



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS-UFAM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE
E BIOTECNOLOGIA - REDE BIONORTE



**DESENVOLVIMENTO DE TERAPIA GENÉTICA MULTI ALVO PARA
TRATAMENTO DO CÂNCER CERVICAL CAUSADO PELO HPV**

ROBERTO ALEXANDRE ALVES BARBOSA FILHO

Manaus-AM

2024



DESENVOLVIMENTO DE TERAPIA GENÉTICA MULTI ALVO PARA TRATAMENTO DO CÂNCER CERVICAL CAUSADO PELO HPV

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia, área de concentração Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Cíntia Mara Costa de Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho

Manaus

Abril/2024

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha Catalográfica

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

B238d Barbosa Filho, Roberto Alexandre Alves
Desenvolvimento de terapia genética multi alvo para tratamento
do câncer cervical causado pelo HPV / Roberto Alexandre Alves
Barbosa Filho . 2024
99 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Cíntia Mara Costa de Oliveira
Coorientador: Spartaco Astolfi Filho
Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede
Bionorte) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Câncer. 2. Papilomavírus humano. 3. Terapia. 4. RNAi. I.
Oliveira, Cíntia Mara Costa de. II. Universidade Federal do
Amazonas III. Título

ROBERTO ALEXANDRE ALVES BARBOSA FILHO

DESENVOLVIMENTO DE TERAPIA GENÉTICA MULTI ALVO PARA TRATAMENTO DO CÂNCER CERVICAL CAUSADO PELO HPV

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia, área de concentração Biotecnologia.

Aprovada em 23/04/2024

Banca examinadora

Documento assinado digitalmente
 **CINTIA MARA COSTA DE OLIVEIRA**
Data: 18/11/2024 12:16:24-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Cintia Mara Costa de Oliveira (Orientadora)

UFAM/UEA
Documento assinado digitalmente
 **MARCELO DE MACEDO BRIGIDO**
Data: 22/11/2024 17:44:24-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido

UnB
Documento assinado digitalmente
 **RAJENDRANATH RAMASAWMY**
Data: 18/11/2024 12:32:44-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Rajendranath Ramasawmy

UNINILTON
Documento assinado digitalmente
 **JULIANA PAVAN ZULIANI TRENCH DE SOUZA**
Data: 22/11/2024 12:38:49-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Juliana Pavan Zuliani

FIOCRUZ-RO
Documento assinado digitalmente
 **EDILAMAR MENEZES DE OLIVEIRA**
Data: 29/11/2024 11:50:46-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profa. Dra. Edilamar Menezes de Oliveira

EEFE-USP



DEDICATÓRIA

À dona Francisca, minha avó

Ao meu pai

Ao meu irmão Ed Rugles

in memoriam

AGRADECIMENTOS

À minha família, por todo apoio e paciência.

Ao professor Dr Spartaco Astolfi Filho, pelos ensinamentos dentro e fora do contexto desta tese.

À professora Dra. Cristina Maria Borborema dos Santos, por ter me acolhido e ensinado tanto.

À minha orientadora, professora Dra. Cíntia Mara Costa de Oliveira, pela compreensão diante das intercorrências e suporte frente à Coordenação do Programa de Pós-Graduação, BIONORTE.

À Coordenação do PPG-BIONORTE, pela excelência da composição do corpo docente e das disciplinas ofertadas, bem como na presteza na solução de questões de ordem burocrática.

À Universidade Federal do Amazonas por sempre ter me acolhido.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de Pesquisador Especialista Visitante Nível 1 no Projeto “Construção de um vetor viral para o tratamento do Alzheimer”, aprovado no Edital nº 26/2020 MS-SCTIE-Decit-DGITIS-CGCIS/CNPq, Plataformas Inovadoras em Terapias Avançadas.

À FAPEAM pelo financiamento da pesquisa no âmbito do Edital N. 010/2021- CT&I ÁREAS PRIORITÁRIAS.

Ao Colégio Militar de Manaus pelo pronto apoio para a minha liberação.

Aos companheiros de luta do Colégio Militar de Manaus, pelo suporte nos inúmeros momentos em que, por ocasião deste trabalho, me apoiaram prontamente nas atividades do Colégio.

Aos amigos Whendel Mesquita e Vinícius Soares, pela parceria e ensinamentos oriundos de inúmeras conversas e discussões tão produtivas.

Aos demais colegas de trabalho da Ufam, pelos ensinamentos e suportes durante a execução das práticas de laboratório.

Aos amigos Wilham e Keicy pelo suporte essencial nas atividades de bancada.

À Ciência, que nos move, inspira e nos inquieta sempre.



“EPIGRAFE”

“Afasta-te de todas as impressões dos sentidos e da imaginação, e crê apenas na tua
razão.”

René Descartes

BARBOSA FILHO, R. A. B. **Desenvolvimento de terapia genética multi alvo para tratamento do câncer cervical causado pelo HPV.** 2024. 100 f. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2024.

RESUMO

O câncer do colo do útero é a segunda causa de câncer mais comum entre as mulheres em todo o mundo e a quarta maior causa de morte entre as mulheres no Brasil. O papilomavírus humano (HPV) exerce um papel central nessa doença, pois sua infecção é considerada condição necessária para desenvolver mais de 90% dos casos de câncer de colo uterino. O tratamento padrão da doença consiste em radioterapia com quimioterapia à base de cisplatina e, desde 2014, o SUS disponibiliza as vacinas Gardasil (contra HPVs 6, 11, 16, e 18) e Cervarix (contra HPVs 16 e 18). No entanto, a eficácia dessas vacinas não é evidente para a terapia de pacientes com câncer cervical. A carcinogênese associada ao HPV fornece um modelo clássico para terapias de câncer baseadas em silenciamento gênico por RNA (RNAi), pois sua progressão depende significativamente dos oncogenes virais E6 e E7. Graças a isso, a maioria das estratégias de terapia baseadas em RNAi desenvolvidas até o momento utilizam moléculas de RNAi direcionadas contra os genes E6 e/ou E7, obtendo de 50 a 80% de silenciamento. O objetivo desta pesquisa é propor uma terapia para o tratamento de lesões cervicais causadas por HPV 16 e HPV 18 baseada em siRNA e circRNA, desenhados com auxílio de ferramentas de bioinformática e testados *in silico* e *in vitro*. Os testes *in silico* foram realizados com ferramentas de bioinformática que analisaram a estabilidade termodinâmica, possíveis efeitos off-target e a similaridade com moléculas de RNAi já patenteadas. Os testes *in vitro*, por sua vez, consistiram em transfecção das moléculas sintetizadas de siRNA e circRNA em linhagens celulares comerciais HeLa (HPV 18 positiva), Caski (HPV 16 positiva) e C-33a (câncer cervical HPV negativo), seguida de qPCR e análises estatísticas. Para o silenciamento por siRNA, foi desenvolvida uma ferramenta para seleção de sequências de siRNA baseada em parâmetros físico-químicos, que permitiu também verificar a viabilidade dos siRNAs escolhidos. Foi observada similaridade dos siRNAs com alguns alvos já descritos em patentes registradas no Instituto Nacional de Propriedade Industrial – INPI. Os testes *in vitro* realizados até o momento mostraram que a terapia conseguiu reduzir significativamente a expressão dos genes E6 e E7 em células HeLa. Todavia, testes adicionais com circRNA e linhagens celulares Caski (HPV 16 positiva) e C-33a (câncer cervical HPV negativo) ainda estão sendo realizados para verificar a viabilidade da terapia proposta por este trabalho.

Palavras-chave: Câncer; HPV; Terapia; RNAi

BARBOSA FILHO, R. A. B. **Development of multi-target gene therapy for the treatment of cervical cancer caused by HPV.** 2024. 100 f. Thesis (PhD in Biodiversity and Biotechnology) - Federal University of Amazonas, Manaus, 2024.

ABSTRACT

Cervical cancer is the second most common cancer among women worldwide and the fourth leading cause of death among women in Brazil. Human papillomavirus (HPV) plays a central role in this disease, as its infection is considered a necessary condition for the development of more than 90% of cervical cancer cases. The standard treatment for the disease consists of radiotherapy with cisplatin-based chemotherapy and, since 2014, the SUS has made available the vaccines Gardasil (against HPVs 6, 11, 16, and 18) and Cervarix (against HPVs 16 and 18). However, the efficacy of these vaccines for the treatment of patients with cervical cancer is not clear. HPV-associated carcinogenesis provides a classic model for cancer therapies based on RNA gene silencing (RNAi), as its progression depends significantly on the viral oncogenes E6 and E7. Therefore, most RNAi-based therapeutic strategies developed to date use RNAi molecules targeting the E6 and/or E7 genes, achieving 50 to 80% silencing. The aim of this research is to propose a therapy for the treatment of cervical lesions caused by HPV 16 and HPV 18 based on siRNA and circRNA, designed with the aid of bioinformatics tools and tested in silico and in vitro. The in silico tests were performed with bioinformatics tools that analyzed thermodynamic stability, possible off-target effects, and similarity with already patented RNAi molecules. The in vitro tests, in turn, consisted of transfection of the synthesized siRNA and circRNA molecules into commercial cell lines HeLa (HPV 18 positive), Caski (HPV 16 positive), and C-33a (HPV negative cervical cancer), followed by qPCR and statistical analyses. For siRNA silencing, a tool was developed to select siRNA sequences based on physicochemical parameters, which also allowed verifying the viability of the chosen siRNAs. Similarity of the siRNAs with some targets already described in patents registered with the National Institute of Industrial Property (INPI) was observed. In vitro tests performed to date have shown that the therapy was able to significantly reduce the expression of the E6 and E7 genes in HeLa cells. However, additional tests with circRNA and Caski (HPV 16 positive) and C-33a (HPV negative cervical cancer) cell lines are still being performed to verify the viability of the therapy proposed by this work.

Keywords: Cancer; HPV; Therapy; RNAi



LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Árvore filogenética de Papilomavírus. Adaptado de DOORSLAER <i>et al.</i> (2013).	17
Figura 2. Organização do genoma do HPV na forma episomal (A) e integrada ao hospedeiro (B). Adaptado de SYRJÄNEN <i>et al.</i> (2018).	19
Figura 3. Ciclo viral do HPV. Adaptado de DOORBAR <i>et al.</i> (2012).	20
Figura 4. Representação do colo uterino. Adaptado de MOLIN <i>et al.</i> (2024).	21
Figura 5. Diagnóstico de neoplasia maligna do colo uterino (C53) para a faixa etária atendida pela campanha de vacinação. Adaptado de BARBOSA FILHO <i>et al.</i> (2024).	23
Figura 6. Biogênese de miRNA. Adaptado de O'BRIEN <i>et al.</i> , (2018).	25
Figura 7. DNA nativo, RNA e modificações químicas que são aprovadas na terapêutica até o momento. Adaptado de EGLI <i>et al.</i> (2023).	30
Figura 8. Esquema de montagem da placa para bioensaio com células HeLa. MIX3.1 corresponde a lipofectamina + RNAi (5 pmol); MIX3.2 corresponde a lipofectamina + RNAi (10 pmol); MIX3.3 corresponde a lipofectamina + RNAi (20 pmol); NTC corresponde a célula + lipofectamina.	38
Figura 9. Esquema de montagem do sistema para reação da transcriptase reversa.	39
Figura 10. Fluxo operacional do workflow para desenho de RNAi.	42
Figura 11. Resultado da busca por patentes registradas no INPI e no Google Patentes com os termos "HPV" e "RNAi".	44
Figura 12. Análise comparativa entre os alvos propostos e os alvos descritos pelas patentes registradas no INPI.	44
Figura 13. Predição das estruturas dos siRNA e shRNA selecionados.	45
Figura 14. Disposição das sequências no RNA circular.	48
Figura 15. Alinhamento entre a sequência do inserto clonado em pUC19 (W040782_S032244-02_M13R-88) e a sequência desenhada para o DNA codificante do circRNA (circrna2).	49
Figura 16. Perfil da qPCR da curva padrão utilizando o gene U6.	51
Figura 17. Perfil da qPCR do gene E7. A - Perfil das curvas de amplificação da reação. B - Perfil das curvas de melting da reação.	52
Figura 18. Perfil da qPCR do gene E6. A - Perfil das curvas de amplificação da reação. B - Perfil das curvas de melting da reação.	53
Figura 19. Perfil de expressão apresentado pelas amostras submetidas a tratamento com siRNA.	54
Figura 20. Fotomicrografia de HeLa com aumento de 100x antes (A) e depois (B) da transfecção.	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação entre as classificações criadas pela OMS ao longo dos anos para as lesões precursoras de carcinoma de células escamosas do colo do útero (Fonte: WILD <i>et al.</i> , 2020)	22
Tabela 2. Oligonucleotídeos aprovados para comercialização (Fonte: EGLI <i>et al.</i> , 2023).	31
Tabela 3. Perfil da análise de E6 e E7 de HPV 16 e HPV 18 para desenho dos siRNAs utilizados neste estudo.	43
Tabela 4. siRNA gerados para os genes E6 e E7 de HPV 16 e HPV 18.	45
Tabela 5. Composição das sequências dos espaçadores com os respectivos sítios de restrição, quando presentes.	47
Tabela 6. Composição do cDNA ponte e das sequências complementares aos miRNAs com nucleotídeos despareados destacados.	48
Tabela 7. Composição das sequências dos iniciadores: os iniciadores E6_16 e E6_18 amplificam um fragmento do gene E6 de HPV 16 e HPV 18, respectivamente; os iniciadores E7_16 e E7_18 amplificam um fragmento do gene E7 de HPV 16 e HPV 18, respectivamente; os iniciadores circRNA amplificam um fragmento do cDNA do RNA circular; os iniciadores HPV 16_E6_G, HPV 16_E7_G, HPV 18_E6_G e HPV 18_E7_G atuam na síntese de cDNAs dos RNAs guia; os iniciadores 155_F, 21_F e 182_F atuarão na síntese de de cDNA dos miRNAs alvos.	50
Tabela 8. Frequências nucleotídicas e parâmetros associados ao teste de Tajima para cada gene analisado.	50
Tabela 9. Perfil de knockdown apresentado pelas amostras submetidas a tratamento com siRNA.	54
Tabela 10. Perfil do teste de citotoxicidade pela ação de MTT apresentado pelas amostras submetidas a tratamento com siRNA. NTC = células expostas à lipofectamina, C- = células somente com meio de cultura, $IC = [(Absorbância\ de\ C-) - (Absorbância\ da\ amostra)] / (Absorbância\ de\ C-) \times 100$.	56



SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1. OBJETIVO GERAL	15
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Histórico das infecções causadas por HPV	16
2.2 Evolução e diversidade dos Papilomavírus	16
2.3 Organização do genoma do HPV e ciclo de vida	18
2.4 Fisiopatologia das lesões causadas por HPV	20
2.5 Imunologia das infecções cervicais causadas por HPV	22
2.6 Epidemiologia do câncer do colo do útero no mundo e no Brasil	23
2.7 Relação dos miRNAs com as lesões cervicais	24
2.8 RNAs circulares e a regulação de miRNAs	26
2.9 Tratamentos disponíveis para o câncer cervical	27
2.10 Vacinas contra o HPV	29
2.11 Terapias utilizando tecnologia antisense	30
2.12 Terapias baseadas em RNAi e sua aplicação como terapia contra HPVs	32
3 MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 Aspectos éticos da pesquisa	34
3.2 Desenho, ranqueamento e seleção de siRNA e shRNA	34
3.3 Desenho e síntese de iniciadores	36
3.4 Síntese de circRNA	36
3.5 Transfecção em células humanas	37
3.6 Transfecção em células humanas	37
3.7 Extração e quantificação de RNA	38
3.8 Síntese de cDNA	38
3.9 Análise da expressão de E6 e E7 por qPCR	39
3.10 Teste de citotoxicidade celular	40
3.11 Análise estatística	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1 Síntese de sequências para RNAi	42
4.1.1 Desenho, seleção e síntese de siRNA e shRNA	42
4.1.2 Desenho e síntese de circRNA	46
4.2 Desenho de iniciadores	49
4.3 Aspectos do alinhamento múltiplo de sequências	50
4.4 Transfecção em células humanas	51
4.4.1 Ensaio da transfecção com siRNA	51



4.4.2 Ensaio da transfecção com circRNA	51
4.5 Análise da expressão de E6 e E7 por qPCR	51
4.6 Teste de citotoxicidade celular	55
4.7 Resultados adicionais correlatos	56
4.7.1 Adaptações do Laboratório de Cultura de Células Animais	56
4.7.2 Desenvolvimento do software Degenerate Bases	57
4.7.3 Desenvolvimento do workflow Bot_vina	57
4.7.4 Formação de recursos humanos	58
5 CONCLUSÃO	59
6 PERSPECTIVAS	60
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
8 ANEXOS	66
8.1 Certificado de Registro de Programa de Computador do workflow siRNA	66
8.2 Descrição e código do workflow siRNA	67
8.3 Sequências consenso utilizadas no desenho de shRNA e iniciadores	75
8.4 Sequência linearizada do circRNA utilizado neste estudo	76
8.5 Artigo aprovado pela Revista CONCILIUM (Qualis A2)	77
8.6 Adaptações do Laboratório de Cultura de Células Animais	87
8.7 Certificado de Registro de Programa de Computador do Degenerate Bases	88
8.8 Descrição e código do <i>software</i> do Degenerate Bases	89
8.9 Certificado de Registro de Programa de Computador do workflow Autodock_Vina	93
8.10 Descrição e código do <i>workflow</i> Autodock_Vina	94
8.11 Declaração de orientação de iniciação científica: Paulo Castro Galvão	97
8.12 Declaração de orientação de iniciação científica: Ada Jamile Gomes de Oliveira	98
8.13 Declaração de orientação de iniciação científica: Mayanna Lago Coelho	99

1 INTRODUÇÃO

O câncer do colo do útero é a segunda causa de câncer mais comum entre as mulheres em todo o mundo e o papilomavírus humano (HPV) exerce um papel central nessa doença. A infecção pelo HPV está associada a lesões epiteliais e câncer cervical e é considerada uma condição necessária para desenvolver mais de 90% dos casos de câncer de colo do útero. (CROSBIE *et al.*, 2013).

Os papilomavírus humanos podem ser agrupados em tipos de alto risco (comumente encontrados em câncer cervical) e baixo risco (encontrados em verrugas genitais e lesões não-malignas). Entre os vírus de alto risco encontram-se os HPVs 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 66 e 68, e entre os de baixo risco encontram-se os tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 e 81 (DE VILLIERS, 2013; MUÑOZ *et al.*, 2003).

