enzimas e que funcione de forma órgão-específica, sem gerar riscos com toxicidade e imunogenicidade no organismo do paciente. Para isso, alguns modelos de entrega vêm sendo estudados, como o uso de lipossomos, micelas ou outras nanopartículas e sistemas de entrega com vetor viral. É sabido também que não há um método ideal de entrega, afinal todas possuem vantagens e desvantagens. Desta forma, é preciso de estudos a fim de ponderar qual método é mais vantajoso em determinado sítio-alvo ou patologia assim como o risco-benefício para o paciente (ÁYEN, JIMENEZ, BOULAIZ, 2020).

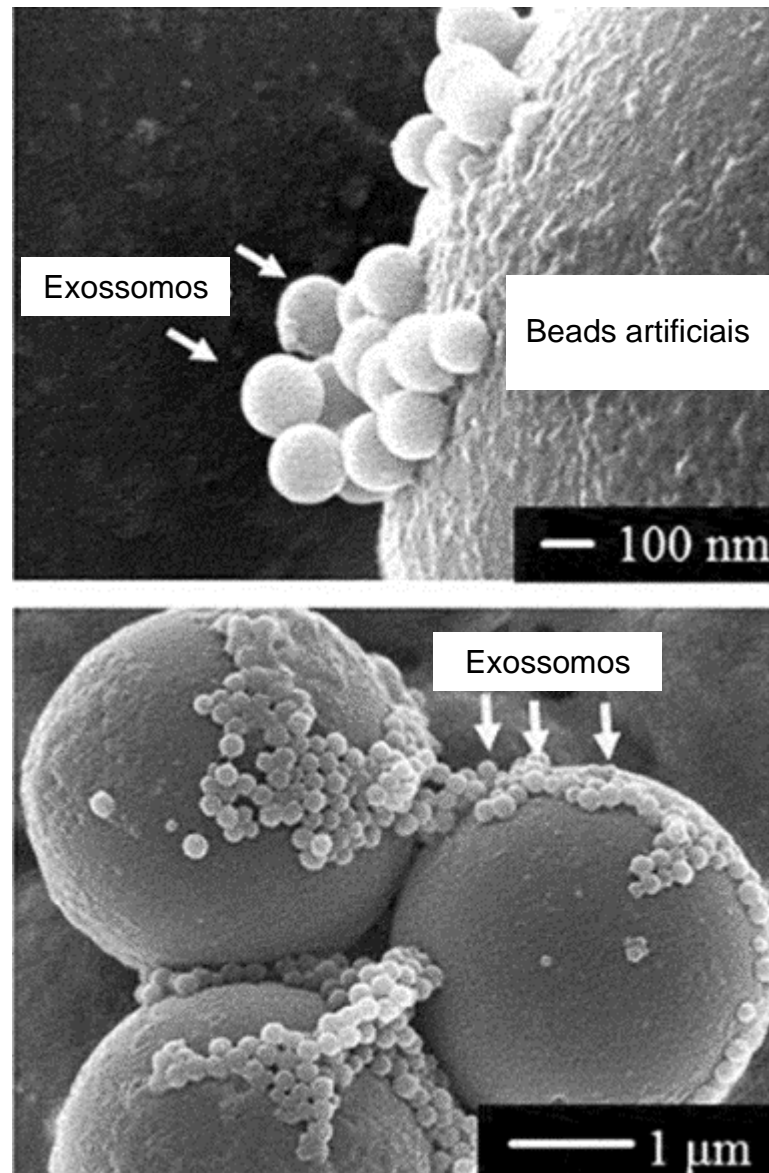
Um método de entrega que vem sendo bastante estudado se dá pelo uso de VLPs (Virus-like Particles), em português, “partículas semelhantes ao vírus”. Essa estrutura é feita com proteínas virais de forma a obter a mesma conformação do vírus original, mas sem apresentar o genoma viral. Em um estudo feito por Akwiditya e coautores (2021), foi utilizado um antígeno central do HBV (vírus da Hepatite B), o HBcAg, para transportar o plasmídeo do shRNA tendo como alvo o BCL-2. Além disso,

para aumentar a especificidade, foi conjugada a essa partícula o ácido fólico (FA), visto que em vários tipos de câncer, incluindo o CC, há uma elevação da expressão de receptores de folato (FR), importante para que ocorra a divisão celular. Nas análises, foi visto que a transfecção foi efetiva, obtendo uma redução significativa de BCL-2 e, conseqüentemente, na viabilidade celular, concluindo que o HBcAg VLP tem a capacidade de ser um ótimo sistema de entrega para o shRNA.