O genoma do HPV constitui-se geralmente de três regiões: uma Longa Região de Controle (LCR); uma região denominada E (Early), devido à expressão de seus genes (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) ocorrer durante as etapas iniciais do ciclo celular do hospedeiro; e uma região L (Late), com genes que se expressam durante as últimas etapas do ciclo celular do hospedeiro (L1 e L2). A região LCR apresenta a origem de replicação viral e os sítios de ligação a fatores de transcrição, que atuam na regulação da ligação da RNA polimerase II aos promotores das regiões E e L. As proteínas L1 e L2 formam o capsídeo viral icosaédrico. As proteínas E1, E2 e E4 atuam na regulação da replicação e da transcrição enquanto que as proteínas E5, E6 e E7 modulam o processo de crescimento e morte celular. (CROSBIE *et al.*, 2013; XI *et al.*, 2018).

As proteínas do HPV interagem com diversas moléculas envolvidas na regulação do ciclo celular da célula hospedeira e entre elas estão: fatores de transcrição, diferenciação celular, miRNAs, dentre outras. Neste contexto, várias estratégias de terapia contra as lesões provocadas por HPV foram desenvolvidas tendo como alvo a atividade das proteínas virais E6 e E7, incluindo: drogas citotóxicas, peptídeos epítomos miméticos, RNAi, entre outras, revertendo significativamente as alterações nos níveis das moléculas afetadas por essas proteínas virais e mostrando efeitos terapêuticos antitumorais significativos *in vitro* e *in vivo*. Além disso, vários compostos derivados de plantas têm sido investigados para determinar seu potencial terapêutico no câncer cervical e demonstrado resultados promissores em ensaios pré-clínicos e clínicos (JUNG *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2018; TAN *et al.*, 2012).

Na última década foram desenvolvidas diversas vacinas para prevenção do câncer cervical e lesões genitais em mulheres com idade entre 9 e 25 anos, três delas já licenciadas pela Food and Drug Administration (FDA) dos EUA e pela maioria dos outros países: a vacina nonavalente Gardasil 9 (contra HPV 6, HPV 11, HPV 16, HPV 18, HPV 31,

HPV 33, HPV 45, HPV 52 e HPV 58), a vacina quadrivalente Gardasil (contra HPV 6, HPV 11, HPV 16, e HPV 18) e a vacina bivalente Cervarix (contra HPV 16 e HPV 18). Outras vacinas como a Cecolin e Walrinvax foram pré-qualificadas recentemente (em julho de 2023) pela FDA como a Gardasil e a Cervarix. Desde 2014, o SUS disponibiliza a vacina preventiva Gardasil e tornou obrigatória a vacinação para a faixa etária entre 9 e 14 anos (AGGARWAL *et al.*, 2023; BARBOSA FILHO *et al.*, 2024; JUNG *et al.*, 2015).

O tratamento padrão da doença localmente avançada consiste em radioterapia com quimioterapia à base de cisplatina. Todavia, várias estratégias terapêuticas, incluindo drogas citotóxicas, inibidores de oncoproteínas virais, peptídeos epítopos miméticos, ribozimas, aptâmeros peptídicos, moléculas de RNA de interferência para silenciamento gênico (RNAi) e combinações de todas essas terapias vêm sendo amplamente exploradas (AGGARWAL *et al.*, 2023; JUNG *et al.*, 2015).

O silenciamento gênico sequência-específico usando RNAi mostra-se promissor como uma nova abordagem terapêutica para o tratamento de uma variedade de doenças que atualmente carecem de tratamentos eficazes, além de poderem combinar-se com terapias convencionais. Neste contexto, estudos com siRNAs (RNAs de interferência pequenos) demonstraram sua versatilidade pela depleção de alvos celulares/virais únicos ou múltiplos. Contudo, o desenvolvimento de uma terapia baseada em siRNA requer validação adicional de sua eficácia *in vitro* e *in vivo*, para avaliar seus potenciais efeitos *off-target*, e a maioria das estratégias de terapia baseadas em RNAi desenvolvidas até o momento utilizam moléculas direcionadas contra os genes E6 ou E7 ou ambos, obtendo de 40 a 80% de silenciamento (JUNG *et al.*, 2015).

Este projeto de pesquisa propõe desenvolver uma nova estratégia de terapia gênica à base de RNAi, nunca utilizada contra genes de HPV, direcionado ao silenciamento simultâneo dos genes E6 e E7 de HPV 16 e HPV 18 e de miRNAs relacionados com a progressão tumoral.

1.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma terapia baseada em RNA de Interferência para o tratamento de lesões cervicais causadas pelo HPV.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenhar e analisar *in silico* RNAs de interferência;
- Transfectar células animais;
- Quantificar a interação entre RNAi e RNAs alvo em células tumorais;
- Realizar os testes de citotoxicidade *in vitro*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico das infecções causadas por HPV

Desde a Antiguidade, as verrugas genitais eram associadas à promiscuidade sexual e vistas como potencialmente infecciosas por gregos e romanos. Em 1842, o médico italiano Rigoni-Stern analisou certidões de óbito de mulheres em Verona durante o período 1760-1839 e associou o desenvolvimento de câncer do colo do útero aos contatos sexuais, ao observar uma elevada frequência deste tipo de câncer em mulheres casadas, viúvas e prostitutas, mas a sua ocorrência rara em virgens e freiras (BÄFVERSTEDT, 1967; ZUR HAUSEN, 2009).

O rápido desenvolvimento da bacteriologia na segunda parte do século XIX resultou nas primeiras tentativas de vincular o câncer do colo do útero a eventos infecciosos sexualmente transmissíveis. No entanto, somente em 1949 Strauss e colaboradores demonstraram a presença de uma partícula viral por microscopia eletrônica. Finalmente, em 1965 foram publicados os primeiros trabalhos que caracterizavam o DNA circular de cadeia dupla do HPV (CRAWFORD, 1965; KLUG, 1965; STRAUSS *et al.*, 1949; ZUR HAUSEN, 2009).

Durante a década de 1970, estudos de hibridação molecular utilizando sondas de RNA e DNA de verrugas plantares (lesões provocadas por papilomavírus e que se desenvolvem na planta do pé, próximo aos dedos e que podem apresentar pontos escuros em seu interior, além do espessamento da planta do pé) revelou a pluralidade de tipos de HPV. Entre as décadas de 1970 e 1980, foram realizados diversos estudos que enriqueceram o conhecimento acerca da relação entre a infecção por HPV e o câncer do colo do útero (DÜRST *et al.*, 1983; TORRE *et al.*, 1978; ZUR HAUSEN, 1975; ZUR HAUSEN *et al.*, 1976).

2.2 Evolução e diversidade dos papilomavírus

Os papilomavírus foram originalmente agrupados com os poliomavírus em uma família, os *Papovaviridae*, baseado em capsídeos semelhantes e não envelopados e nos genomas de DNA de fita dupla circular. Como mais tarde foi reconhecido que os dois grupos de vírus têm tamanhos de genoma diferentes, organizações de genoma completamente diferentes e nenhuma semelhança significativa de sequência de nucleotídeos ou aminoácidos, eles agora são oficialmente reconhecidos pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) como dois grupos separados, a família *Papillomaviridae* e *Polyomaviridae* (DE VILLIERS *et al.*, 2004).

2.3 Organização do genoma do HPV e ciclo de vida

O genoma dos papilomavírus possui dupla fita de DNA circular e varia de 6953 pares de base (pb) [*Chelonia mydas papillomavirus* tipo 1 (CmPV1)] a 8607 bp [*Canine papillomavirus* tipo 1 (CPV1)] de comprimento, dividindo-se nas regiões: *Early* (E), *Late* (L) e Longa Região de Controle (LCR) (VAN DOORSLAER *et al.*, 2013).

A região E concentra os oncogenes virais (E1, E2, E4, E5, E6 e E7), que expressam proteínas que interagem com proteínas em vias importantes dos processos de replicação, transcrição, diferenciação celular, apoptose e mitose. As proteínas E1, E2 e E4 atuam na regulação da replicação e da transcrição dos genes virais no hospedeiro. Já as proteínas E5, E6 e E7 modulam o processo de crescimento e morte celular, interferindo em diversas vias desses processos (STEWART, 2014; SYRJÄNEN, 2018).

A proteína E5 Induz a proliferação celular não programada, ativa receptores dos fatores de crescimento e outras proteínas quinases, inibe a apoptose e o tráfego do complexo principal de histocompatibilidade para a superfície celular (STEWART, 2014; SYRJÄNEN, 2018).

A proteína E6 interfere no ciclo celular ao inativar a proteína p53 (53 kDa), que participa do processo de morte celular programada. A p53 ativa a expressão de proteínas como a p21, que por sua vez se ligará a um complexo ciclina-CDK e interagirá com co-ativadores transcricionais, proteínas envolvidas na polaridade e motilidade celular e fatores de replicação e reparo do DNA, culminando com a interrupção de G1, induzindo a apoptose ou permitindo que a célula repare o DNA antes do início de S (STEWART, 2014; SYRJÄNEN, 2018).

A proteína E7 induz a proliferação celular não programada, interferindo no ciclo celular ao ligar-se com a p105Rb (105 KDa), que forma um complexo com o fator de transcrição celular E2F1 (p105Rb-E2F1) durante a fase G1 do ciclo celular resultando na repressão da transcrição dos genes envolvidos na proliferação celular e, consequentemente, na replicação do DNA. A formação do complexo E7-p105Rb induz a fosforilação de p105Rb, que, por sua vez, perde afinidade pela ligação com o receptor de membrana E2F1 (proteína que regula positivamente o processo de transcrição) (STEWART, 2014; SYRJÄNEN, 2018).

As proteínas L1 e L2 formam o capsídeo viral icosaédrico ao redor do genoma viral durante a geração de *vírions* descendentes, com 360 cópias de L1 (proteína maior do capsídeo) e 12 cópias de L2 (proteína menor do capsídeo). As proteínas do capsídeo também vêm sendo estudadas no combate às infecções por HPV, com o desenvolvimento de vacinas imuno profiláticas que induzam a produção de anticorpos capazes de neutralizar antígenos virais, utilizando-se para isto, subunidades recombinantes dessas proteínas (STEWART, 2014; SYRJÄNEN, 2018).

LCR é uma região não codificante com aproximadamente 850 pb, entre os genes L1 e E6 que compreende cerca de 12% do genoma viral. A região é dividida em 3 segmentos: o segmento 5' contém um sítio de ligação a E2 (E2bs), além dos locais de terminação da transcrição e poliadenilação para transcritos tardios; o segmento central é flanqueado por dois E2bs e demonstrou funcionar como um regulador transcricional, com vários motivos importantes para estimular ou suprimir a atividade transcricional viral (sítios de ligação a AP1, NF1, TEF1, OCT1, YY1, BRN-3a, NF-IL6, KRF-1, NF-kB, FOXA1 e GATA3, entre vários outros); o segmento 3' contém dois E2bs além de um sítio de ligação E1 (E1bs) que se sobrepõe à origem de replicação (RIBEIRO *et al.*, 2018).

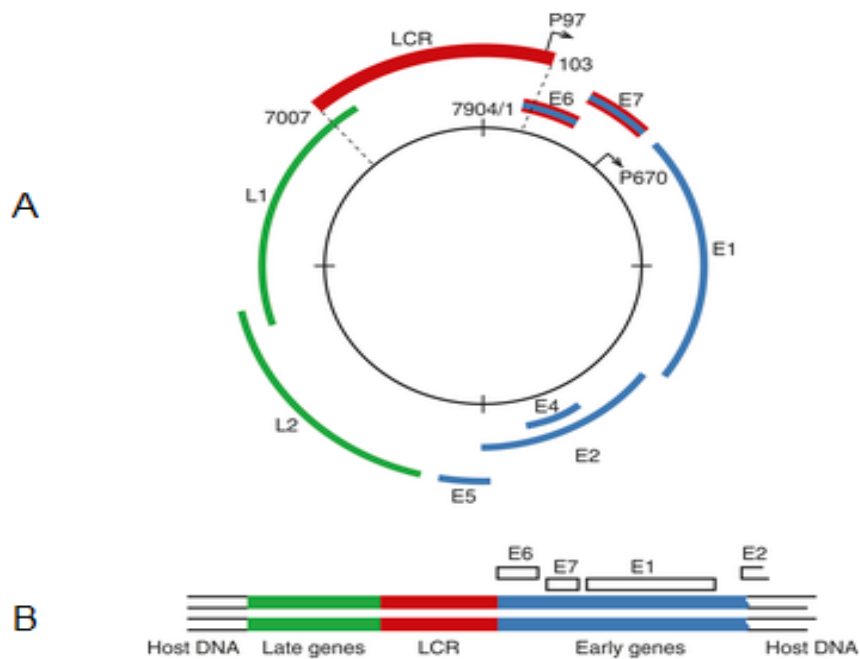


Figura 2. Organização do genoma do HPV na forma episossomal (A) e integrada ao hospedeiro (B).
Adaptado de SYRJÄNEN *et al.* (2018).

Como apresentado na Figura 2, todos os papilomavírus, as três regiões do genoma (E, L e LCR) são separadas por dois sítios de poliadenilação (pA): early pA e late pA. No HPV 16 existem duas regiões promotoras principais: a P97 (posicionada upstream de E6), responsável pela expressão dos genes da região E, e a P670 (localizada dentro de E7), responsável pela expressão dos genes da região L. Além disso, as regiões LCR e L1 apresentam resíduos de CpG (em posições upstream de p97) que podem sofrer metilação e consequente regulação negativa (STEWART, 2014; SYRJÄNEN, 2018).

A Figura 3 apresenta um esquema da atuação das proteínas virais ao longo do ciclo viral. O local de expressão dos diferentes produtos gênicos virais é mostrado à esquerda da imagem, com os principais estágios durante a infecção produtiva listados ao lado (DOORBAR *et al.*, 2012).

Na zona de transformação cervical, acredita-se que a infecção requer a presença de uma microlesão que permite que os *vírions* acessem a lâmina basal e interajam com proteoglicanos de sulfato de heparina e possivelmente também laminina. Mudanças estruturais no capsídeo do *vírion*, que inclui a clivagem de L2, facilitam a transferência para um receptor secundário no queratinócito basal, que é necessário para a internalização do vírus e subsequente transferência do genoma viral para o núcleo. O genoma viral mantém-se episomal em baixo número de cópias (200 ou mais cópias por célula) nas células basais infectadas, independentemente da natureza da célula basal infectada. À medida que essas células se dividem, elas produzem células filhas que são empurradas para fora em direção à superfície epitelial. Diferentes eventos no ciclo de vida do vírus são acionados em diferentes estágios durante essa migração (OYERVIDES-MUÑOZ *et al.*, 2018).

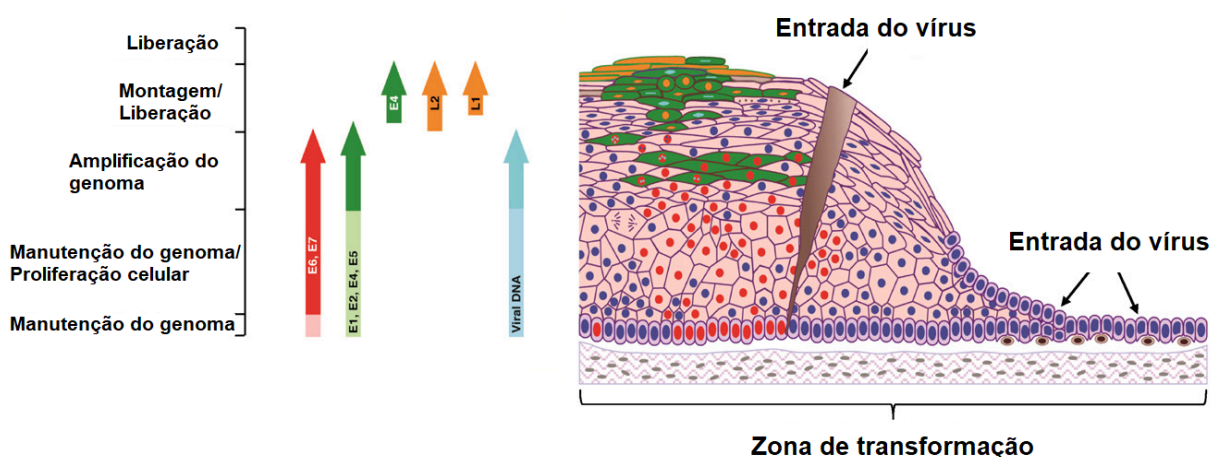


Figura 3. Ciclo viral do HPV. Adaptado de DOORBAR *et al.* (2012).

A integração do genoma do HPV pode ocorrer de duas formas: como um único genoma integrado; ou como múltiplas repetições em tandem do genoma viral no genoma celular. O HPV aproveita os mecanismos de reparo e replicação de DNA existentes para inserir seu genoma no hospedeiro. A integração do HPV no genoma do hospedeiro ocorre geralmente próximo a genes relacionados com vias de reparo celular, supressão tumoral, crescimento e proliferação celular e, em alguns casos, codifica fatores de transcrição. A integração do genoma próximo a esses genes leva a modificações que podem levar à carcinogênese, como: perda de função de genes supressores de tumor; aumento na expressão de oncogenes; e rearranjos inter e intra cromossômicos (OYERVIDES-MUÑOZ *et al.*, 2018).

2.4 Fisiopatologia das lesões causadas por HPV

O colo do útero, também conhecido como cérvix, é a porção mais estreita e inferior do útero, de formato cilíndrico ou cônico com 3 cm a 4 cm de comprimento e 2,5 cm de

diâmetro. A metade inferior do colo uterino, denominada de porção vaginal, se projeta na parede anterior da vagina e a metade superior permanece acima da vagina.

Anatomicamente, o colo uterino é dividido em duas partes:

- Ectocérvice: posição mais facilmente visível e se projeta na parede anterior da vagina
- Endocérvice: posição mais interna e proximal à abertura cervical externa.

A endocérvice é revestida por um epitélio colunar simples, raramente ciliado e predominantemente mucíparo. O colo uterino possui um canal endocervical que conecta a cavidade uterina ao lúmen da vagina (Figura 4).

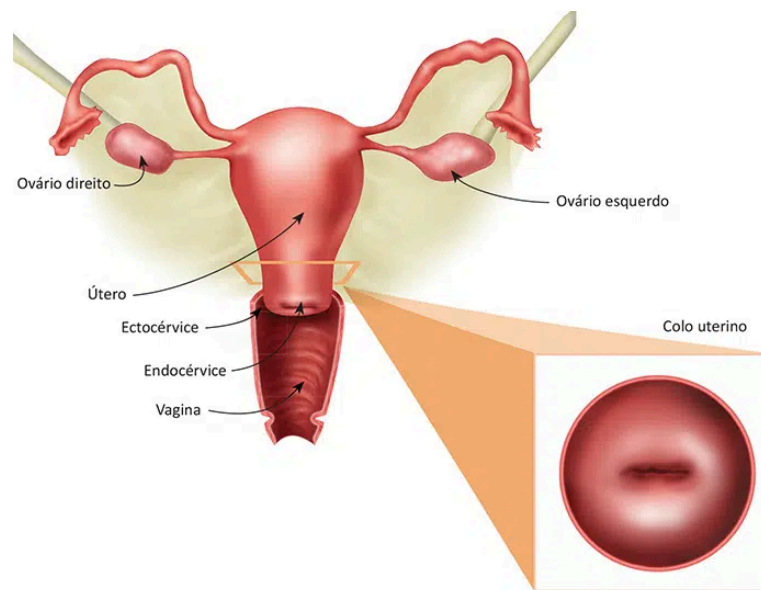


Figura 4. Representação do colo uterino. Adaptado de MOLIN *et al.* (2024).

Os papilomavírus humanos possuem tropismo por células epiteliais e podem ser agrupados em tipos de alto risco e baixo risco. Os tipos de alto risco são comumente encontrados em câncer cervical (como os HPVs 16, 18, 31, 33 e 34), enquanto os considerados de baixo risco são principalmente encontrados em verrugas genitais e lesões não-malignas (como os HPVs 6, 11, 40 e 42). A divisão celular ativa, como ocorre durante a cicatrização de feridas, é considerada necessária para a entrada do genoma do vírus no núcleo, e foi proposto que a formação da lesão requer a infecção inicial de uma célula mitoticamente ativa. Após a exposição ao vírus, iniciam-se os eventos do ciclo viral, juntamente com a atividade específica coordenada por fatores que regulam a resposta imune do hospedeiro. Este ciclo depende da diferenciação das células do epitélio infectado (STEWART, 2014).

À medida que se dividem as células basais migram em direção à superfície e tornam-se diferenciadas. O DNA viral é distribuído entre as células filhas, sendo que uma delas inicia o processo de diferenciação e maturação, enquanto a outra permanece na

camada basal como reservatório do DNA viral. Cada estágio da infecção por papilomavírus que leva ao câncer pode ser influenciada tanto pelo hospedeiro quanto pelas variações do genoma viral e por fatores ambientais (BURK *et al.*, 2013; STEWART, 2014).

É bem evidenciado que o câncer do colo do útero é precedido por lesões teciduais que são classificadas pela OMS de acordo com o grau de comprometimento tecidual, esta classificação sofreu inúmeras alterações ao longo dos anos, como pode ser observado na Tabela 1.

Classificação da OMS 1975/1994	Classificação da OMS 2003	Classificação da OMS 2014
Displasia leve	Neoplasia Intraepitelial Cervical 1 (NIC1)	Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau (LSIL)
Displasia Moderada Displasia Severa Carcinoma <i>in situ</i>	Neoplasia Intraepitelial Cervical 1 (NIC2) Neoplasia Intraepitelial Cervical 1 (NIC3)	Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau (HSIL)

Tabela 1. Comparação entre as classificações criadas pela OMS ao longo dos anos para as lesões precursoras de carcinoma de células escamosas do colo do útero (Fonte: WILD *et al.*, 2020).

Atualmente as Lesões Intraepiteliais Escamosas são classificadas como de Baixo Grau (Low-grade squamous intraepithelial lesion - LSIL) ou de Alto Grau (High-grade squamous intraepithelial lesion - HSIL) de acordo com o grau de comprometimento epitelial e são caracterizadas pela perda gradual das funções celulares básicas, como o controle da divisão celular e capacidade de amadurecimento. Tal progressão tem relação direta com a interação das oncoproteínas do HPV com os fatores de regulação do ciclo celular do hospedeiro (FERRAZ *et al.*, 2012; WILD *et al.*, 2020).

2.5 Imunologia das infecções cervicais causadas por HPV

As respostas imunes são fundamentais para eliminar a maioria das infecções por HPV, dividindo-se em duas frentes de resposta: inata e adaptativa. Em casos de microlesões causadas por infecção bacteriana ou contato sexual, as células apresentadoras de antígeno (APCs), como as células de Langerhans (LCs) na epiderme, são expostas às proteínas do HPV. No entanto, as LCs não conseguem gerar uma resposta imune eficaz contra o HPV 16, resultando em tolerância imunológica. Monócitos, macrófagos e células dendríticas (DCs) na pele reconhecem os antígenos do HPV e liberam citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, TNF- α e IL-12, promovendo inflamação e sinalizando perigo para ativar a resposta adaptativa (YOUSEFI *et al.*, 2022).

A imunidade inata atua apenas na eliminação precoce do HPV, enquanto a adaptativa é necessária para a regressão de lesões estabelecidas. Estudos indicam que células T citotóxicas CD8+ e células T auxiliares CD4+ do tipo TH1 (produtoras de IL-2 e IFN- γ), que reconhecem as proteínas E2 e E6 do HPV, têm papel crucial na eliminação de infecções de baixo grau. Já as células T CD4+ que reconhecem a proteína E7 são

essenciais no controle da neoplasia de alto grau. Devido à baixa concentração viral na lâmina basal e à produção de novos vírions nas camadas superiores do epitélio, a resposta imune humoral é limitada em infecções naturais pelo HPV, sendo IgG e IgA os principais anticorpos detectados no soro dos pacientes (YOUSEFI *et al.*, 2022).

2.6 Epidemiologia do câncer do colo do útero no mundo e no Brasil

A infecção pelo HPV é considerada uma condição necessária para desenvolvimento em mais de 90% dos casos de câncer de colo do útero. Sabe-se que os tipos de HPV de alto risco estão associados a quase todos os casos de câncer no colo do útero. Desses tipos, os mais comumente encontrados neste tipo de câncer são o HPV 16 e o HPV 18. Outros fatores que contribuem para a etiologia deste tumor são: tabagismo, hipovitaminoses, multiplicidade de parceiros sexuais, iniciação sexual precoce e uso de contraceptivos orais (INCA, 2023; STEWART *et al.*, 2014).

O câncer do colo uterino tem estado entre as cinco maiores causas de mortalidade por câncer em mulheres em todo o mundo, segundo a International Agency for Research on Cancer (IARC). Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer do colo do útero é o segundo mais incidente nas Regiões Norte (21,20/100 mil), Nordeste (17,62/100 mil) e Centro-Oeste (15,92/100 mil). Já na Região Sul (17,48/100 mil), ocupa a quarta posição e, na Região Sudeste (12,01/100 mil), a quinta posição (FERRAZ *et al.*, 2012; INCA, 2023).

Para a Região Norte, os dados do INCA mostram que o câncer do colo uterino apresenta incidência de aproximadamente 16,77/100 mil casos, ocupando o segundo lugar entre as neoplasias descritas para a região. Entre os estados da Região Norte, o Amazonas ocupa a primeira colocação nas estimativas de incidência, com 100/100 mil casos previstos, seguido pelo Pará (80/100 mil). Os demais estados da Região Norte não apresentam incidência superior a 30/100 mil casos (INCA, 2023).

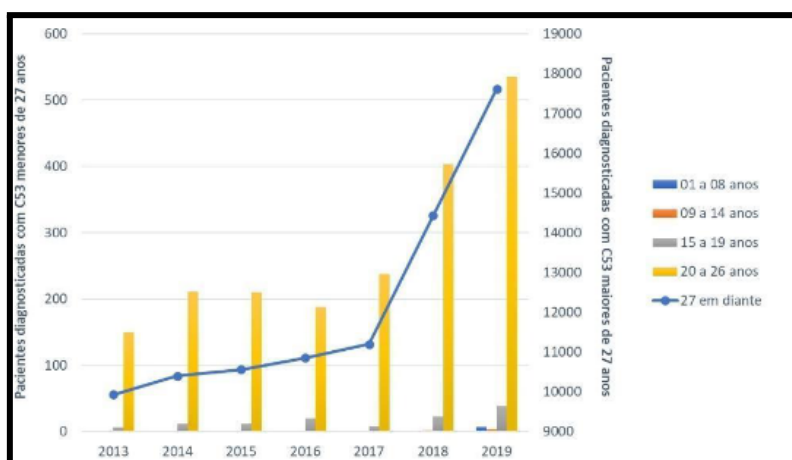


Figura 5. Diagnóstico de neoplasia maligna do colo uterino (C53) para a faixa etária atendida pela campanha de vacinação. Adaptado de BARBOSA FILHO *et al.* (2024).

A Figura 5 mostra que entre 2013 (ano anterior ao início da campanha de vacinação contra HPV) e 2019 (ano anterior ao marco temporal da pandemia de COVID19 no Brasil) houve aumento significativo dos registros de neoplasia maligna do colo do útero (C53) no Brasil. Tal aumento teve relação diretamente proporcional com o aumento da população feminina no mesmo período. A maioria dos diagnósticos realizados foi registrada para a faixa etária entre 20 e 26 anos (com média de 277 ± 140). Contudo, 98% dos diagnósticos de C53 foram registrados para a faixa etária acima de 27 anos (BARBOSA FILHO *et al.*, 2024).

2.7 Relação dos miRNAs com as lesões cervicais

Entre os muitos grupos de biomoléculas desreguladas pelo HPV, os miRNAs surgiram recentemente como reguladores-chave da carcinogênese, capazes de controlar processos complexos como a metastização do câncer. Alguns desses miRNAs têm sua expressão aumentada em células tumorais e metastáticas, afetando vias importantes da proliferação celular, apoptose e diferenciação celular (SANTOS *et al.*, 2018).

Os miRNAs (miRNAs) são uma classe de RNAs que desempenham papéis importantes na regulação da expressão genética. Cerca de metade de todos os miRNAs atualmente identificados são intragênicos e processados principalmente a partir de íntrons e relativamente poucos éxons de genes codificadores de proteínas, enquanto o restante é intergênico, transcrito independentemente de um gene hospedeiro e regulado por seus próprios promotores (HA *et al.*, 2014).

A biogênese canônica de um miRNA começa com a transcrição de seu gene pela enzima RNA polimerase II, gerando uma longa fita de RNA fita dupla denominada miRNA primário (pri-miRNA), que apresenta uma estrutura secundária em forma de grampo. Este pri-miRNA recebe a marcação com a 7-metilguanossina na extremidade 5' e a cauda de poli-adenosina (poli A) na extremidade 3' semelhante ao mRNA, para que possa ocorrer a estabilização do transcrito (O'BRIEN *et al.*, 2018).

Ainda no núcleo celular, a enzima RNase III Drosha (RNase III endonuclease) forma um complexo microprocessador com o cofator *DiGeorge syndrome critical region 8* (DGCR8), que cliva o pri-miRNA para produzir o precursor-miRNA (pré-miRNA, com aproximadamente 70 pb). O pré-miRNA é exportado para o citoplasma pela Exportina 5, que utiliza RanGTP como co-fator, e é processado pelo complexo enzimático Dicer e pela proteína de ligação TAR, para produzir o miRNA maduro de fita dupla. Finalmente, uma destas fitas denominada *passageira* é degradada pelas RNases, restando apenas a fita madura ou fita *guia*, que será carregada pela família de proteínas Argonauta (AGO) para formar um complexo de silenciamento induzido por miRNA, RISC (do inglês miRNA - induced silencing complex) (JONAS *et al.*, 2015).

A seleção da fita é baseada em parte na estabilidade termodinâmica nas extremidades 5' do duplex de miRNA ou um U 5' na posição 1 da fita. Geralmente, a fita com menor estabilidade 5' ou 5' uracil é preferencialmente carregada em AGO e é considerada a fita guia (O'BRIEN *et al.*, 2018).

Nas células animais, a maioria das interações entre o miRNA e o RNAm alvo não é totalmente complementar. Porém, uma interação perfeita deve ocorrer em uma sequência conservada de sete ou oito nucleotídeos, localizada principalmente nas posições 2-7 ou 2-8 a partir da extremidade 5' do miRNA: a região *seed* do miRNA. Essa região é essencial para a ligação do miRNA ao mRNA e desempenha um papel fundamental na regulação da expressão gênica. Apesar do pareamento de bases entre o miRNA e seu mRNA alvo não precisar ser perfeito, a sequência *seed* deve ser complementar de forma perfeita. O emparelhamento adicional na extremidade 3' também ajuda na estabilidade e especificidade da interação miRNA-alvo (ELLWANGER *et al.*, 2011; JONAS *et al.*, 2015).

Até o momento, várias vias de biogênese de miRNA não canônicas foram elucidadas. Essas vias fazem uso de diferentes combinações das proteínas envolvidas na via canônica, principalmente complexo microprocessador, Dicer, Exportina e AGO, como ilustrado na Figura 6 (O'BRIEN *et al.*, 2018).

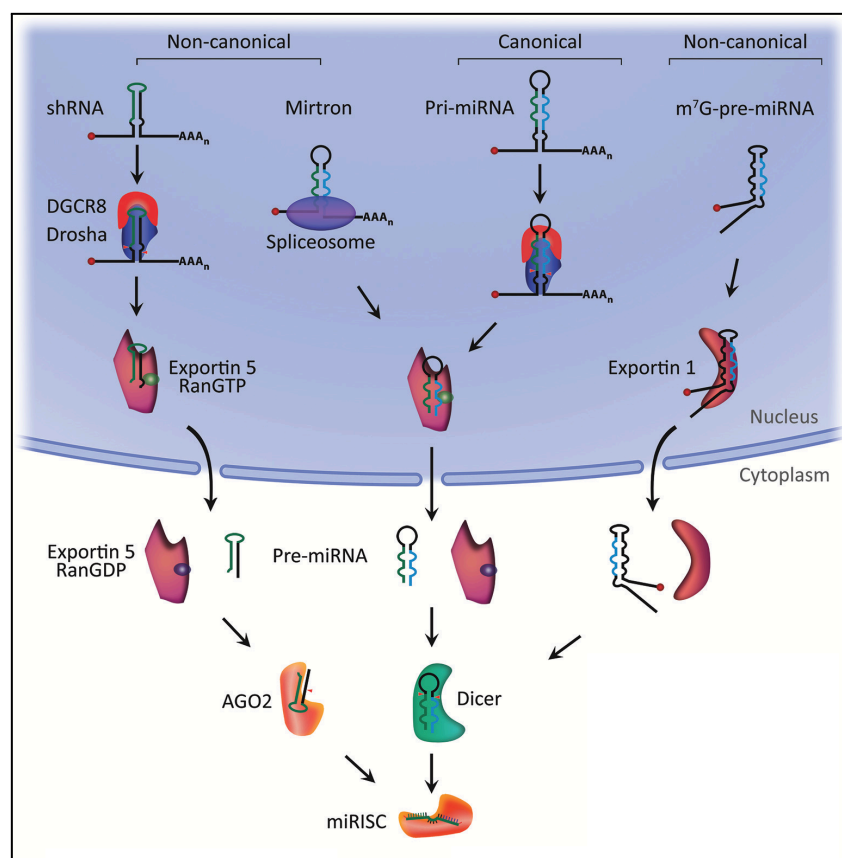


Figura 6. Biogênese de miRNA. Adaptado de O'BRIEN *et al.*, (2018).

O modo de ação dos miRNAs está diretamente relacionado com o grau de complementaridade das sequências dos miRNAs e do mRNA-alvo. Tendo conhecimento que a ligação dos miRNAs em seus alvos ocorrem na região 3' não traduzida (3' UTR), o grau de complementaridade se dá pela quantidade de pareamentos ocorridos por toda a sequência dos miRNAs, podendo provocar a degradação ou a inibição da sua tradução (O'BRIEN *et al.*, 2018).

Existem potenciais candidatos a miRNA que podem ser utilizados para a terapia do câncer cervical provocado por HPV. Contudo, essas moléculas não têm sido amplamente utilizadas no tratamento de infecções por HPV, pois seus mecanismos de ação não são bem compreendidos e ainda estão sendo estudados. Apenas alguns miRNAs demonstraram ser alterados em cânceres associados ao HPV (SANTOS *et al.*, 2018).

2.8 RNAs circulares e a regulação de miRNAs

Os RNAs circulares (circRNAs) são uma nova classe de "RNAs não codificantes" que se originam de éxons e/ou íntrons de RNAs mensageiros precursores (pré-mRNAs). Essas moléculas são geralmente produzidas em níveis baixos de maneira específica para o tipo de célula em tecidos de mamíferos, mas devido à sua conformação circular, elas não são afetadas pela maquinaria de decaimento do mRNA da célula. Os circRNAs podem absorver vários miRNAs ou proteínas de ligação a RNA e desempenham um papel crucial na regulação da expressão gênica e na tradução de proteínas, podendo servir também como locais de produção de pequenos peptídeos. Além disso, os circRNAs desempenham um papel importante na proliferação celular, progressão do ciclo celular, metástase, motilidade, angiogênese e apoptose (ALMOUH *et al.*, 2022; HANSEN *et al.*, 2013; LAVENNIAH *et al.*, 2020).

Além disso, os circRNAs desempenham um papel importante na proliferação celular, progressão do ciclo celular, metástase, motilidade, angiogênese e apoptose, uma vez que também podem ser exportados via exossomos. Os circRNAs exossômicos podem começar a interagir com miRNAs ou proteínas das células receptoras e podem desempenhar papéis críticos durante a progressão do câncer e resistência a medicamentos por transdução de sinal celular (ALMOUH *et al.*, 2022).

Muitos circRNAs demonstraram ser expressos de forma aberrante em vários tipos de câncer e sustentar processos oncogênicos específicos, como ocorre com o circRNA derivado da expressão do oncogene E7. Particularmente em lesões associadas a vírus, como o papilomavírus humano (HPV), os circRNAs demonstraram estar envolvidos na tumorigênese e na progressão do câncer, bem como na resistência a drogas, e alguns são úteis no diagnóstico (BONELLI *et al.*, 2021).

Há diversos estudos que relatam a eficácia do uso de RNAi como alternativas de terapia contra HPV e relatam novas estratégias de silenciamento utilizando moléculas de RNA circular que precisam ser exploradas no âmbito das lesões por HPV. Atualmente, a promessa de tratamentos de base genética para o HPV permanece em estágios pré-clínicos com resultados promissores evidentes (DIETERICH *et al.*, 2018; JUNG *et al.*, 2015; SALINAS-MONTALVO *et al.*, 2021).

2.9 Tratamentos disponíveis para o câncer cervical

O estágio e a extensão da progressão do câncer do colo do útero determinam a estratégia de tratamento necessária e pode incluir uma ou uma combinação de cirurgia, radioterapia e quimioterapia e terapia alvo (AGGARWAL *et al.*, 2023).