Outro trabalho conduzido por Zhu e colegas (2018) demonstrou que o uso de nanopartículas poli β -amino éster (PBAE) teve uma baixa toxicidade, sem causar danos hepáticos ou respostas inflamatórias, apresentando um nível de transfecção de 35,5% em células SiHa e 31,1% em HeLa, o que se mostrou ser suficiente, nesse estudo, para induzir a apoptose e proliferação tumoral em modelos *in vivo*.

Os métodos de entrega de microRNAs são bastante similares aos do shRNA. A utilização de lipossomos é bastante popular como sistema de entrega tendo uma amplitude de estudos utilizando-o; os trabalhos de Liang et al. (2017) e de He e Yang (2017) por meio da lipofecção conseguiram entregar microRNAs e obter ótimos resultados *in vitro*, mostrando atividades significativas relevantes para cada estudo. Nesta linha de raciocínio, Konishi e colaboradores (2020) utilizou exossomas e, por meio de um sistema de rastreamento de nanopartículas, pôde representar os exossomas (Figura 14 nas células nos seus ensaios clonogênicos 2D e 3D de células.

Figura 14: Representação de exossomos em células por eletromicrografia de transmissão.

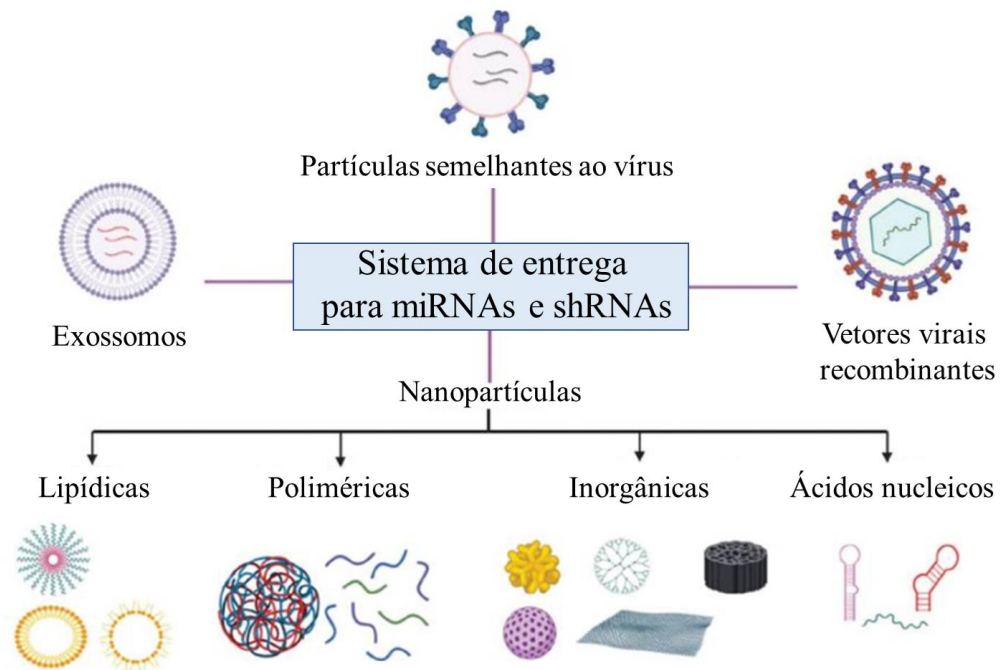


Adaptado de: KONISHI et al., 2020.

Nota: imagem representativa de exossomos através da eletromicrografia de transmissão.

Das estratégias mais empregadas na entrega de microRNAs, há a entrega local, embora esta tenha a limitação do sítio onde o tumor se encontra, é utilizada em câncer de mama, melanomas e o câncer cervical, sendo vantajosa pela sua especificidade; entregas sistêmicas, a qual é mais desafiadora devido a mecanismos naturais que podem degradá-las ou serem rapidamente eliminadas pelo clearance hepático ou renal. Nesta categoria encontramos vetores virais e não virais, sendo os vetores lipídicos majoritariamente usados pela sua baixa imunogenicidade, flexibilidade e versatilidade quanto a via de administração além de sua biocompatibilidade (FORTERRE et al., 2020).