A cirurgia envolve a remoção física do tecido canceroso, mas também pode ser usada para remover tecido metastático. Atualmente, os tipos de cirurgia realizados para tratar o câncer cervical incluem os seguintes (WILD *et al.*, 2020):

- Histerectomia total: Remoção completa do útero e do colo do útero. É o tipo mais comum de histerectomia e pode ser realizada por via abdominal, vaginal ou laparoscópica;
- Histerectomia radical: Além da remoção do útero, são retirados os ligamentos que envolvem o útero (os parâmetros) e a parte superior da vagina;
- Excisão eletrocirúrgica em alça (CAF): Procedimento cirúrgico de alta frequência utilizado para remover lesões intraepiteliais, principalmente na região cervical;
- Conização: Procedimento cirúrgico no qual um pedaço em formato de cone é retirado do colo do útero para a realização de uma biópsia, sendo também conhecido como biópsia em cone.
- Traquelectomia: Cirurgia ambulatorial que envolve uma ressecção cônica do colo do útero, que pode ser feita com bisturi ou com uma alça cortante;
- Criocirurgia: Envolve a destruição controlada de tecidos orgânicos pelo frio, geralmente utilizando nitrogênio líquido em uma temperatura muito baixa.

A radioterapia utiliza raios X de alta energia e é um tratamento importante no tratamento do câncer cervical. Os três tipos de radioterapia usados atualmente para tratar o câncer cervical são (WILD *et al.*, 2020):

- Radioterapia por feixe externo: Também conhecida como radioterapia externa, é um tratamento que utiliza um feixe de radiação direcionado para o tumor do exterior do corpo;
- Radioterapia de intensidade modulada: Técnica de radioterapia que permite uma maior precisão na aplicação dos tratamentos, através da adaptação, durante a

sessão, da intensidade da radiação de cada campo de tratamento, através de diferentes formatos de subcampos;

- Braquiterapia: procedimento no qual a radiação é direcionada de forma específica para uma área específica do corpo, permitindo a administração de doses mais altas de radiação no tumor, com impacto mínimo em tecidos sensíveis adjacentes.

A quimioterapia é parte integrante do regime padrão de tratamento do câncer cervical e é normalmente administrada como terapia adjuvante após a cirurgia, quando características tumorais de mau prognóstico aumentam o risco de doença recorrente, em combinação com radioterapia e como tratamento independente para câncer localmente avançado. O agente único mais eficaz que tem sido usado nas últimas três décadas para tratar o câncer cervical é o quimioterápico cisplatina (BURMEISTER *et al.*, 2022).

Apesar dos esforços e investimentos dos últimos anos, o Brasil ainda possui deficiências importantes no diagnóstico e tratamento de câncer, que afetam tanto a chance de cura quanto a qualidade de vida dos pacientes. Quanto maior o atraso para o início do tratamento do câncer, mais avançada é a doença e maiores são os impactos sociais e financeiros associados a ela. A falta de tratamentos e as dificuldades no acesso à rede assistencial também agravam o problema (INCA, 2023).

Desta forma, a jornada do paciente com câncer também é altamente afetada pelo sistema de saúde em que está inserido, devido a diferenças entre instituições, regiões e tipos de cobertura e acesso aos tratamentos e serviços de saúde oferecidos no Sistema Único de Saúde (SUS) e na saúde suplementar (planos de saúde) (INCA, 2023).

Políticas públicas contra o câncer do colo uterino vêm sendo desenvolvidas no Brasil desde meados dos anos 80 e foram impulsionadas pelo Programa Viva Mulher, em 1996. O controle do câncer do colo do útero é uma prioridade da agenda de saúde do país e integra o Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) no Brasil, 2011-2022 (INCA, 2023).

Desde 2014, o SUS disponibiliza as vacinas Gardasil (contra HPVs 6, 11, 16, e 18) e Cervarix (contra HPVs 16 e 18), além de medicamentos para tratar as verrugas anogenitais (como Podofilotoxina e Imiquimode) e lesões cervicais (como a própria Cisplatina). Os registros do DATASUS mostram que a campanha de vacinação iniciada em 2014 teve um impacto positivo sobre os diagnósticos de neoplasia maligna do colo uterino e também sobre os registros de tratamentos realizados para este diagnóstico (BARBOSA FILHO *et al.*, 2024).

Todavia, o aumento no número de diagnósticos de C53 em mulheres acima de 27 anos de todas as regiões do Brasil a partir de 2017 demonstra que é de suma importância repensar uma estratégia de imunização para as mulheres nessa faixa etária além de

estimular o desenvolvimento e implementação de mais formas de tratamento para o câncer de colo uterino (BARBOSA FILHO *et al.*, 2024).

Ademais, embora as terapias atuais para cânceres causados pelo HPV sejam eficazes, a toxicidade tardia grave associada aos tratamentos atuais contribui para a deterioração da qualidade de vida do paciente. Isso justifica a necessidade de novas terapias para cânceres derivados do HPV (SALINAS-MONTALVO *et al.*, 2021).

2.10 Vacinas contra o HPV

Há duas estratégias de vacinas possíveis contra o HPV: as profiláticas e as terapêuticas. As vacinas profiláticas, como a Gardasil e a Cervarix mencionadas anteriormente, são altamente imunogênicas e induzem anticorpos específicos, uma vez que são baseadas em partículas virais montadas a partir de cópias recombinantes da proteína L1. Já as vacinas terapêuticas diferem das vacinas profiláticas, pois são projetadas para gerar imunidade mediada por células contra células transformadas, em vez de anticorpos neutralizantes (GARBUGLIA *et al.*, 2020).

As vacinas profiláticas são partículas semelhantes a vírus (VLPs) que agem estimulando fortes respostas de anticorpos neutralizantes (principalmente IgG) à proteína L1 do capsídeo na superfície da partícula do vírus HPV. Os anticorpos que se ligam ao vírus impedem que ele infecte as células epiteliais, prevenindo assim a infecção. Altos títulos de anticorpos resultam em um capsídeo revestido de imunoglobulina, o que impede que a partícula do vírus se ligue aos proteoglicanos de sulfato de heparina nas células basais, o primeiro passo da infecção, culminando com o vírus coberto por anticorpos sendo eliminado pelos neutrófilos. Na presença de títulos baixos de anticorpos, as partículas do vírus são apenas parcialmente impedidas de se ligarem às células basais, e o principal mecanismo de ação é causado pela prevenção da interação do capsídeo com o segundo receptor L1 na superfície da célula epitelial, resultando na perda do vírus do tecido (SMALLEY RUMFIELD *et al.*, 2020; YOUSEFI *et al.*, 2022).

No entanto, as vacinas profiláticas não eliminam infecções já estabelecidas e não montam as respostas imunes baseadas em células T CD4⁺ e CD8⁺ necessárias para combater lesões pré-cancerosas ou cancerosas. Devido às taxas de vacinação profilática subótimas contra o HPV em todo o mundo, as infecções por HPV e o subsequente desenvolvimento de malignidades associadas ao HPV continuarão a ser um problema de saúde pública nas próximas décadas. Portanto, o desenvolvimento de vacinas terapêuticas contra o HPV e outras terapias contra o câncer representa uma preocupação urgente de saúde pública. (SMALLEY RUMFIELD *et al.*, 2020).

Entre as proteínas do HPV, as oncoproteínas E6 e E7 são consideradas alvos relevantes para o desenvolvimento de vacinas terapêuticas contra o câncer cervical, pois

são essenciais para o início e evolução da malignidade e são constitutivamente expressas em lesões pré-malignas e invasivas. No entanto, nenhuma vacina foi licenciada ainda para uso terapêutico (GARBUGLIA *et al.*, 2020).

As vacinas terapêuticas podem ser desenvolvidas tanto como tratamento convencional quanto como um complemento à cirurgia para melhorar os resultados do tratamento e prevenir a recorrência. Existem diferentes tipos de vacinas terapêuticas contra o HPV que devem provocar melhores efeitos imunológicos, incluindo vacinas baseadas em vetores vivos, vacinas de proteína, vacinas de ácido nucleico e vacinas de células inteiras. O ponto de partida da maioria dessas vacinas é focado nos alvos antigênicos E6 e E7 e são projetadas para ativar a imunidade celular sistêmica e matar células infectadas pelo HPV por meio da resposta mediada por linfócitos T. No entanto, muitas vacinas que alcançaram resultados pré-clínicos satisfatórios não funcionam bem na clínica, e ainda há necessidade de otimizar os regimes de vacinas atuais e desenvolver novas vacinas (GARBUGLIA *et al.*, 2020; SMALLEY RUMFIELD *et al.*, 2020; YOUSEFI *et al.*, 2022).

2.11 Terapias utilizando tecnologia antisense

Os oligonucleotídeos antisense (ASOs) são oligonucleotídeos pequenos, de fita simples ou dupla, que foram quimicamente modificados para melhorar sua afinidade a sequências alvo, aumentar a resistência às nucleases, melhorar a farmacocinética e reduzir as respostas pró-inflamatórias. Várias modificações químicas foram desenvolvidas para terapias baseadas em RNA, podendo envolver mudanças na estrutura principal do fosforotioato, modificações na ribose, remodelação do anel ribose, modificações na base, modificações na extremidade da cadeia 5' ou 3' e modificações nos veículos de entrega. A estrutura nativa do DNA e do RNA, bem como as modificações estruturais aprovadas pela FDA para estratégias terapêuticas antisense estão representadas na Figura 7 (EGLI *et al.*, 2023; LAUFFER *et al.*, 2024; SHI *et al.*, 2024, SPARMANN *et al.*, 2023).

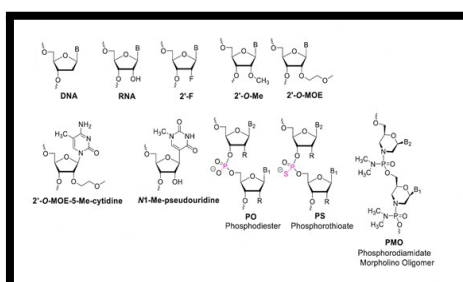


Figura 7. DNA nativo, RNA e modificações químicas que são aprovadas na terapêutica até o momento. Adaptado de EGLI *et al.* (2023).

Os ASOs podem se ligar ao seu transcrito de RNA alvo de uma maneira específica da sequência por meio do emparelhamento de bases Watson-Crick, podendo ser concebidos para atingir sequências distintas ou variantes genéticas específicas. Através desta ligação complementar, as moléculas podem alterar a expressão da proteína,

reduzindo a disponibilidade dos transcritos ou modificando o *splicing* do pré-mRNA, levando em última análise a uma redução, modificação ou restauração de uma proteína específica (LAUFFER *et al.*, 2024).

De acordo com seu mecanismo de ação, os ASOs podem ser divididos em oligonucleotídeos antisense *gapmer* (ASOs *gapmer*), pequenos RNAs de interferência (siRNAs) e ASOs de comutação de splice (ssASOs). Os dois primeiros promovem o *knockdown* do transcrito, enquanto o último grupo pode modular o *splicing* de pré-mRNA (LAUFFER *et al.*, 2024).

Até o momento, 15 oligonucleotídeos receberam autorização de comercialização em diferentes países (Tabela 2) e vários outros estão atualmente sendo testados em ensaios clínicos de fase I–III, com alguns próximos da aprovação no mercado. Apesar disso, ainda não há ensaios clínicos atuais para RNAs não codificantes em cânceres associados ao HPV (EGLI *et al.*, 2023; LU *et al.*, 2024)

Produto (empresa)	Alvo genético	Indicação	Administração
Casimersen (Sarepta Therapeutics)	Éxon 45 da distrofina (músculo)	Distrofia muscular de Duchenne	Subcutâneo
Eteplirsen (Sarepta Therapeutics)	Éxon 51 da distrofina (músculo)	Distrofia muscular de Duchenne	Intratecal
Fomivirsen (Ionis Pharmaceuticals)	CMV IE2	Infecção por citomegalovírus	Intravítreo
Givosiran (Alnylam Pharmaceuticals)	ALAS1	Porfirias hepáticas agudas	Subcutâneo
Golodirsen (Sarepta Therapeutics)	Éxon 53 da distrofina (músculo)	Distrofia muscular de Duchenne	Subcutâneo
Inclisiran (Novartis/Alnylam Pharmaceuticals)	PCSK9	Hipercolesterolemia	Subcutâneo
Inotersen (Ionis Pharmaceuticals)	TTR (fígado)	Amiloidose mediada por TTR	Subcutâneo
Lumasiran (Alnylam Pharmaceuticals)	Glycolate oxidase	Hiperoxalúria primária tipo 1	Subcutâneo
Mipomersen (Ionis Pharmaceuticals)	ApoB-100 (fígado)	Hipercolesterolemia	Subcutâneo
Nusinersen (Ionis Pharmaceuticals)	Intron 7 SMN2 (SNC)	Atrofia muscular espinhal	Intratecal
Patisiran (Alnylam Pharmaceuticals)	TTR siRNA	Amiloidose mediada por TTR	Intravenoso
Tofersen (Ionis Pharmaceuticals)	SOD1	Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA)	Intratecal
Viltolarsen (Viltepso)	Éxon 53 da distrofina (músculo)	Distrofia muscular de Duchenne	Intravenoso
Volanesoren (Ionis Pharmaceuticals / Akcea)	ApoC-III (fígado)	Síndrome de quilomicronemia familiar	Subcutâneo
Vuttrisirán (Alnylam Pharmaceuticals)	TTR (fígado)	Amiloidose mediada por TTR	Subcutâneo

Tabela 2. Oligonucleotídeos aprovados para comercialização (Fonte: EGLI *et al.*, 2023).

O número crescente de terapêuticas de ácidos nucleicos aprovadas demonstra o potencial para tratar doenças, visando os seus modelos genéticos *in vivo*. Os tratamentos convencionais geralmente induzem efeitos terapêuticos que são transitórios porque têm

como alvo proteínas e não causas subjacentes. Em contraste, a terapêutica com ácidos nucleicos pode alcançar efeitos duradouros ou mesmo curativos através da inibição, adição, substituição ou edição de genes (KULKARNI *et al.*, 2021).

2.12 Terapias baseadas em RNAi e sua aplicação como terapia contra HPVs

Diversas terapias antivirais de RNAi vem sendo desenvolvidas e testadas em ensaios clínicos com siRNAs - RNAs de fita dupla de 21 nucleotídeos com dois nucleotídeos despareados em cada extremidade 3' e funcionam suprimindo a expressão gênica através da degradação direta do mRNA do gene alvo no citosol (JUNG *et al.*, 2015; SALINAS-MONTALVO *et al.*, 2021).

Durante os estágios iniciais do desenvolvimento da terapêutica com siRNA, muitos agentes foram projetados com base em siRNA completamente não modificado ou ligeiramente modificado para chegar ao tecido apropriado e então silenciar o gene alvo. Estas moléculas podem mediar o silenciamento de genes *in vivo*, especialmente em tecidos que recebem administração local de medicamentos, por exemplo, olhos. No entanto, eficácia limitada e potenciais efeitos fora do alvo podem ser observados com estas modalidades (HU *et al.*, 2020).

Para solucionar esse problema, o surgimento de siRNAs quimicamente modificados, como siRNAs com substituição do 2'-OH por um grupo 2'-O-metil (2'-OMe) ou 2'-metoxietil (2'-MOE) ou a substituição de certos nucleotídeos por ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido nucleico desbloqueado (UNA) ou ácido nucleico glicol (GNA), melhorou a ativação imune inata imunoestimulatória conduzida por siRNA, ajudando a aumentar a atividade e a especificidade e a reduzir a toxicidade induzida (HU *et al.*, 2020).

As terapias com siRNA podem ser usadas contra todos os tipos de genomas virais, sejam eles DNA/RNA de fita dupla ou simples. Além disso, vários siRNAs podem ser usados simultaneamente para manter um efeito antiviral prolongado (QURESHI *et al.*, 2018).

A maioria das estratégias de terapia baseadas em RNAi desenvolvidas até o momento utilizam moléculas de RNAi direcionadas contra os genes E6 e/ou E7, obtendo de 50 a 80% de silenciamento. Porém, ainda não existe tratamento capaz de erradicar o HPV. Vale ressaltar que os siRNAs não apresentaram nenhum efeito prejudicial nas células controle, o que indica poucos efeitos fora do alvo e que o tratamento com siRNA tem o potencial de suprimir a progressão do câncer do colo do útero (JUNG *et al.*, 2015; QURESHI *et al.*, 2018).

Apesar desses resultados, a barreira mucosa e as alterações fisiológicas na vagina, como o pH e a espessura variável da camada epitelial durante o ciclo menstrual, servem como grandes obstáculos para a entrega eficiente e a absorção celular de siRNA. A fim de melhorar a entrega vaginal de siRNA, sistemas de nanotransportadores como sistemas de

entrega baseados em lipídios, sistemas macromoleculares, nanopartículas poliméricas, aptâmeros e peptídeos de penetração celular têm sido amplamente investigados. (BAXI *et al.*, 2020; JIANG *et al.*, 2002).

A razão para o sucesso dos siRNAs direcionados para E6 e/ou E7 está no acúmulo de TP53 e/ou pRB, eventualmente levando à indução de apoptose e/ou senescência em linhas celulares de câncer cervical provocado por HPV 16, bem como em células de câncer cervical humano positivas para HPV 18. Foi relatado anteriormente que o silenciamento de ambos E6/E7 produz maior atividade anticancerígena do que E6 sozinho. O uso combinado de siRNA com shRNA (siRNAs em grampo) direcionados para E6/E7 também apresenta resultados promissores (JUNG *et al.*, 2015; SALINAS-MONTALVO *et al.*, 2021).

Pode-se observar que apenas uma pequena parcela das estratégias existentes possui característica multi alvo e nenhuma utiliza RNA circular como parte da estratégia terapêutica. Diante disso, esta pesquisa apresenta uma alternativa promissora para terapia contra o câncer de colo do útero, baseada numa estratégia de silenciamento pós-transcricional de genes importantes para a oncogênese provocada pelo HPV, utilizando a tecnologia inovadora de RNA circular associada ao uso de siRNA.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos da pesquisa

Este projeto é dispensado de apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) com seres humanos baseado nos termos da RESOLUÇÃO Nº 466, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2012. Também é dispensado de apreciação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) de acordo com a Lei nº 11.794/2008 e Resoluções Normativas CONCEA nº 01/2010 e 06/2012.

O objeto de estudo não se enquadra nas características de Organismos Geneticamente Modificados (OGM) segundo o Art 3, Inciso V da LEI Nº 8.974, DE 5 DE JANEIRO DE 1995, que define OGM como: “Organismo geneticamente modificado - OGM: organismo cujo material genético – ADN/ARN tenha sido modificado por qualquer técnica de engenharia genética;”, sendo assim, não há necessidade de obtenção do Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB) junto à Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) para o laboratório onde serão executados os experimentos.

O presente estudo utiliza duas estratégias de RNAi:

- A. Moléculas de siRNA que possam interagir com os RNAm dos genes E6 e E7 de HPV 16 e HPV 18 (LI, *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2018; TANG *et al.*, 2013);
- B. Um RNA circular (circRNA) contendo sequências complementares a miRNAs com relação causal com lesões cervicais. As sequências de miRNAs foram obtidas a partir dos bancos de dados miRDB (disponível em: <http://mirdb.org/>) e TarBase (disponível em: <https://carolina.imis.athena-innovation.gr/>), onde também foi possível verificar outros possíveis alvos dos miRNAs selecionados.

Apesar de não terem sido sintetizadas neste estudo, também foram desenhadas sequências de shRNA que poderão ser utilizadas posteriormente para construção de sistemas de RNAi com expressão no hospedeiro, como os baseados em vetores virais.

Foi realizada uma busca nas bases de dados de patentes do INPI e do Google Patentes, utilizando os termos “HPV” e “RNAi”, para verificar a existência de patentes registradas no Brasil envolvendo terapias de RNAi contra HPV.

3.2 Desenho, ranqueamento e seleção de RNAi

As sequências codificadoras de RNAi para silenciamento de E6 e E7 de HPV 16 e HPV 18 utilizadas neste estudo foram desenhadas de acordo com os processos a seguir:

- A) As sequências dos transcritos do gene alvo foram obtidas no *GenBank* do NCBI e alinhadas utilizando a ferramenta MUSCLE. Em seguida, foi gerada uma sequência consenso desse alinhamento, adicionando um "X" em todos os sítios contendo variação de nucleotídeos. O alinhamento foi analisado utilizando as ferramentas do software MEGA X, onde foi possível estimar os percentuais de nucleotídeos, analisar a diversidade genética e inferir sobre a existência de seleção natural em cada gene analisado (KUMAR *et al.*, 2018; EDGAR, 2004);
- B) A sequência consenso foi analisada pelo site <http://sidirect2.rnai.jp>, que verifica as regiões que podem ser alvo de RNAi e propõe sequências de siRNAs que podem reconhecer essas regiões alvo. Os parâmetros utilizados para configurar a busca dos alvos consistiram em (UI-TEI *et al.*, 2008; NAITO *et al.*, 2012):
- I) Atender a pelo menos uma das regras de Ui-Tei, Reynolds e/ou Amarzguioui (predominância de A ou T próximo da extremidade 5'; predominância de G ou C próximo da extremidade 3'; percentual de G ou C inferior a 50%; extremidade 3' sem A ou T; extremidade 5' sem G ou C; ausência de repetições internas);
 - II) Temperatura máxima permitida para a região *seed* igual a 21,5 °C;
 - III) Percentual de GC entre 30 e 50%;
 - IV) Sequência WWSNNNNNNNNNNNNNNNSNN (W significa possibilidade de A ou T no sítio, S significa possibilidade de C ou G e N significa qualquer nucleotídeo) adotada como padrão para os alvos;
- C) As sequências de DNA alvo com seus respectivos siRNAs propostos, o percentual de GC da passageira e da guia de cada siRNA e a temperatura da sequência guia na região *seed*, gerados pelo site <http://sidirect2.rnai.jp>, foram salvos numa planilha no formato .xls;
- D) Adicionalmente, foi gerada uma molécula de shRNA a partir de cada par passageira/guia da planilha gerada na etapa anterior, adicionando um loop "UUCAAGAGA" entre as duas sequências e salvando também na mesma planilha .xls (MCINTYRE *et al.*, 2006, YU *et al.*, 2002);
- E) Todas as sequências guias e passageiras foram analisadas separadamente no site <https://www.genscript.com/tools/sirna-target-finder>, que realiza um *screening* de todos os possíveis alvos em *Homo sapiens* dessas sequências, nos permitindo verificar possíveis efeitos fora do alvo (off-targets);
- F) Os resultados do *screening* dos *off-targets* foram adicionados à planilha .xls gerada anteriormente.

As sequências de siRNA desenhadas foram ranqueadas e selecionadas considerando o menor valor de temperatura da *seed* da sequência guia e a inexistência de

sequências alvo em *Homo sapiens* indesejadas. As sequências dos shRNA relacionados com os siRNA selecionados foram submetidas a predição de estrutura pela ferramenta RNAfold (disponível em <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin>).

3.3 Desenho e síntese de circRNA

O circRNA foi sintetizado a partir de uma sequência de DNA codificadora pré-sintetizada. O DNA codificador apresenta três regiões:

- A. Um promotor do fago T7;
- B. 3 cópias de sequências parcialmente complementares aos miRNAs alvos apresentando pareamento imperfeito de 4 nucleotídeos entre os sítios 9 a 12 e separadas por sequências espaçadoras e sítios de restrição;
- C. um sítio de término da transcrição do fago T7.

O DNA codificador foi fornecido na forma recombinante em vetor pUC19, a partir do qual foram realizadas PCRs para amplificação de cópias, seguidas de transcrição *in vitro* com *RiboMAX™ Large Scale RNA Production System*, para gerar uma molécula de RNA linear seguindo as especificações do fabricante (CHEN *et al.*, 2021; LAVENNIAH *et al.* 2020).

Todos os sítios de restrição utilizados no desenho do circRNA foram selecionados com auxílio das ferramentas NEB Cutter 2.0 (disponível em: <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>), para verificar a existência de sítios nas construções, e Enzyme Finder (disponível em <https://enzyme finder.neb.com/>) para verificar se as enzimas escolhidas possuíam condições de trabalho similares (temperatura de incubação a 37°C e inativação por calor).

3.4 Desenho de iniciadores

Os iniciadores utilizados para a síntese de cDNA e PCR realizadas durante este estudo foram desenhados com o auxílio das ferramentas OligoAnalyzer (disponível em <https://www.idtdna.com>), calculadora de T_m (disponível em <http://insilico.ehu.es/tm.php?formula=basic>), Primer3 (disponível em <https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0>), PerlPrimer, BioEdit 7.5.0.3, MUSCLE e BLAST Primer, nos quais utilizou-se os parâmetros (ALTSCHUL *et al.*, 1997; EDGAR, 2004; MARSHALL, 2004):

- A. 18 a 21 nt;
- B. Temperatura de Melting (T_m) de 50-60°C;
- C. Percentual de GC entre 40 e 60% evitando sequências de 4 G consecutivas;
- D. 0,2 uM de primer;
- E. 50 mM de Na;

- F. 1,5 mM de Mg;
- G. 0,2 mM de dNTP;
- H. GC na extremidade 3' e estabilidade termodinâmica.

3.5 Cultivo das linhagens celulares

Para a transfecção foram utilizadas as linhagens celulares HeLa (isolada de epitélio cervical de uma paciente de 31 anos com carcinoma cervical provocado por HPV 18), Caski (isolada de epitélio cervical de uma paciente de 40 anos de idade com carcinoma provocado por HPV 16) e C-33A (isolada de epitélio cervical de uma paciente de 66 anos com carcinoma cervical provocado por mutação do gene da proteína RB1).

As linhagens celulares HeLa e C-33A foram adquiridas junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro (códigos BCRJ 0100 e 0348, respectivamente). Já a linhagem Caski foi cedida gentilmente pelo professor Dr. Toni Ricardo Martins, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas (FCF/UFAM).

Ao serem adquiridas, foi realizada análise e caracterização morfológica, análise de confluência e troca de meio de cultura. Após as análises iniciais de caracterização morfológica e comportamental, foi realizada a criação do *master bank* com a criopreservação de criotubos em nitrogênio líquido, contendo $\sim 10^6$ células em 1 mL de solução de congelamento composta por 95% de soro fetal bovino e 5% de Dimetilsulfóxido (DMSO).

As células HeLa e C-33A de manutenção são cultivadas como descrito no *Datasheet* do BCRJ: HeLa é cultivada em Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) com 2 mM de L-glutamina, 1.000 mg/L de glicose e 10% de soro fetal bovino e C-33A é cultivada em meio DMEM com 2 mM de L-glutamina e 10% de soro fetal bovino. Já a célula Caski de manutenção é cultivada como descrito no *Datasheet* da coleção ATCC (código ATCC CRL-1550), em meio RPMI 1640 com 2 mM de L-glutamina, 4,5 g/L de glicose e 10% de soro fetal bovino.

Todas as linhagens de manutenção são cultivadas nas condições de 5% de dióxido de carbono (CO_2), 95% de ar e temperatura à 37°C , sendo monitoradas diariamente observando a confluência, morfologia, necessidade de troca ou adição de meio de cultura e subcultivos.

3.6 Ensaio de transfecção dos RNAi

Para a transfecção dos RNAi, as linhagens celulares foram cultivadas em placas de 24 poços com meio apropriado, constituído de acordo com o descrito no item 3.5, nas condições de 5% de dióxido de carbono (CO_2), 95% de ar e temperatura à 37°C até atingirem de 60-80% de confluência e 2×10^5 células.

Inicialmente, foram diluídos 6 μL de *Lipofectamine*® *RNAiMAX Reagent* (Invitrogen®) em 100 μL de *Opti-MEM*® *Medium* (Invitrogen®), depois diluiu-se 2 μL dos RNAi (20 pmol) separadamente em 100 μL de *Opti-MEM*. Em seguida, o complexo *Lipofectamine*/*Opti-MEM* foi misturado com o complexo RNAi/*Opti-MEM* e então incubado por 5 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, 50 μL do complexo RNAi/*Lipofectamine* foi adicionado às linhagens celulares e incubado a 37°C por até 72 horas, com trocas periódicas do meio, de acordo com o esquema da Figura 8.

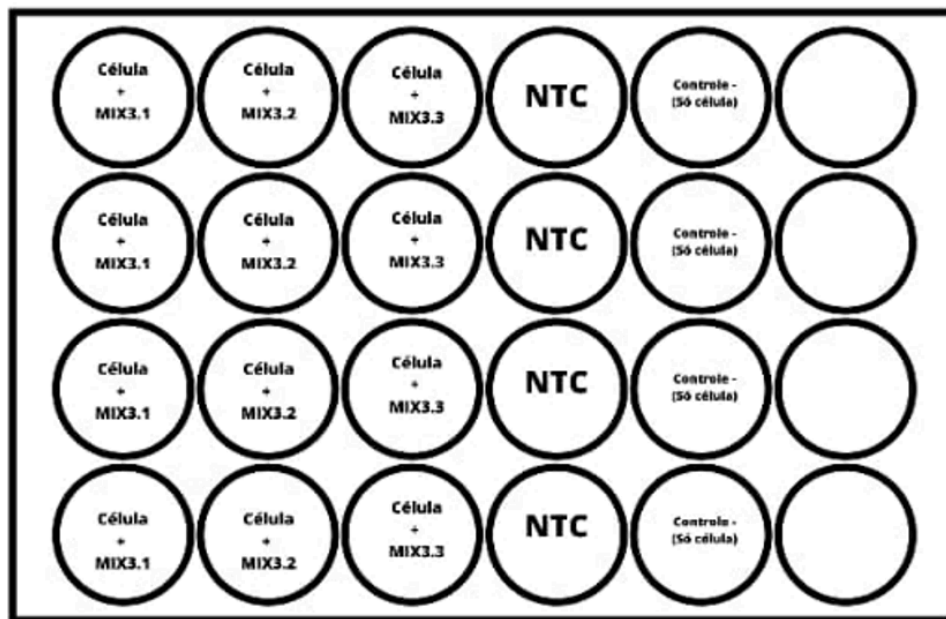


Figura 8. Esquema de montagem da placa para bioensaio com células HeLa. MIX3.1 corresponde a lipofectamina + RNAi (5 pmol); MIX3.2 corresponde a lipofectamina + RNAi (10 pmol); MIX3.3 corresponde a lipofectamina + RNAi (20 pmol); NTC corresponde a célula + lipofectamina.

3.7 Extração e quantificação de RNA

Como o sistema de transfecção demora mais de 24 horas para interagir com as células alvos, o RNA total só foi extraído de cada cultura celular após 48 e 72 horas, utilizando solução *TRIzol*® *Reagent* (Invitrogen) para cada 250 μL de amostra, seguindo as recomendações do fabricante. As amostras foram então quantificadas por fluorimetria em Qubit® 2.0 Fluorometer (Life Technologies), também de acordo com as instruções do fabricante, descartando-se amostras com massa de RNA menor que 20ng.

3.8 Síntese de cDNA

A síntese dos cDNAs a partir dos mRNAs alvos (E6 e E7) foi realizada com 20ng do RNA total em um volume final de reação para 20 μL (10 μL de sistema de reação + 10 μL de amostra), com a utilização de iniciadores randômicos e do kit *SuperScript IV Reverse Transcriptase* (Thermo Fisher Scientific) de acordo com os procedimentos do fabricante.

O processo de síntese do cDNA a partir dos miRNAs alvos foi realizada utilizando o kit *TaqMan*® *MicroRNA Reverse Transcription* (Life, Technologies), que adicionou às

moléculas de miRNA o *Stem-Loop Universal miRNAs* (um iniciador universal com sequência 5'-**GAAAGAAGGCGAG**GAGCAGATCGAGGAAGAAGACGGAAGAATGTGCGT**CTCGCCTTCTTTCNNNNNNNNN**-3', o qual, por sua vez, ligou-se a todos os ácidos nucleicos de fita simples do sistema). Em seguida, os cDNAs gerados foram submetidos a uma PCR com iniciadores *forward Taqman miRNA Assay* (Applied Biosystems, CA, USA), que possuem sequência equivalente aos miRNAs alvos e iniciadores *reverse* complementares à região *Stem-Loop* (Figura 9).

Reagente	Volume (µL)
Tampão RT 10X	2,0
Mix dNTP 25X (100mM)	0,8
Primers RT 10X	2,0
RT Superscript	1,0
Água livre de RNase	3,2
Inibidor de RNase	1,0
Subtotal	10,0
Total (com RNA)	20,0

Figura 9. Esquema de montagem do sistema para reação da transcriptase reversa.

Todos os sistemas de síntese de cDNA por reação da transcriptase reversa utilizaram o esquema da Figura 9. O sistema foi então levado ao termociclador, onde inicialmente ocorreu o pareamento dos iniciadores ao RNA a 25°C por 10 minutos. Em seguida, o sistema foi aquecido a 37°C por 120 minutos, para permitir a ação da enzima transcriptase reversa. A inativação da enzima ocorreu a 85°C por 5 minutos. Após esse tempo, o sistema foi incubado a 4°C até a retirada do aparelho.

3.9 Análise da expressão de E6 e E7 por qPCR

Antes da qPCR, o cDNA foi quantificado por fluorimetria em *Qubit® 2.0 Fluorometer* (Life Technologies), de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação de cDNA por fluorimetria é realizada em comparação entre a intensidade da fluorescência da amostra com uma solução de DNA de concentração conhecida. A partir dos resultados obtidos, foram realizadas diluições individualizadas para que os produtos apresentassem concentrações iguais a 1ng/µL.

As qPCRs foram realizadas em triplicatas com o *SYBR® Green qPCR Super Mix*, de acordo com recomendações do fabricante. O esquema de volumes utilizado para as reações de qPCR consistiu em: 1,0 µL de amostra + 5,0 µL de cada iniciador (10 pmol/µL) + 10 µL de *SYBR® Green qPCR Super Mix* + 8 µL de água destilada e deionizada.

As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 95°C por 15 min, seguidos de 35 ciclos a 55°C por 30 segundos e 70°C por 30 segundos para anelamento e extensão, com extensão final a 72°C por 1 min.

As quantidades relativas de expressões dos RNAs alvos foram comparadas após a normalização com os valores do mRNA de referência (RNAm do gene endógeno de RNA nuclear pequeno U6). Para isso, o ΔCt de cada amostra foi calculado a partir da diferença entre a média de Ct da amostra e a média de Ct da amostra correspondente à amplificação do gene endógeno sem tratamento.

A partir desse valor de ΔCt , foi então calculado o valor de $\Delta\Delta Ct$ de cada amostra, o qual consiste na diferença entre o ΔCt da amostra e o ΔCt da amostra correspondente à amplificação do gene alvo sem tratamento. Em seguida, o valor do $\Delta\Delta Ct$ foi utilizado para estimar o valor relativo da expressão de cada amostra com relação ao gene alvo sem tratamento através do cálculo $1,9^{-\Delta\Delta Ct}$. Por fim, este valor foi convertido em porcentagem e subtraído de 100% para determinar o percentual de *knockdown* do RNAi sobre o gene alvo.

3.10 Teste de citotoxicidade celular

O efeito silenciador do RNAi sobre as células utilizadas foi estimado pela análise da morfologia celular antes e depois da transfecção através de microscópio biológico invertido óptico trinocular KASVI, modelo K55-IVT, e pela análise da expressão do RNAm do gene endógeno de RNA nuclear pequeno U6, envolvido na formação do *spliceossomo*.

Além disso, também foi utilizado o método colorimétrico baseado na redução do sal MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio) ao seu derivado formazan, de cor roxa, pelo metabolismo mitocondrial. As células foram semeadas em 100 μ L de DMEM contendo 10% SFB em uma placa de 24 poços (5×10^3 células/poço) e incubadas por 24 horas. Os RNAi foram adicionados com meio fresco com 10% SFB e a viabilidade celular foi avaliada após 48 horas.

Foram utilizadas como controles negativos linhagens celulares não transfectadas (amostras C-) e linhagens expostas somente à lipofectamina (amostras NTC). Após o tempo de incubação, o sobrenadante foi removido e adicionado ao meio de cultura 10% (v/v) de MTT (5 mg/mL em PBS). Após 3h de incubação a 37°C, o sobrenadante foi novamente removido e os precipitados formados em cada poço foram dissolvidos em 100 μ L de DMSO. Cada poço foi medido a leitura da absorbância a 540 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem (%) em relação às amostras C- (Concentração de Inibição, IC).

3.11 Análise estatística

Os dados foram apresentados como média de grupo $\pm$ desvio padrão (DP). A normalidade para os resultados em todas as medidas foi testada usando o critério Shapiro-Wilk, $p > 0,05$. Para as comparações entre o grupo tratado e o não tratado, com medidas normais, foi utilizado o Teste T para amostras independentes, para amostras com distribuição não normal, foi utilizado o teste de Mann-Whitney, aplicado para grupos amostrais pequenos e amostras com variáveis categóricas (RSTUDIO TEAM, 2021).

Para a comparação longitudinal da transfecção dos RNAs, foi utilizado o teste de ANOVA de medidas repetidas, nas medidas normais e o seu equivalente Teste de Friedman nos dados não paramétricos, em ambos os testes, ao serem verificadas diferenças estatísticas entre os momentos, foi aplicado um teste Post-hoc. As análises estatísticas foram realizadas utilizando a plataforma estatística Rstudio 4.0.2 (RSTUDIO TEAM, 2021).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese de sequências para RNAi

4.1.1 Desenho, seleção e síntese de siRNA e shRNA

Para o desenho de siRNA e shRNA, foi desenvolvido um *workflow* com base na linguagem de programação Python versão 3.10.5 utilizando as bibliotecas Biopython (para reconhecimento, edição e análise de sequências de ácidos nucleicos e proteínas), *Selenium* (para interação automatizada com sites), *Beautifulsoup* (para extração de dados a partir de sites) e *Pandas* (para criação e edição de planilhas com os resultados das buscas realizadas pelo algoritmo). O código completo do *workflow* encontra-se disponível em <https://github.com/DatDarkAlpaca/shRNA> e registrado no INPI com o Processo N°. BR512023003837-7 (ANEXO 8.1). A descrição detalhada do algoritmo encontra-se disponível no ANEXO 8.2 e a Figura 10 representa o fluxo operacional do algoritmo.