Figura 15: Sistema de entrega para microRNAs e shRNAs.



Adaptado de: ARGHIANI e SHAH, 2022.

Nota: a figura mostra todas as formas de entrega usadas para o delivery de microRNAs e shRNAs, sendo as principais nanopartículas, vetores virais, partículas semelhantes a vírus e exossomos.

5 CONCLUSÃO

O principal fator que leva ao desenvolvimento da neoplasia de colo de útero é a presença principalmente das oncoproteínas virais E5, E6 e E7 dos HRHPV, que diminuem a resposta imune, levam a ubiquitinação exagerada de p53 e degradam a pRb, respectivamente. A infecção pelo HPV, necessária para que o processo de tumorigênese aconteça, ainda não pode ser tratada, portanto, pacientes que apresentam a condição, terão o vírus hospedado em suas células teoricamente até o fim de suas vidas, podendo contagiar outras pessoas e até mesmo apresentar o reaparecimento de lesões. Adicionalmente, mesmo com a evolução da ciência, as terapias utilizadas continuam sendo consideravelmente agressivas, podendo impedir que uma mulher venha a ter filhos no futuro ou ainda retirando a qualidade de vida da paciente, como quando é usado a quimio/radioterapia.

A abordagem biotecnológica para esses casos, poderia estar presente como uma alternativa, com a utilização de RNAs de interferência, como os miRNAs e shRNAs. O miR-143 e shRNA mostraram ser promissores no tratamento de câncer do colo do útero, levando a uma quase erradicação tumoral ou redução drástica de volume em determinados estudos revisados, sendo também menos invasivos. O sinergismo entre esse miR e o shRNA contra E6/E7 poderia ser considerado para uma possível aplicação em estudos futuros, na tentativa de trazer a cura para pacientes com a doença, teoricamente restituindo a homeostasia celular e anulando os efeitos oncogênicos do vírus. Ademais, seria interessante realizar um tratamento em NIC-2 e 3 com a terapia de RNAi, sendo de grande interesse em saúde pública, visto que reduziria significativamente a incidência do CC em si, por tratar as lesões precursoras antes mesmo que o processo evolua ao câncer.

Além disso, essa revisão encontrou diferentes alvos estudados do miR-143 e trouxe uma compreensão mais aprofundada e correlacionada acerca do seu papel nas células. Por se tratar de um assunto ainda muito recente, existem trabalhos insuficientes que analisaram um determinado microRNA como um todo, sintetizando os resultados obtidos em outros estudos, já que a maior parte é composta apenas pelos dados experimentais que tem como foco, portanto, um determinado alvo em específico. Diversos microRNAs se mostraram desregulados durante o câncer cervical, inclusive outros miR supressores tumorais, desta maneira, seria interessante

uma análise mais ampla sobre os efeitos de outros miR em si, ao contrário de uma análise direta entre miR versus alvo.

REFERÊNCIAS

ACHARYA, Rituparna. The recent progresses in shRNA-nanoparticle conjugate as a therapeutic approach. **Materials Science and Engineering: C**, v. 104, p. 109928, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493118338402>>. Acesso em: 10 set. 2022.

AKSOY, Pinar; et al. HPV entry into cells. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 772, p. 13-22, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1383574216301077?via%3Dihub>>. Acesso em: 25 mar. 2022.

AKWIDITYA, Made Angga et al. Hepatitis B Virus-Like Particle: Targeted Delivery of Plasmid Expressing Short Hairpin RNA for Silencing the Bcl-2 Gene in Cervical Cancer Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 5, p. 2320, 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/22/5/2320/htm>>. Acesso em: 15 ago. 2022.

ALBERTS, B. et al. **Do DNA ao RNA**. In: *BIOLOGIA Molecular da célula*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. cap. Como as células leem o genoma: do DNA à proteína, p. 301-331.