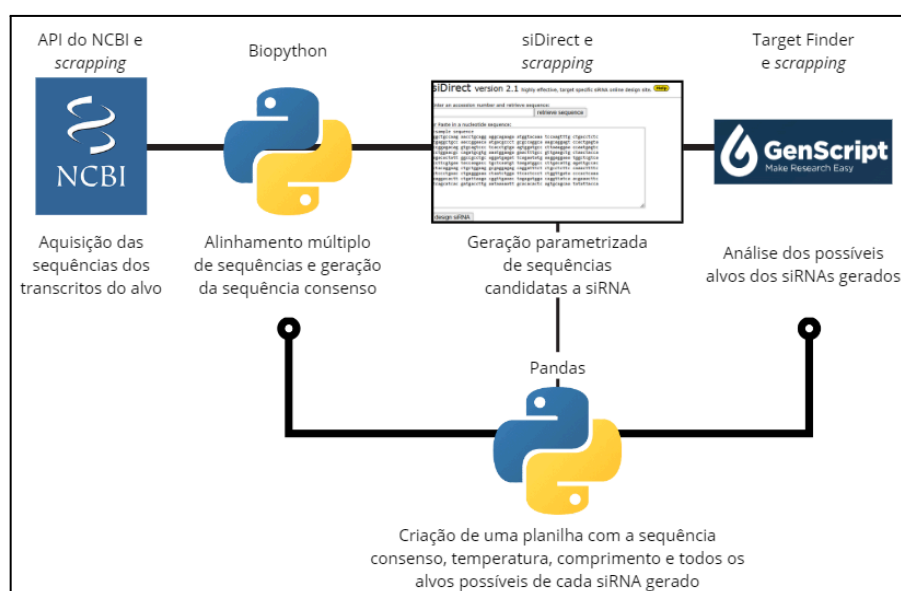


Figura 10. Fluxo operacional do workflow para desenho de RNAi.

A partir de um arquivo no formato fasta contendo todos os transcritos possíveis de um gene alvo ou do número ID do *GenBank* (no caso de um gene humano), ambos fornecidos pelo usuário, o algoritmo recupera as sequências dos transcritos do *GenBank* e faz o *download* do arquivo fasta a ser utilizado no alinhamento múltiplo de sequências e na criação da sequência consenso a ser utilizada na análise de possíveis alvos.

Existem dados robustos de que as variantes do HPV 16 influenciam a persistência, progressão para pré-câncer, desenvolvimento do câncer e tipo histológico de câncer do colo do útero. A maioria dos estudos implica as linhagens não europeias como sendo mais patogênicas em comparação com os isolados da linhagem Europeia. Com base nisso, o desenho dos siRNAs, shRNAs e dos iniciadores para E6 e E7 de HPV 16 e HPV 18 foi

realizado considerando-se a sequência consenso gerada a partir de genomas representativos das variantes desses tipos virais. Os genomas K02718, AF536179, HQ644236, AF534061, AF536180, HQ644298, AF472509, HQ644257, AY686579 e AF402678 foram utilizados para gerar a sequência consenso de E6 e E7 de HPV 16. Já os genomas AY262282, EF202146, EF202147, EF202151, GQ180787, EF202155, KC470225, EF202152 e KC470229 foram utilizados para gerar a sequência consenso de E6 e E7 de HPV 18 (BURK *et al.*, 2013).

A eficácia do *workflow* e as sequências geradas por ele foram analisadas *in silico* pelo cálculo do tempo de execução do algoritmo e pela verificação da presença de sequências completas ou parciais de siRNAs com patente registrada na base do INPI (<https://www.gov.br/inpi/pt-br>). O algoritmo do *workflow* analisou as sequências de E6 e E7 das variantes de HPV 16 e de HPV 18, com base no estudo de BURK *et al* (2013), produzindo as sequências consenso descritas no ANEXO 8.3 e os resultados esperados conforme descrito na Tabela 3.

Alvo	siRNAs propostos	siRNAs com off-target	Tempo de execução manual	Tempo de execução com o algoritmo
E6 de HPV 16	9	5	3 horas	1 min e 18 seg
E7 de HPV 16	3	1	1 hora	42 seg
E6 de HPV 18	10	3	3 h 20 min	1 min 7 seg
E7 de HPV 18	5	3	1 h 40 min	1 min e 48 seg

Tabela 3. Perfil da análise de E6 e E7 de HPV 16 e HPV 18 para desenho dos siRNAs utilizados neste estudo.

Como pode-se deduzir a partir da Tabela 3, o tempo decorrido na execução do algoritmo para gerar os resultados representou uma economia considerável do tempo de trabalho (aproximadamente 98,94%), tendo em vista que a análise manual de cada alvo dura cerca de 20 minutos. Vale ressaltar que todos os resultados da Tabela 3 foram obtidos utilizando a mesma máquina.

A busca nas bases de patentes encontrou 107.600 registros no Google Patentes e 77 registros no INPI. Tais registros foram então classificados em 4 grupos: diagnóstico (17.954 registros), moléculas sem aplicação explícita (33.398 registros), tratamento (43.240 registros) e vacina (13.085 registros) (Figura 10). Dos 77 registros da base do INPI, somente 3 apresentavam tecnologia baseada em RNAi e, destas, somente 2 apresentavam RNAi direcionado para o tratamento de lesões causadas pelo HPV (patentes de número “BR 11 2015 002177 8” e “PI 0709147-8”). A patente “BR 11 2015 002177 8” apresenta 113 sequências de siRNA para silenciamento de E6 e E7 de HPV 16 e HPV 18. Já a patente “PI 0709147-8” apresenta 88 siRNA para silenciamento de E6 de HPV 16, totalizando 201 alvos.

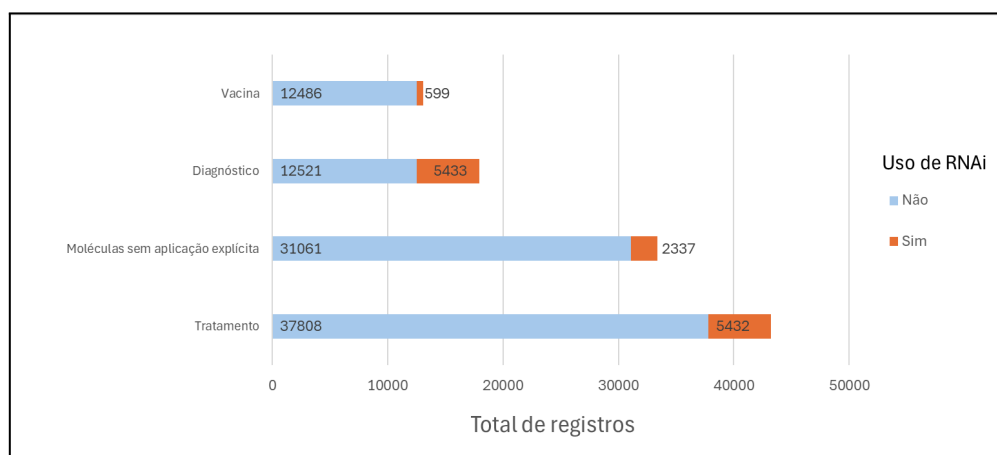


Figura 11. Resultado da busca por patentes registradas no INPI e no Google Patentes com os termos “HPV” e “RNAi”.

Os 27 alvos sugeridos pelo algoritmo do *workflow* foram comparados com os 201 alvos descritos pelas patentes “BR 11 2015 002177 8” e “PI 0709147-8”, onde foi possível observar que 5 alvos do *workflow* (3 para E6 de HPV 16, 1 para E6 de HPV 18 e 1 para E7 de HPV 16) apresentaram correspondência com 41 sequências descritas na patente “BR 11 2015 002177 8”. Porém, essas 41 correspondências apresentaram redundâncias nas sequências do algoritmo (algumas sequências da patente apresentaram semelhança com mais de uma sequência obtida pelo algoritmo). Com relação à patente “PI 0709147-8”, observou-se que 7 alvos sugeridos pelo algoritmo apresentaram 14 correspondências entre os 88 alvos descritos na referida patente para E6 de HPV 16 (Figura 12).

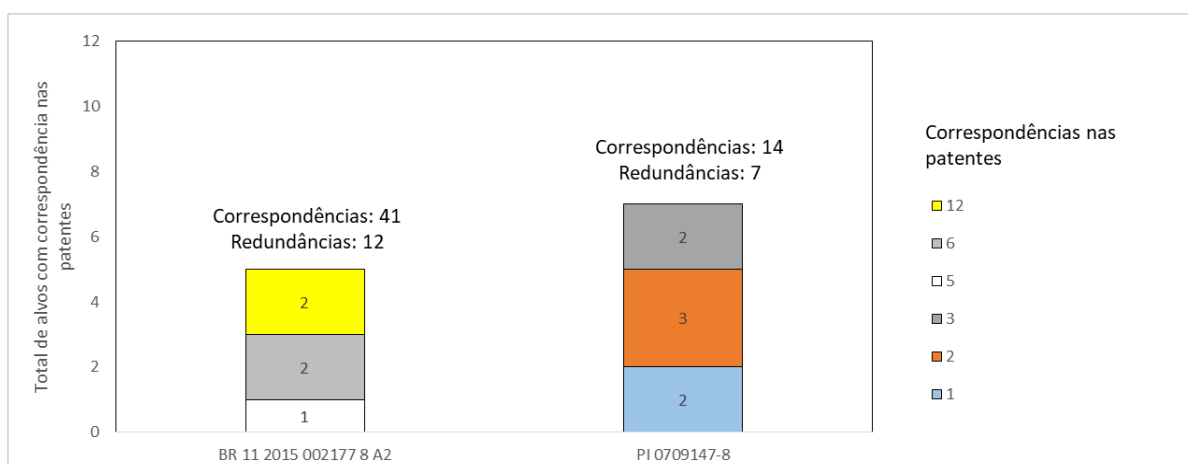


Figura 12. Análise comparativa entre os alvos propostos e os alvos descritos pelas patentes registradas no INPI.

As divergências entre as sequências desenhadas pelo *workflow* desenvolvido nesse estudo e as sequências patenteadas sugerem diferenças nos parâmetros adotados em cada estudo. Contudo, os testes *in vitro* mostraram que os parâmetros adotados no presente estudo são eficazes no silenciamento dos alvos (NAITO *et al.*, 2012).

A Tabela 4 apresenta a análise dos desenhos de siRNA selecionados para os genes E6 e E7 de HPV 16 e E6 e E7 de HPV 18, respectivamente. Nenhuma das sequências escolhidas apresentou *Off-target* em *Homo sapiens* nem correspondência total ou parcial com sequências já patenteadas no Brasil.

siRNA	GC passageira	<i>Off-targets</i> para a passageira	Tm Guia	GC Guia	<i>Off-targets</i> para a guia
HPV16E6.7	15,79%	0	6.9 °C	19,05%	0
HPV16E7.2	36.84%	0	19 °C	38.1%	0
HPV18E6.7	21.05%	0	-7.5 °C	23.81%	0
HPV18E7.2	36.84%	0	18.8 °C	42.86%	0

Tabela 4. siRNA gerados para os genes E6 e E7 de HPV 16 e HPV 18.

A Figura 13-A apresenta as sequências dos siRNAs selecionados, destacando-se as fitas guias, fitas passageiras e sequências *seed*. Todos os siRNAs sintetizados nesse trabalho apresentaram nucleotídeos com modificações O-metil nas posições 7 e 17. As estruturas tridimensionais dos shRNA selecionados estão representadas na Figura 13-B, observou-se que as fitas passageiras ligaram-se às guias formando a estrutura em grampo esperada e que a extremidade 3' da fita guia apresenta dois nucleotídeos despareados, conforme esperado. Os valores de energia livre são favoráveis para a formação espontânea das quatro estruturas (EGLI *et al.*, 2023).

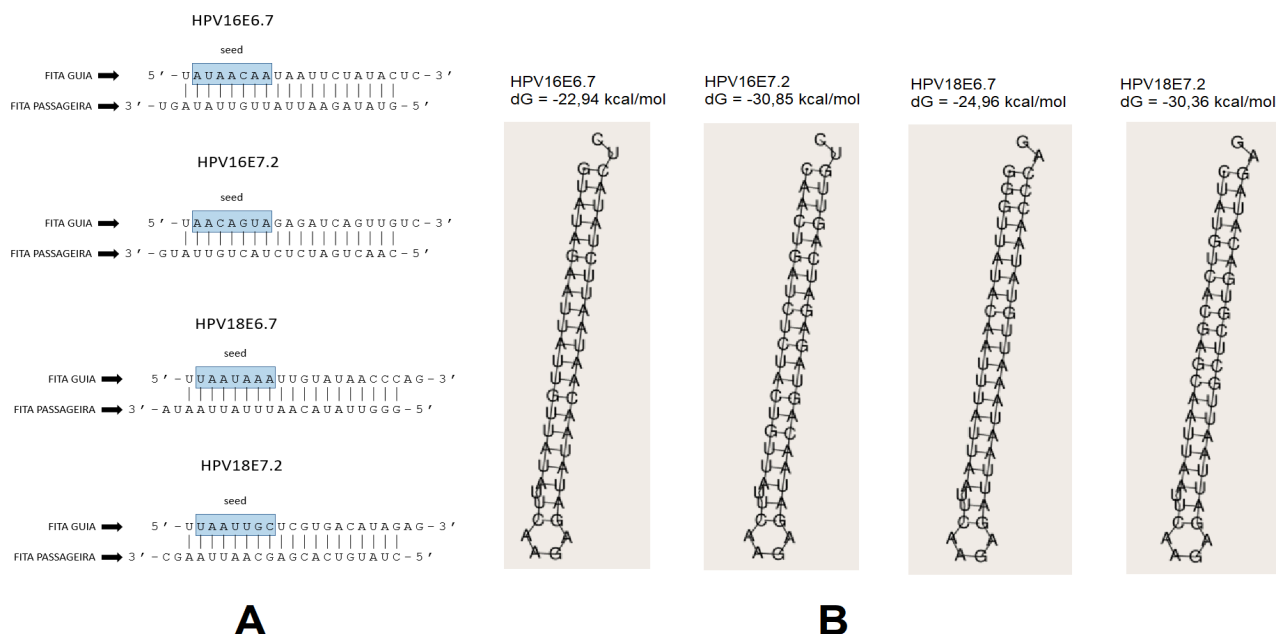


Figura 13. Predição das estruturas tridimensionais dos siRNA (A) e shRNA (B) selecionados. As sequências destacadas em azul representam as sequências *seed* dos siRNAs. Os valores de dG apresentados para as sequências de shRNAs, correspondem à energia livre necessária para possibilitar a formação de cada estrutura.

As aplicações do RNAi podem ser mediadas por dois tipos de moléculas; o RNA interferente pequeno de fita dupla sintetizado quimicamente (siRNA) ou RNA em gancho curto baseado em vetor (shRNA). Ambas estratégias estão sendo consideradas pelo algoritmo desenvolvido, que adota parâmetros baseados no estudo de NAITO *et al.* (2012) para o desenho dos siRNA e shRNA. Os siRNAs podem mimetizar o efeito dos miRNAs no citoplasma promovendo o silenciamento gênico. Já os shRNAs, utilizando a maquinaria de processamento endógeno, permitem alta potência e efeitos sustentáveis com baixos números de cópias, resultando em menos efeitos *off target*, o que foi relevante para considerar-se também essa estratégia para futuros testes. Além disso, diversos estudos apontam para a eficácia de shRNAs com o loop “UUCAAGAGA” no silenciamento mediado por RNAi (RAO *et al.*, 2009; MCINTYRE *et al.*, 2006, YU *et al.*, 2002).

4.1.2 Desenho e síntese de circRNA

A pesquisa nas bases de dados miRDB e TarBase revelou que os miRNAs hsa-miR-155-5p, hsa-miR-21-5p e hsa-miR-182-5p estão envolvidos em diversas vias importantes no desenvolvimento de lesões cervicais, o que pode ser confirmado nos estudos de LI *et al.* (2019), SANTOS *et al.* (2018), TANG *et al.* (2013) e LAVENNIAH *et al.* (2020). Os sítios de restrição foram selecionados para permitir posteriores manipulações com vetores virais baseados em adenovírus.

De acordo com LI *et al.* (2019), o miR-155-5p regula de forma inibitória a TP53INP1, que contribui com a ativação de TP53 e regula positivamente a apoptose e a autofagia. A expressão induzida do hsa-miR-155-5p contribui para o crescimento, migração e capacidade de invasão de células de câncer cervical *in vitro*.

SANTOS *et al.* (2018) relatam que o MiR-21-5p é significativamente superexpresso em carcinoma cervical invasivo pela oncoproteína HPV 16 E7, promovendo a proliferação e invasão celular através da redução da expressão da proteína ativadora 1 de p21 (RASA1), que auxilia o controle da proliferação e diferenciação celular.

TANG *et al.* (2013) sugerem que a inibição do hsa-miR-182-5p poderia exercer o efeito de regressão do crescimento tumoral e relatam que hsa-miR-182-5p foi significativamente elevado no carcinoma cervical primário, apresentando correlação significativa entre o aumento da sua expressão e estágios avançados de câncer cervical. o hsa-miR-182-5p regula o fator de transcrição FOXO1, que participa do crescimento e diferenciação celular. As proteínas FOX são consideradas supressores de tumor em virtude de suas funções estabelecidas na parada do ciclo celular, senescência, apoptose, diferenciação, reparo de danos ao DNA e eliminação de espécies reativas de oxigênio

A composição do RNA circular foi baseada no estudo de LAVENNIAH *et al.* (2020), que demonstraram que a atividade esponja do RNA circular melhora com a utilização de espaçadores de 12 nucleotídeos e com inserção de mais de uma cópia imperfeita (com desapareamento entre as bases 9 e 12) das sequências complementares aos miRNAs alvos.

Tais estudos foram determinantes para a inclusão das sequências complementares a esses miRNAs no RNA circular, que apresenta 3 cópias imperfeitas (com desapareamento entre as bases 9 e 12) das sequências complementares aos miRNAs alvos. Além das sequências complementares dos miRNAs mencionados, o RNA circular também apresenta espaçadores e sítios de restrição conforme mostrado na Tabela 5. Os espaçadores localizados entre as sequências complementares aos miRNAs apresentam 12 nucleotídeos de comprimento.