ALMEIDA, Ana M. et al. Cervical cancer and HPV infection: ongoing therapeutic research to counteract the action of E6 and E7 oncoproteins. **Drug discovery today**, v. 24, n. 10, p. 2044-2057, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1359644619303101>>. Acesso em: 18 jan. 2022.

ARALDI, Rodrigo Pinheiro et al. The human papillomavirus (HPV)-related cancer biology: An overview. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 106, p. 1537-1556, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30119229/>>. Acesso em: 18 mar. 2022.

ARGHIANI, Nahid; SHAH, Khalid. Modulating microRNAs in cancer: Next-generation therapies. **Cancer Biology & Medicine**, v. 19, n. 3, p. 289, 2022. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8958885/#r5>>. Acesso em: 15 maio 2022.

AUBREY, Brandon J. et al. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression?. **Cell Death & Differentiation**, v. 25, n. 1, p. 104-113, 2018.

ÁYEN, Ángela; JIMENEZ MARTINEZ, Yaiza; BOULAIZ, Houria. Targeted gene delivery therapies for cervical cancer. **Cancers**, v. 12, n. 5, p. 1301, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2072-6694/12/5/1301/pdf?version=1590056168>>. Acesso em: 14 ago. 2022.

BEN, Wei et al. MiR-27a-3p regulated the aggressive phenotypes of cervical cancer by targeting FBXW7. **Cancer Management and Research**, v. 12, p. 2925, 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7198449/>>. Acesso em: 18 jul. 2022.

BRIANTI, Pina; DE FLAMMINEIS, Eduardo; MERCURI, Santo Raffaele. Review of HPV-related diseases and cancers. **New Microbiol**, v. 40, n. 2, p. 80-85, 2017. Disponível em: <http://www.newmicrobiologica.org/PUB/allegati_pdf/2017/2/80.pdf>. Acesso em: 11 out. 2021.

CARVALHO, Newton Sergio de et al. Brazilian Protocol for Sexually Transmitted Infections 2020: human papillomavirus (HPV) infection. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 54, 2021. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/6ShKNHbLWQb5wrbxJXvVRNC/>>. Acesso em: 05 out. 2021.

CARVALHO, Priscila Guedes de et al. Trajetórias assistenciais de mulheres entre diagnóstico e início de tratamento do câncer de colo uterino. **Saúde em Debate**, v. 42, p. 687-701, 2018. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/sdeb/a/X8ZMKpZzjnmsyvT6QvzdthK/?format=pdf&lang=pt>>. Acesso em: 15 set. 2022.

DA SILVA, Martha Laysla Ramos et al. The role of HPV-induced epigenetic changes in cervical carcinogenesis. **Biomedical reports**, v. 15, n. 1, p. 1-20, 2021. Disponível

em: <<https://www.spandidos-publications.com/10.3892/br.2021.1436>>. Acesso em: 21 jul. 2022.

DE SÁ, Kássia Camila Camargo; SILVA, Luciano Ribeiro. O exame papanicolaou na prevenção do câncer no colo uterino: uma revisão integrativa. **Revista Eletrônica da Faculdade de Ceres**, v. 8, n. 1, p. 8-8, 2019. Disponível em: <<http://revistas2.unievangelica.edu.br/index.php/refacer/article/view/4482/3145>>. Acesso em: 15 set. 2022.

DE SANJOSE, Silvia; BROTONS, Maria; PAVON, Miguel Angel. The natural history of human papillomavirus infection. **Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology**, v. 47, p. 2-13, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1521693417301335>>. Acesso em: 25 mar. 2022.

ENGELAND, Kurt. Cell cycle arrest through indirect transcriptional repression by p53: I have a DREAM. **Cell Death & Differentiation**, v. 25, n. 1, p. 114-132, 2018.

FORTERRE, Alexis et al. A comprehensive review of cancer MicroRNA therapeutic delivery strategies. **Cancers**, v. 12, n. 7, p. 1852, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2072-6694/12/7/1852/htm>>. Acesso em: 18 set. 2022.

GRAHAM, Sheila V. The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. **Clinical science**, v. 131, n. 17, p. 2201-2221, 2017. Disponível em: <<https://portlandpress.com/clinsci/article/131/17/2201/71573/The-human-papillomavirus-replication-cycle-and-its>>. Acesso em: 25 mar. 2022.

GUIMARÃES, Rafaella Feitosa. **Câncer de Colo do Útero: abordagem teórica sobre avanços da doença, prevenção e controle**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Pós-Graduação em Citologia Clínica) - Instituto de ensino superior e pesquisa, Recife, 2019.

HAREŹA, Daria A.; WILCZYŃSKI, Jacek R.; PARADOWSKA, Edyta. Human Papillomaviruses as Infectious Agents in Gynecological Cancers—Oncogenic Properties of Viral Proteins. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1818, 2022.

HE, C. Y.; YANG, J. miR-187 induces apoptosis of SiHa cervical carcinoma cells by downregulating Bcl-2. **Genet Mol Res**, v. 16, n. 1, 2017. Disponível em: <<http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2017/vol16-1/pdf/gmr-16-01-gmr.16018969.pdf>>. Acesso em: 31 ago 2022.

HEMMAT, Nima et al. Role of microRNAs in epidermal growth factor receptor signaling pathway in cervical cancer. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 6, p. 4553-4568, 2020. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11033-020-05494-4>>. Acesso em: 01 ago. 2022.

HOLMES, Allyson et al. Mechanistic signatures of HPV insertions in cervical carcinomas. **NPJ genomic medicine**, v. 1, n. 1, p. 1-16, 2016.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (France). **Cytopathology of the uterine cervix**. France: OMS, 2022. Digital atlas.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2020: incidência do Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/estimativa/taxas-ajustadas/neoplasia-maligna-da-mama-feminina-e-colo-do-utero>. Acesso em: 16 dez 2022

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Deteção precoce do câncer**. Rio de Janeiro: INCA, 2021. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document/deteccao-precoce-do-cancer_0.pdf>. Acesso em: 15 set 2022.

JUAN, C. et al. miRNA-489 as a biomarker in diagnosis and treatment of cervical cancer. **Bratislavske Lekarske Listy**, v. 119, n. 5, p. 278-283, 2018. Acesso em: 19 jan. 2022

KARIM, Md Emranul et al. Therapeutic potency of nanoformulations of siRNAs and shRNAs in animal models of cancers. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 65, 2018. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1999-4923/10/2/65/htm>>. Acesso em: 14 set. 2022.

KASHYAP, D.; GARG, V.; GOEL, N. **Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis**. Separata de: Rossen Donev. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. v. 125. United Kingdom: AP Editor, 2021. pg

73-120. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2021.01.003>>. Acesso em: 9 mar. 2022.

KATZENELLENBOGEN, Rachel. Telomerase induction in HPV infection and oncogenesis. **Viruses**, v. 9, n. 7, p. 180, 2017. 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1999-4915/9/7/180/htm>>. Acesso em: 18 mar.

KIM, Wonwoo et al. Role of HIF-1 α in response of tumors to a combination of hyperthermia and radiation in vivo. **International Journal of Hyperthermia**, v. 34, n. 3, p. 276-283, 2018. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02656736.2017.1335440>>. Acesso em: 15 ago. 2022.

KONISHI, Hiromi et al. The therapeutic potential of exosomal miR-22 for cervical cancer radiotherapy. **Cancer biology & therapy**, v. 21, n. 12, p. 1128-1135, 2020. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15384047.2020.1838031>>. Acesso em: 18 set. 2022.

KONISHI, Hiromi et al. The therapeutic potential of exosomal miR-22 for cervical cancer radiotherapy. **Cancer biology & therapy**, v. 21, n. 12, p. 1128-1135, 2020. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15384047.2020.1838031>>. Acesso em: 31 ago. 2022.

KRAUSE, Katherine A.; NEELON, Daniel; BUTLER, Samantha L. Koilocytosis. In: StatPearls [Internet]. **StatPearls Publishing**, 2021. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532958/>>. Acesso em: 11 maio 2022.

LEUNG, Eric et al. Metabolic targeting of HIF-dependent glycolysis reduces lactate, increases oxygen consumption and enhances response to high-dose single-fraction radiotherapy in hypoxic solid tumors. **BMC cancer**, v. 17, n. 1, p. 1-12, 2017. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1186/s12885-017-3402-6>>. Acesso em: 15 ago. 2022.