Identificação da sequência	Sequência
ESP1	TCAGATTCACGT
ESP2	CATCCGATAGTT
ESP3(AflII)	GGGCTTAAGGGG
ESP4	ATCCCTTAGTAG
ESP5	CACTCTGAGATT
ESP6(SphI)	GGGGCATGCGGG
ESP7	GCCTATACTTAG
ESP8	AATCCCTGAGTT

Tabela 5. Composição das sequências dos espaçadores com os respectivos sítios de restrição, quando presentes.

A sequência do DNA ponte e das regiões complementares aos miRNAs estão representadas na Tabela 6. A temperatura de *melting* do DNA ponte foi prevista pela ferramenta *Tm Calculation* equivalente a 54,9°C. As sequências das regiões complementares aos miRNAs foram analisadas utilizando a ferramenta SSEARCH disponível no banco de dados miRBase (<https://www.mirbase.org/index.shtml>). As sequências detalhadas da estrutura linearizada do circRNA são apresentadas no ANEXO 10.4.

demonstrando completa correspondência entre as sequências alinhadas, a partir do sítio 360 do alinhamento.

	
	325 335 345 355 365 375 385 395
W040782_S032244-02_M13R-88	GGGTTTCCC AGTCACGACG TTGTAAACG ACGGCCAGTC TAGAATTCGA GCTCAAAGTG CTGAGATTAC AGGCGTGAGC
circrna2	-----C TAGAATTCGA GCTCAAAGTG CTGAGATTAC AGGCGTGAGC
	
	405 415 425 435 445 455 465 475
W040782_S032244-02_M13R-88	CACCAACCCC CGGCCGGCGC GCCTAATACG ACTCACTATA GGGCGCGCCA ACCCTATCA CTGGAGCATT AATCAGATTC
circrna2	CACCAACCCC CGGCCGGCGC GCCTAATACG ACTCACTATA GGGCGCGCCA ACCCTATCA CTGGAGCATT AATCAGATTC
	
	485 495 505 515 525 535 545 555
W040782_S032244-02_M13R-88	ACGTTCAACA TCAGGGAATA AGCTACATCC GATAGTTAGT GTGAGTTCTT TTTTGCCAAA GGGCTTAAGG GGTCAACATC
circrna2	ACGTTCAACA TCAGGGAATA AGCTACATCC GATAGTTAGT GTGAGTTCTT TTTTGCCAAA GGGCTTAAGG GGTCAACATC
	
	565 575 585 595 605 615 625 635
W040782_S032244-02_M13R-88	AGGGAATAAG CTAATCCCTT AGTAGAGTGT GAGTTCTTTT TTGCCAAACA CTCTGAGATT AACCCCTATC ACTGGAGCAT
circrna2	AGGGAATAAG CTAATCCCTT AGTAGAGTGT GAGTTCTTTT TTGCCAAACA CTCTGAGATT AACCCCTATC ACTGGAGCAT
	
	645 655 665 675 685 695 705 715
W040782_S032244-02_M13R-88	TAAGGGGCAT GCGGGAGTGT GAGTTCTTTT TTGCCAAAGC CTATACTTAG AACCCCTATC ACTGGAGCAT TAAATCCCT
circrna2	TAAGGGGCAT GCGGGAGTGT GAGTTCTTTT TTGCCAAAGC CTATACTTAG AACCCCTATC ACTGGAGCAT TAAATCCCT
	
	725 735 745 755 765 775 785 795
W040782_S032244-02_M13R-88	GAGTTTCAAC ATCAGGGAAT AAGCTACCAT GGGGCCGGGG GGTGGTGGCT CACGCTGTA ATCTCAGCAC TTAATAAAC
circrna2	GAGTTTCAAC ATCAGGGAAT AAGCTACCAT GGGGCCGGGG GGTGGTGGCT CACGCTGTA ATCTCAGCAC TTAATAAAC
	
	805 815 825 835 845 855 865
W040782_S032244-02_M13R-88	CTAAGGAAGC TTCTAGGCGT AATCATGGTC ATAGCTGTTC CTGTGTGAAA TGTATCCGCT CACATGCCGG TG
circrna2	CTAAGGAAGC TTCTA-----

Figura 15. Alinhamento entre a sequência do inserto clonado em pUC19 (W040782_S032244-02_M13R-88) e a sequência desenhada para o DNA codificante do circRNA (circrna2).

Até a conclusão dessa versão da tese, a produção do circRNA por transcrição *in vitro* ainda não havia sido executada com sucesso.

4.2 Desenho de iniciadores

Os iniciadores para E6 e E7 de HPV 16 e HPV 18 utilizados neste estudo foram desenhados a partir da sequência consenso obtida pelo alinhamento múltiplo das sequências de referência descritas no estudo de BURK *et al.*, 2013 (ANEXO 10.3). Já os iniciadores divergentes para o circRNA foram desenhados a partir da sequência representada no ANEXO 10.4.

As temperaturas de *melting* foram estimadas usando as ferramentas *Tm Calculation* e OligoAnalyzer. *Tm Calculation* utiliza a fórmula básica $T_m = 2 * (\sum A + \sum T) + 4 * (\sum G + \sum C)$ para oligonucleotídeos com comprimento menor que 14 nucleotídeos e a fórmula $T_m = 64.9 + 41 * (yG + zC - 16.4) / (wA + xT + yG + zC)$ para oligonucleotídeos com comprimento maior que 14 nucleotídeos. A ferramenta OligoAnalyzer (que considera as concentrações: 0.2uM de primer, 50mM de Na, 1.5 mM de Mg, 0.2 mM dNTP conforme as normas estabelecidas pelo fabricante do kit Platinum Taq DNA polymerase ID: 10966182). Os valores de ΔG foram calculados utilizando as ferramentas PerlPrimer e OligoAnalyzer, adotando como ponto de corte $\Delta G \leq -5,0$. Pares de iniciadores com valores de T_m com mais de 1 unidade de diferença foram descartados da análise. Os dados dos iniciadores estão representados na Tabela 7.

Iniciador	Sequência	Comprimento	T _m básica (°C)	T _m Olygo Analyzer (°C)	ΔG p/ grampo (kcal/mol)	ΔG p/ autodímero (kcal/mol)	ΔG p/ heterodímero (kcal/mol)	Tamanho do amplicon
E6_16F	GAACAGCAATACAACAAACCGT	22	51.1	61	0.55	-0.01	-2.44	188
E6_16R	AGCTGGGTTTCTCTACGTGT	20	51.8	62	0.87	-1.02		
E6_18F	TTAATAAGGTGCCTGCCGTG	20	51.8	61.4	0.09	-1.65	-0.64	170
E6_18R	ACTTGTGTTTCTCTGCGTCG	20	51.8	61.6	0.81	-0.79		
E7_16F	CGGACAGAGCCCATTACAATA	21	52.4	62	0.39	-1.51	-0.75	116
E7_16R	GCCCATTAACAGGTCTTCCA	20	51.8	62	-0.88	-0.12		
E7_18F	CACGAGCAATTAAGCGACTCA	21	52.4	61.7	-1.02	-2.29	-2.36	94
E7_18R	GAAACAGCTGCTGGAATGCT	20	51.8	62.2	-1.11	-4.03		
circRNA_F	CTATCACTGGAGCATTAGGG	21	63,8	58,8	0,84	-0,01	-2,86	456
circRNA_R	AATCTCAGCACTTTGAGCTCG	21	63,8	61,6	0,84	-4,5		
HPV16_E6_G	TATAACAATAATTCTATACGCG	24	57,3	55,9	0,81	-4,03	-2,27	-
HPV16_E7_G	TAACAGTAGAGATCAGTTGTCCG	23	62,4	60,4	-0,61	-0,01	-2,21	-
HPV18_E6_G	TTAATAAATTGTATAACCCAGGGA	24	58,4	57,4	-0,47	-3,4	0	-
HPV18_E7_G	TTAATTGCTCGTGACATAGAGG	22	61	59,2	-1,02	-1,91	-3,24	-
155_F	TTAATGCTAATCGTGATAGGGGT	23	51.7	60.6	0.07	-0.41	-	-
21_F	TAGCTTATCAGACTGATGTTGA	22	49.2	58	-1.52	-0.9		
182_F	TTTGGAATGGTAGAACTCACACT	24	54	63.7	0.61	-3.94		

Tabela 7. Composição das sequências dos iniciadores: os iniciadores E6_16 e E6_18 amplificam um fragmento do gene E6 de HPV 16 e HPV 18, respectivamente; os iniciadores E7_16 e E7_18 amplificam um fragmento do gene E7 de HPV 16 e HPV 18, respectivamente; os iniciadores circRNA amplificam um fragmento do cDNA do RNA circular; os iniciadores HPV 16_E6_G, HPV 16_E7_G, HPV 18_E6_G e HPV 18_E7_G atuam na síntese de cDNAs dos RNAs guia; os iniciadores 155_F, 21_F e 182_F atuarão na síntese de de cDNA dos miRNAs alvos.

4.3 Aspectos do alinhamento múltiplo de sequências

O alinhamento de E6 das variantes de HPV 16 apresentou um comprimento de 477 sítios, dos quais 462 eram sítios conservados e 15 eram variáveis. Já o alinhamento de E7 das variantes de HPV 16 apresentou um comprimento de 297 sítios, dos quais 291 eram sítios conservados e 6 eram variáveis. O alinhamento de E6 das variantes de HPV 18 apresentou um comprimento de 477 sítios, dos quais 463 eram sítios conservados e 14 eram variáveis. Já o alinhamento de E7 das variantes de HPV 18 apresentou um comprimento de 318 sítios, dos quais 309 eram sítios conservados e 9 eram variáveis. Para gerar as sequências consenso, os nucleotídeos dos sítios variáveis foram convertidos em “X”. Os aspectos gerais dos alinhamentos estão representados na Tabela 8.

Gene	Porcentagem de nucleotídeos				Tamanho (n)	Sítios variáveis (S)	S/n (Ps)	Θ	π
	A	C	G	T					
E6HPV16	34,7	15,7	21,9	27,7	477	15	0,03	0,011	0,011
E7HPV16	31,2	20,8	22,8	25,1	297	6	0,02	0,007	0,008
E6HPV18	34,7	20,0	20,9	24,4	477	14	0,03	0,011	0,01
E7HPV18	30,4	22,0	23,1	24,5	318	9	0,03	0,010	0,009

Tabela 8. Frequências nucleotídicas e parâmetros associados ao teste de Tajima para cada gene analisado.

Na Tabela 8: A, C, G e T são os percentuais referentes a cada nucleotídeo nos genes em questão; tamanho (n) corresponde ao número total de sítios de cada gene; sítios variáveis (S) correspondem aos sítios que apresentaram mudança de nucleotídeos durante

os alinhamentos; Ps corresponde à razão S/n; Θ e π correspondem a parâmetros relacionados com a diversidade nucleotídica.

4.4 Transfecção em células humanas

4.4.1 Ensaio da transfecção com siRNA

A transfecção da linhagem HeLa ocorreu conforme planejado. A linhagem celular HeLa foi estabelecida com sucesso, confirmada por microscopia de fluorescência. Porém, os testes com as linhagens celulares Caski e C33A ainda não haviam sido executados com sucesso até a conclusão dessa versão da tese, devido a problemas com contaminação bacteriana durante a manipulação das linhagens na cabine de segurança.

4.4.2 Ensaio da transfecção com circRNA

Até a conclusão dessa versão da tese, a síntese dos circRNAs ainda não havia sido realizada, devido a falta do *RiboMAX™ Large Scale RNA Production System*.

4.5 Análise da expressão de E6 e E7 por qPCR

Antes da verificação da atividade dos siRNAs, foi realizada uma qPCR com o gene endógeno de RNA nuclear pequeno (snRNA) U6 a partir de cultura da linhagem HeLa, para estabelecer a curva padrão a ser utilizada na determinação dos Cts das demais amostras. A utilização do gene U6 (que geralmente é mais utilizado em análises de expressão de miRNA) para essa etapa da análise surgiu a partir da dificuldade em utilizar o gene da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), que é mais recomendado para a análise da expressão de RNAm, durante testes iniciais (GUO *et al.*, 2022).

O perfil da curva padrão foi produzido com as concentrações de cDNA equivalentes a 20, 2,0, 0,2, 0,02 e 0,002 ng/ul, apresentando valor de $R^2 = 0,98$ e eficiência = 0,93, como representado na Figura 16, na qual se observam diferenças nítidas entre as curvas de amplificação. Os valores confiáveis de R^2 (0,98) e eficiência (0,93) da curva padrão possibilitaram seu uso para estimar a concentração dos amplicons.

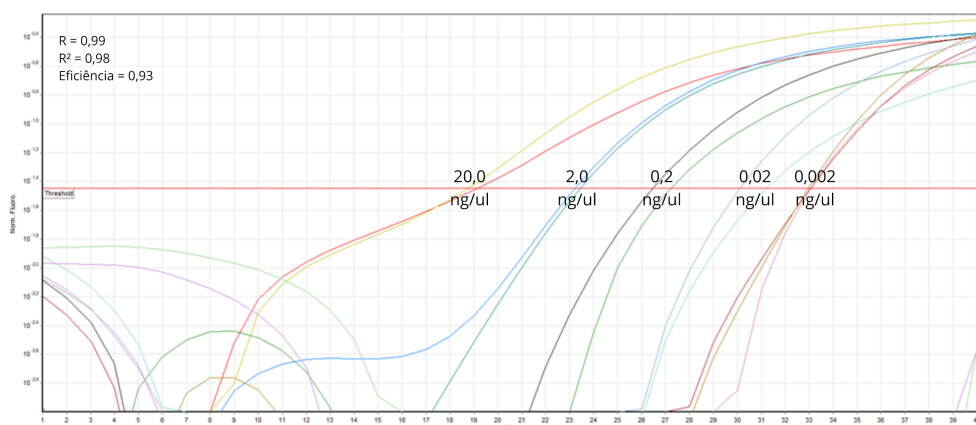


Figura 16. Perfil da qPCR da curva padrão utilizando o gene U6.

Após a transfecção das células com os siRNAs, a análise da qPCR mostrou diferença nítida entre os perfis das amostras de HeLa não tratada com siRNA específico para o RNAm do oncogene E7 e as amostras tratadas com ele, como pode ser observado na Figura 17, tanto na curva de Ct quanto no gráfico de *melting*. Porém, não foi possível observar diferenças entre os perfis das amostras tratadas com concentrações de 5, 10 e 20 pmol, respectivamente.

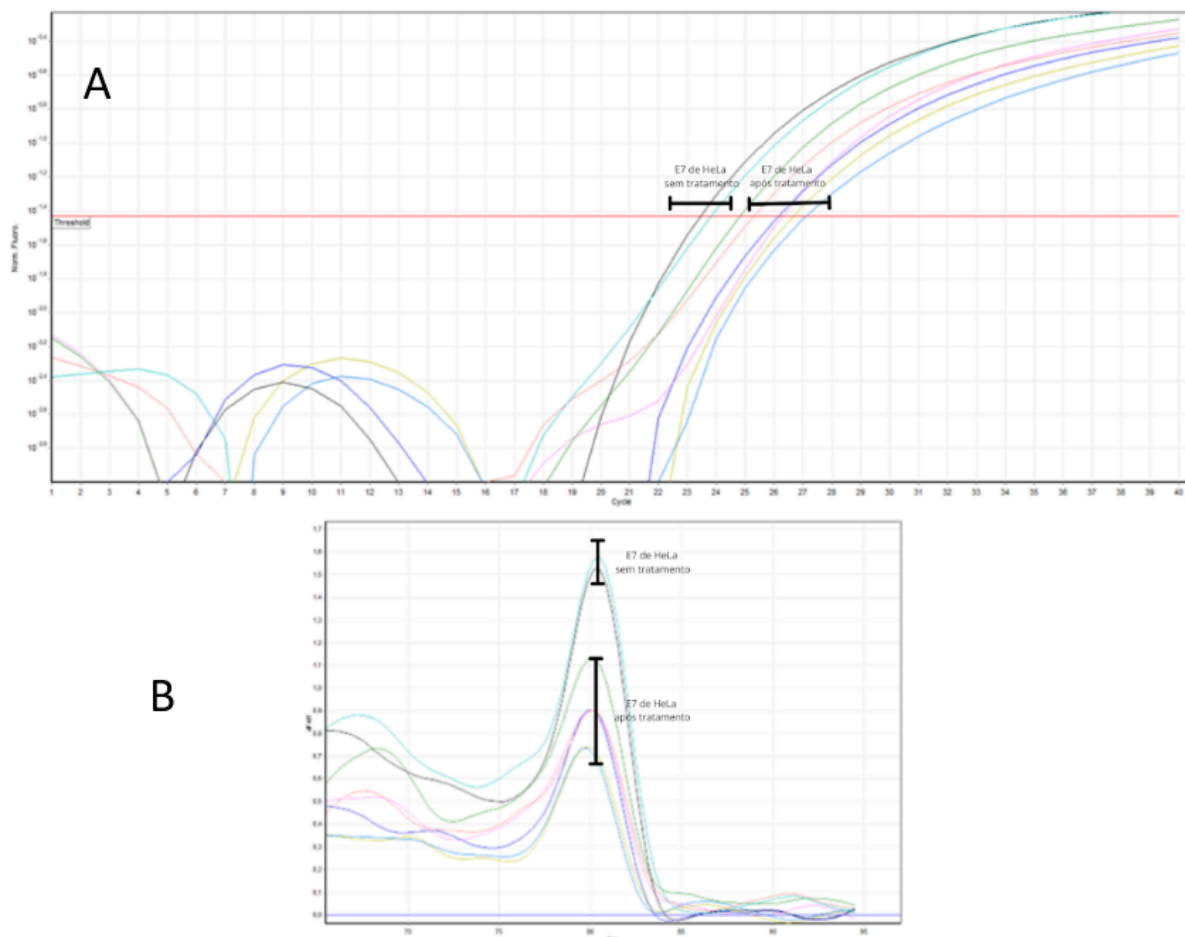


Figura 17. Perfil da qPCR do gene E7. A - Perfil das curvas de amplificação da reação. B - Perfil das curvas de *melting* da reação.

Já a análise dos perfis das amostras de HeLa não tratada com siRNA específico para o RNAm do oncogene E6 e as amostras tratadas não mostrou diferenças nítidas tanto na curva de Ct quanto no gráfico de *melting*, como pode ser observado na Figura 18. Além disso, também não foi possível observar diferenças entre os perfis das amostras tratadas com concentrações de 5, 10 e 20 pmol, respectivamente.