LI, Ning et al. Overexpression of HOTAIR leads to radioresistance of human cervical cancer via promoting HIF-1 α expression. **Radiation Oncology**, v. 13, n. 1, p. 1-9, 2018. Disponível em: <<https://ro-journal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13014-018-1153-4>>. Acesso em: 03 ago. 2022.

LIANG, Hua et al. miR-187 inhibits the growth of cervical cancer cells by targeting FGF9. **Oncology reports**, v. 38, n. 4, p. 1977-1984, 2017. Disponível em: <<https://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2017.5916>>. Acesso em: 31 ago. 2022.

LIU, Mingzhu et al. Long non-coding RNA HOTAIR promotes cervical cancer progression through regulating BCL2 via targeting miR-143-3p. **Cancer Biology & Therapy**, v. 19, n. 5, p. 391-399, 2018. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15384047.2018.1423921>>. Acesso em: 01 ago. 2022.

LIU, Shang et al. MiRNA-211 triggers an autophagy-dependent apoptosis in cervical cancer cells: regulation of Bcl-2. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 393, n. 3, p. 359-370, 2020a. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00210-019-01720-4>>. Acesso em: 17 jan. 2022.

LIU, Xinjian et al. ASF1B promotes cervical cancer progression through stabilization of CDK9. **Cell death & disease**, v. 11, n. 8, p. 1-15, 2020b. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41419-020-02872-5>>. Acesso em: 14 ago. 2022.

LIU, Yu et al. Current strategies against persistent human papillomavirus infection. **International Journal of Oncology**, v. 55, n. 3, p. 570-584, 2019. Disponível em: <<https://www.spandidos-publications.com/ijo/55/3/570>>. Acesso em: 25 fev. 2022.

MCGEARY, Sean E. et al. The biochemical basis of microRNA targeting efficacy. **Science**, v. 366, n. 6472, p. eaav1741, 2019. Disponível em: <<https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.aav1741>>. Acesso em: 20 jun. 2022.

NAHAND, Javid Sadri et al. microRNAs: new prognostic, diagnostic, and therapeutic biomarkers in cervical cancer. **Journal of cellular physiology**, v. 234, n. 10, p. 17064-17099, 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcp.28457>>. Acesso em: 06 jul. 2022.

NAOREM, Leimarembi Devi; MUTHAIYAN, Mathavan; VENKATESAN, Amouda. Identification of dysregulated miRNAs in triple negative breast cancer: a meta-analysis

approach. **Journal of cellular physiology**, v. 234, n. 7, p. 11768-11779, 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcp.27839>>. Acesso em: 17 maio 2022.

NOURREDDINE, Sami et al. Nf45 and nf90 regulate mitotic gene expression by competing with staufen-mediated mrna decay. **Cell Reports**, v. 31, n. 7, p. 107660, 2020.

OLIVEIRA, Geilson Gomes de. **Achados cito-histológicos e genótipos de HPV observados nas células escamosas atípicas de significado indeterminado**. 2017. 74 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 2017. Disponível em: <https://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/28229/1/2017_dis_ggoliveira.pdf>. Acesso em: 11 maio 2022.

PAL, Asmita; KUNDU, Rita. Human papillomavirus E6 and E7: the cervical cancer hallmarks and targets for therapy. **Frontiers in microbiology**, p. 3116, 2020. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.03116/full#ref44>>. Acesso em: 15 fev. 2022.

RIFAI, Nader; HORVATH, Andrea Rita; WITTEWER, Carl T. (ed.). **Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics**. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2018. color. ISBN: 9780323359214. Disponível em: <<https://www.elsevier.com/books/tietz-textbook-of-clinical-chemistry-and-molecular-diagnostics/rifai/978-0-323-35921-4>>. Acesso em: 31 mar. 2022.

RIZZOTTO, Dario; ENGLMAIER, Lukas; VILLUNGER, Andreas. At a crossroads to cancer: How p53-induced cell fate decisions secure genome integrity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 19, p. 10883, 2021.

RODWELL, Victor W., et al. **Bioquímica ilustrada de Harper**. 30 ed. Porto Alegre: AMGH, 2017.

SANTACROCE, Luigi et al. Focus on HPV infection and the molecular mechanisms of oral carcinogenesis. **Viruses**, v. 13, n. 4, p. 559, 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1999-4915/13/4/559>>. Acesso em: 12 fev. 2022.

SATO, Naoto et al. Eradication of cervical cancer in vivo by an AAV vector that encodes shRNA targeting human papillomavirus type 16 E6/E7. **International Journal of Oncology**, v. 52, n. 3, p. 687-696, 2018. Disponível em: <<https://www.spandidos-publications.com/ijo/52/3/687>>. Acesso em: 22 fev. 2022.

SEN, Prakriti; GANGULY, Pooja; GANGULY, Niladri. Modulation of DNA methylation by human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins in cervical cancer. **Oncology Letters**, v. 15, n. 1, p. 11-22, 2018. Disponível em: <[https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(17\)30889-9?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867417308899%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(17)30889-9?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867417308899%3Fshowall%3Dtrue)>. Acesso em: 18 mar. 2022.

SERRANO, Beatriz et al. Epidemiology and burden of HPV-related disease. **Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology**, v. 47, p. 14-26, 2018.

SHARMA, Ankur et al. Nanoparticulate RNA delivery systems in cancer. **Cancer Reports**, v. 3, n. 5, p. e1271, 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/cnr2.1271>>. Acesso: 05 jul. 2022.

SHARMA, Surendra; MUNGER, Karl. The role of long noncoding RNAs in human papillomavirus-associated pathogenesis. **Pathogens**, v. 9, n. 4, p. 289, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-0817/9/4/289/htm#sec4dot3-pathogens-09-00289>>. Acesso em: 03 ago 2022.

SHEN, Shuna et al. Potential role of microRNAs in the treatment and diagnosis of cervical cancer. **Cancer genetics**, v. 248, p. 25-30, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2210776220302726>>. Acesso em 17 maio 2022.

SIMÕES, Ludmila Pini; JUNIOR, Gerson Zanusso. Vírus HPV e o desenvolvimento de câncer de colo de útero—uma revisão bibliográfica. **Revista uningá**, v. 56, n. 1, p. 98-107, 2019. Disponível em: <<http://revista.uninga.br/index.php/uninga/article/view/2243/1887>>. Acesso em: 05 out. 2021.

SONG, Qi et al. The functional landscape of Golgi membrane protein 1 (GOLM1) phosphoproteome reveal GOLM1 regulating P53 that promotes malignancy. **Cell**

death discovery, v. 7, n. 1, p. 1-15, 2021. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41420-021-00422-2>>. Acesso em 06 jul. 2022.

SONI, Sourabh; PADWAD, Yogendra S. HIF-1 in cancer therapy: two decade long story of a transcription factor. **Acta oncologica**, v. 56, n. 4, p. 503-515, 2017. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/0284186X.2017.1301680>>. Acesso em: 06 jul. 2022.

SUN, Bingmei et al. The proliferation of cervical cancer is promoted by miRNA-125b through the regulation of the HMGA1. **Oncotargets and Therapy**, v. 12, p. 2767, 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6469475/>>. Acesso em: 05 jul. 2022.

TAN, Weige et al. MicroRNAs and cancer: Key paradigms in molecular therapy. **Oncology Letters**, v. 15, n. 3, p. 2735-2742, 2018. Disponível em: <<https://www.spandidos-publications.com/ol/15/3/2735>>. Acesso em: 16 maio 2022.

VONSKY, M. et al. Carcinogenesis associated with human papillomavirus infection. Mechanisms and potential for immunotherapy. **Biochemistry (Moscow)**, v. 84, n. 7, p. 782-799, 2019. Disponível em: <<https://link.springer.com/content/pdf/10.1134/S0006297919070095.pdf>>. Acesso em: 12 fev. 2022.

WANG, Anjin et al. MicroRNA-29a inhibits cell proliferation and arrests cell cycle by modulating p16 methylation in cervical cancer. **Oncology letters**, v. 21, n. 4, p. 1-9, 2021a. Acesso em: 26 jan. 2022.

WANG, Li; LIANG, Ting-Ting. CD59 receptor targeted delivery of miRNA-1284 and cisplatin-loaded liposomes for effective therapeutic efficacy against cervical cancer cells. **AMB Express**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2020.

WANG, Zhi-Liang et al. Irreversible electroporation-mediated shRNA knockdown of the HPV18 E6 gene suppresses cervical cancer growth in vitro and in vivo. **Oncology Letters**, v. 14, n. 2, p. 1943-1949, 2017.

WANG, Zhixiang. Regulation of Cell Cycle Progression by Growth Factor-Induced Cell Signaling. **Cells**, v. 10, n. 12, p. 3327, 2021b. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2073-4409/10/12/3327/htm>>. Acesso em: 31 mar. 2022

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Atlas**, 2017. Disponível em: <<https://screening.iarc.fr/pic/00004804.jpg>>. Acesso em: 20 set. 2022.

WONG, Nathan W. et al. OncomiR: an online resource for exploring pan-cancer microRNA dysregulation. **Bioinformatics**, v. 34, n. 4, p. 713-715, 2018. Disponível em: <<https://academic.oup.com/bioinformatics/article/34/4/713/4317215?login=false>>. Acesso em: 17 maio 2022.

YANG, Fengming et al. Exosomal miRNAs and miRNA dysregulation in cancer-associated fibroblasts. **Molecular cancer**, v. 16, n. 1, p. 1-10, 2017. Disponível em: <<https://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12943-017-0718-4>>. Acesso em: 17 maio 2022.

YAO, Rui et al. miRNA-641 inhibits the proliferation, migration, and invasion and induces apoptosis of cervical cancer cells by directly targeting ZEB1. **OncoTargets and therapy**, v. 11, p. 8965, 2018. Disponível em: <miRNA-641 inhibits the proliferation, migration, and invasion and induces apoptosis of cervical cancer cells by directly targeting ZEB1 (nih.gov)>. Acesso em: 9 jan. 2022.

YU, Jia-Ray et al. PRC2 is high maintenance. **Genes & development**, v. 33, n. 15-16, p. 903-935, 2019. Disponível em: <<http://genesdev.cshlp.org/content/33/15-16/903.short>>. Acesso em: 03 ago. 2022.

ZAMANI, Sara et al. Deregulation of miR-21 and miR-29a in cervical cancer related to HPV infection. **Microna**, v. 8, n. 2, p. 110-115, 2019. Acesso em: 19 jan 2022.

ZHANG, Wenqian et al. Nuclear factor 90 promotes angiogenesis by regulating HIF-1 α /VEGF-A expression through the PI3K/Akt signaling pathway in human cervical cancer. **Cell death & disease**, v. 9, n. 3, p. 1-13, 2018. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41419-018-0334-2>>. Acesso em: 14 ago. 2022.

ZHANG, Yue; CHEN, Chen; ZHANG, Jun. Effects and significance of formononetin on expression levels of HIF-1 α and VEGF in mouse cervical cancer tissue. **Oncology**

Letters, v. 18, n. 3, p. 2248-2253, 2019. Disponível em: <<https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2019.10567>>. Acesso em: 03 ago. 2022.

ZHAO, Y.; LIU, X.; LU, Y. X. MicroRNA-143 regulates the proliferation and apoptosis of cervical cancer cells by targeting HIF-1 α . **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 21, n. 24, p. 5580-5586, 2017. Disponível em: <<https://www.europeanreview.org/wp/wp-content/uploads/5580-5586-MicroRNA-143-regulates-cervical-cancer-cells.pdf>>. Acesso em: 06 jul. 2022.

ZHOU, Meiyong et al. MicroRNA-143 regulates cell migration and invasion by targeting GOLM1 in cervical cancer. **Oncology Letters**, v. 16, n. 5, p. 6393-6400, 2018. Disponível em: <<https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2018.9441?text=fulltext#f1-ol-0-0-9441>>. Acesso em: 06 jul. 2022.

ZHOU, Yu et al. LncRNA HOTAIR promotes proliferation and inhibits apoptosis by sponging miR-214-3p in HPV16 positive cervical cancer cells. **Cancer Cell International**, v. 21, n. 1, p. 1-15, 2021. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1186/s12935-021-02103-7>>. Acesso em: 03 ago 2022.

ZHU, Da et al. Nanoparticles based on poly (β -Amino Ester) and HPV16-Targeting CRISPR/shRNA as potential drugs for HPV16-related cervical malignancy. **Molecular Therapy**, v. 26, n. 10, p. 2443-2455, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6171328/>>. Acesso em: 22 ago. 2022.