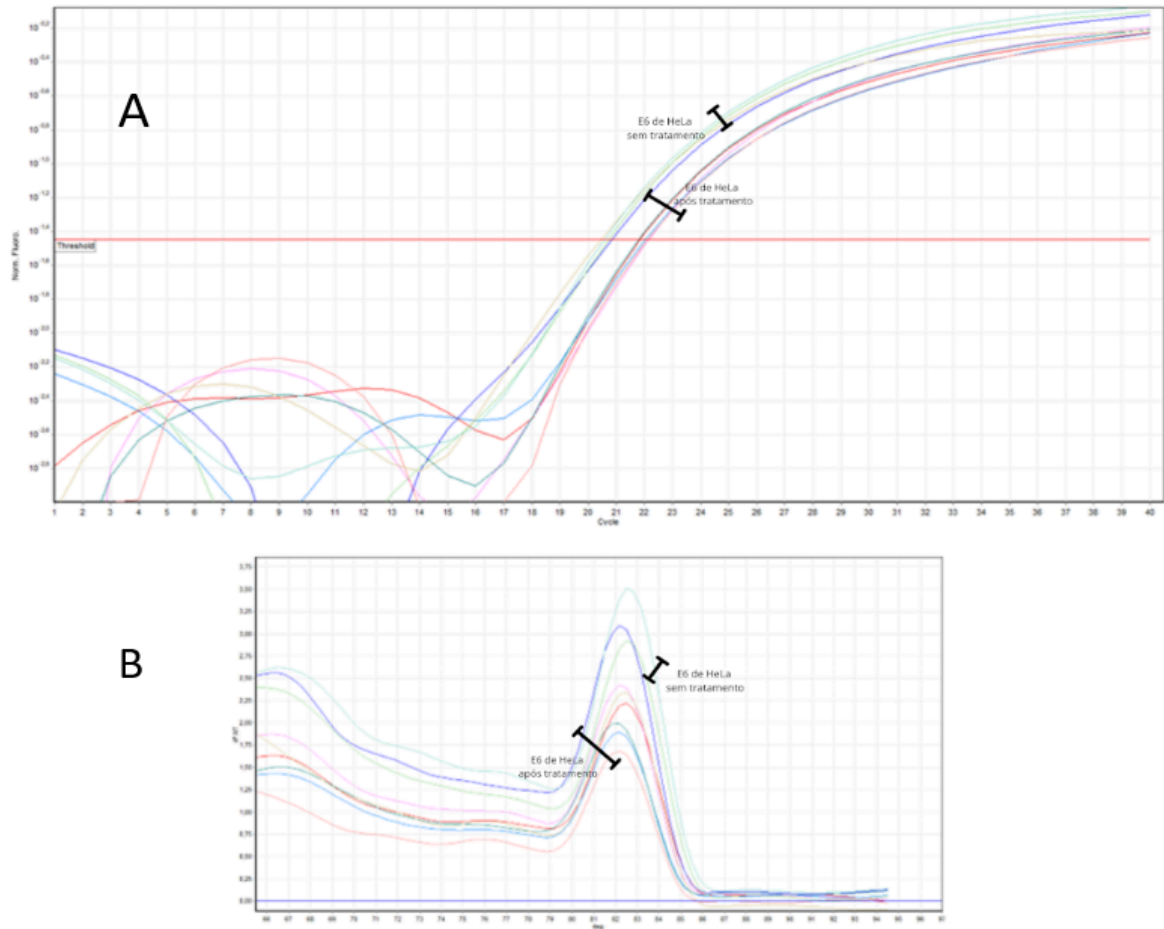


Figura 18. Perfil da qPCR do gene E6. A - Perfil das curvas de amplificação da reação. B - Perfil das curvas de melting da reação.

Após realizar os cálculos de normalização com base nas amostras sem tratamento, foi possível observar redução de 77 a 92% na expressão do RNAm do oncogene E7 após 48 horas da transfecção, chegando até a 99% após 72 horas. Já o RNAm do oncogene E6 apresentou redução de 39 a 67% após 48 horas da transfecção, atingindo 35% após 72 horas, como apresentado na Tabela 9 e na Figura 19. Essa redução de 40 a 80% provocada por siRNA direcionado a genes de HPV já havia sido relatada por JUNG *et al.* (2015).

Grupo	Ct Médio	Desv.Pad.	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	$\%2^{-\Delta\Delta Ct}$	%Knockdown
U6 (sem tratamento para E7) 48h	25,47	0,30					
U6 (com tratamento para E7) 48h	26,36	0,62	0,89				
E7 (sem tratamento) 48h	22,70	0,06	-2,77	0,00	1,00	100,00	0,00
E7 (com tratamento 5 pmol) 48h	26,31	0,35	0,84	3,62	0,10	9,82	90,18
E7 (com tratamento 10 pmol) 48h	26,61	0,57	1,15	3,92	0,08	8,10	91,90
E7 (com tratamento 20 pmol) 48h	24,98	0,33	-0,49	2,28	0,23	23,14	76,86
U6 (sem tratamento para E6) 48h	22,83	0,15					
U6 (com tratamento para E6) 48h	34,38	0,48	11,55				

E6 (sem tratamento) 48h	20,57	0,14	-2,25	0,00	1,00	100,00	0,00
E6 (com tratamento 5 pmol) 48h	21,33	0,71	-1,50	0,76	0,62	61,53	38,47
E6 (com tratamento 10 pmol) 48h	22,09	0,08	-0,74	1,52	0,38	37,78	62,22
E6 (com tratamento 20 pmol) 48h	22,28	0,24	-0,55	1,71	0,33	33,44	66,56
U6 (sem tratamento para E7) 72h	24,61	0,39					
U6 (com tratamento para E7) 72h	27,75	0,02	3,14				
E7 (sem tratamento) 72h	25,55	0,38	0,95	0,00	1,00	100,00	0,00
E7 (com tratamento 5 pmol) 72h	30,27	0,35	5,67	4,72	0,05	4,83	95,17
E7 (com tratamento 10 pmol) 72h	N/A						
E7 (com tratamento 20 pmol) 72h	32,63	1,77	8,03	7,08	0,01	1,06	98,94
U6 (sem tratamento para E6) 72h	25,67	0,19					
U6 (com tratamento para E6) 72h	N/A						
E6 (sem tratamento) 72h	25,16	1,32	-0,50	0,00	1,00	100,00	0,00
E6 (com tratamento 5 pmol) 72h	N/A						
E6 (com tratamento 10 pmol) 72h	34,59	0,20	8,92	10,61	0,00	0,11	99,89
E6 (com tratamento 20 pmol) 72h	25,34	1,81	-0,33	0,63	0,64	64,47	35,53

Tabela 9. Perfil de knockdown apresentado pelas amostras submetidas a tratamento com siRNA.

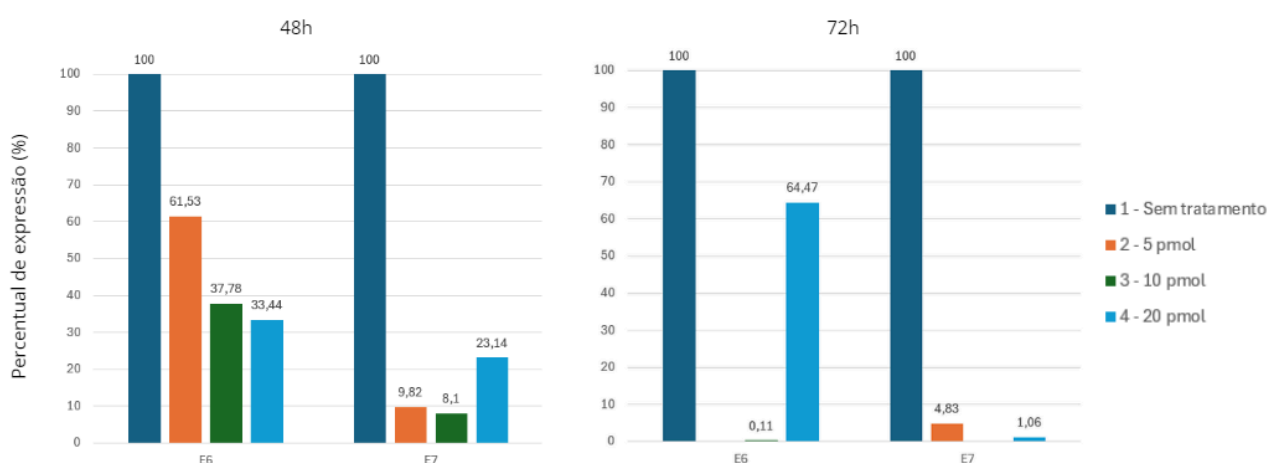


Figura 19. Perfil de expressão apresentado pelas amostras submetidas a tratamento com siRNA.

Todavia, os valores não anotados (N/A) e os valores de desvio padrão maiores que 1,0, observados nas amostras após 72 horas da transfecção mostram que há necessidade de realizar mais testes para fornecer informações mais completas sobre o comportamento da célula após 72 horas, para melhorar a confiabilidade dos resultados, como relatam SVEC *et al.* (2015) e TAYLOR *et al.* (2019).

Foi possível observar uma relação diretamente proporcional entre as concentrações de siRNA específicas para o RNAm do gene de E6 e o percentual de knockdown apresentado pelas células, o que não pode ser observado para os testes com siRNA

específicas para o RNAm do gene de E7. Contudo, o teste estatístico de Mann-Whitney mostrou que não há diferenças estatisticamente relevantes ($p>0,05$) entre os valores de Ct das amostras submetidas a tratamento e as concentrações dos siRNAs. Porém, o teste mostrou diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$) entre os valores de Ct das amostras submetidas a tratamento com siRNA em todas as concentrações testadas (5, 10 e 20 pmol) e os valores de Ct das amostras não submetidas a tratamento.

4.6 Teste de citotoxicidade celular

A análise morfológica das células antes e depois da transfecção ao microscópio óptico invertido não identificou alterações significativas, como pode ser observado na Figura 18. Essa ausência de alterações morfológicas significativas nas células HeLa transfectadas também foi relatada por PAANICHAMY *et al.* (2010), que também testaram siRNA para promover o silenciamento dos genes E6 e E7 de HPV 16 e HPV 18.

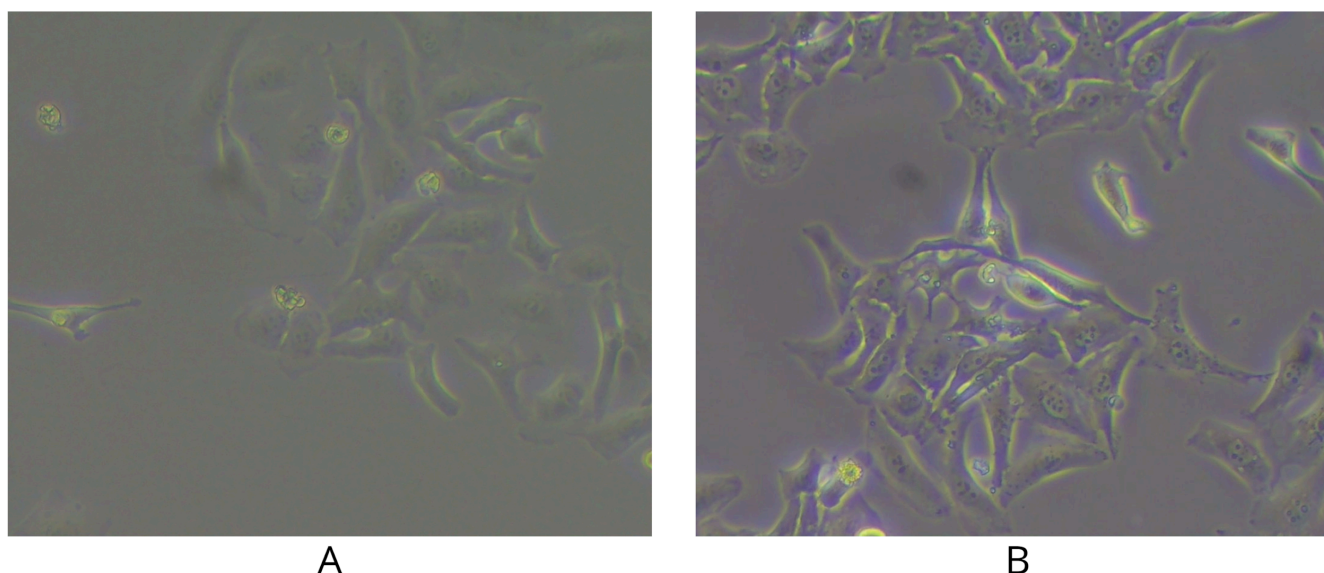


Figura 20. Fotomicrografia de HeLa com aumento de 100x antes (A) e depois (B) da transfecção.

O teste MTT apresentou os valores de absorbância e Concentração de Inibição (IC) descritos na Tabela 10. A relação entre a concentração de RNAi das amostras e os valores de absorbância e IC foi verificada pelo teste estatístico de Mann-Whitney, que por sua vez apresentou diferenças estatisticamente relevantes ($p<0,05$) entre amostras transfectadas e não transfectadas. Todavia, o teste indicou não haver diferença estatística ($P>0,05$) entre as concentrações de siRNA transfectado.

Alvo	Amostra	Absorbância	IC
E6	5pmol	0,13	63,79%
	10pmol	0,281	21,73%
	20pmol	0,255	28,97%
	NCT	0,296	17,55%
	C-	0,359	0,00%
E7	5pmol	0,215	40,11%
	10pmol	0,238	33,70%
	20pmol	0,219	39,00%
	NCT	0,342	4,74%
	C-	0,359	0,00%

Tabela 10. Perfil do teste de citotoxicidade pela ação de MTT apresentado pelas amostras submetidas a tratamento com siRNA. NTC = células expostas à lipofectamina, C- = células somente com meio de cultura, $IC = [(Absorbância\ de\ C-) - (Absorbância\ da\ amostra)] / (Absorbância\ de\ C-) \times 100$.

Os valores de ΔCt obtidos pela comparação entre os perfis de expressão do gene U6 em células expostas à lipofectamina com U6 de células não expostas, apresentaram valores que variaram de 15 a 50%, corroborando com os valores de Absorbância registrados para as amostras expostas à lipofectamina sem o siRNA e demonstrando que há citotoxicidade relacionada com a lipofectamina, como constatado em estudos anteriores. Contudo, testes adicionais devem ser realizados para verificar a influência dos siRNAs em marcadores de ciclo celular, além da citotoxicidade relacionada com diferentes concentrações de lipofectamina (BERNARDO *et al.*, 2019; SHARMA *et al.*, 2021).

4.7 Resultados adicionais correlatos

Ao longo do desenvolvimento desta tese, foram realizadas algumas atividades que, apesar de não estarem diretamente ligadas aos objetivos dela, possuem relação indireta com este trabalho. Convém destacar aqui quatro atividades: as adaptações do Laboratório de Cultura de Células Animais, o desenvolvimento do software *Degenerate Bases*, o desenvolvimento do workflow *Bot_vina* e a formação de recursos humanos.

4.7.1 Adaptações do Laboratório de Cultura de Células Animais

Através dos recursos financeiros obtidos com os projetos “Construção de um vetor viral para o tratamento do Alzheimer” (aprovado no Edital nº 26/2020 MS-SCTIE-Decit-DGITIS-CGCIS/CNPq, Plataformas Inovadoras em Terapias Avançadas) e “Desenvolvimento de terapia genética baseada em vetor viral multi alvo para tratamento do

câncer cervical” (aprovado no Edital N. 010/2021- CT&I ÁREAS PRIORITÁRIAS, da FAPEAM), foi implantado o Laboratório de Cultura de Células Animais nas dependências do Instituto de Ciências Biológicas – ICB na UFAM (ANEXO 9.5), composto de 4 ambientes: 1) Antessala para paramentação; 2) Sala para preparação de meio de cultura; 3) Sala para manipulação das células em cultura e bioensaios e 4) Sala para descontaminação de Materiais.

Além do laboratório, as atividades desenvolvidas durante este trabalho têm contribuído para implementar uma linha de pesquisa em Terapia de RNA de Interferência.

4.7.2 Desenvolvimento do software *Degenerate Bases*

A utilização de oligonucleotídeos contendo bases degeneradas tem sido observada em variações da PCR, sequenciamento, na produção de sondas, aptâmeros entre outras moléculas e, diante desse cenário, surge a necessidade de uma ferramenta capaz de gerar todas as possibilidades que uma sequência com bases degeneradas, para possibilitar a criação de um banco de dados local para análises *in silico*.

Nesse contexto, o software *Degenerate Bases* foi desenvolvido para analisar uma sequência de oligonucleotídeos contendo bases degeneradas e gerar, a partir dessa sequência, um arquivo com todas as sequências possíveis com as bases não degeneradas considerando a conversão das bases degeneradas em bases convencionais. O software obteve sucesso nos testes de validação com sequências de comprimentos variados, contendo bases convencionais e degeneradas, o que influencia diretamente o tempo de processamento (GALVÃO *et al.*, 2021).

O código-fonte do software foi depositado na base de dados GitHub e está disponível em <https://github.com/DatDarkAlpaca/Degenerate-Bases> e a descrição do algoritmo encontra-se disponível no ANEXO 10.8. Outrossim, o programa foi registrado no INPI sob processo de Nº BR 51 2024 000042 9 (ANEXO 10.7).

4.7.3 Desenvolvimento do workflow *Bot_vina*

Durante o desenvolvimento desse trabalho, também foi desenvolvido o workflow *Bot_vina*, que realiza um *screening* molecular para identificação de compostos bioativos que possam interagir com proteínas-alvo, através da associação de ferramentas de Bioinformática com processos de automatização baseados em linguagem Python.

O workflow em questão pode auxiliar a descobrir compostos com potencial terapêutico contra o câncer cervical e seu código-fonte foi depositado na base de dados GitHub em https://github.com/robertoaabfilho/bot_vina e a descrição detalhada do algoritmo encontra-se disponível no ANEXO 10.10. Além disso, o programa foi registrado no INPI sob processo de Nº BR 51 2024 000037 2 (ANEXO 10.9).

4.7.4 Formação de recursos humanos

Ambos os programas descritos anteriormente foram produtos de projetos de iniciação científica desenvolvidos no Colégio Militar de Manaus, com alunos do ensino médio do referido Estabelecimento de Ensino.

O software *Degenerate Bases* foi desenvolvido durante a iniciação científica do aluno Paulo Castro Galvão (ANEXO 10.11) e possui duas produções relacionadas: um registro no INPI Nº BR 51 2024 000042 9 (ANEXO 10.7) e um artigo em periódico (GALVÃO *et al.*, 2021).

Já o *workflow Bot_vina* foi desenvolvido durante a iniciação científica das alunas Ada Jamile Gomes de Oliveira (ANEXO 10.12) e Mayanna Lago Coelho (ANEXO 10.13), cujo projeto intitulado “MINERVA: Uma análise *in silico* da viabilidade de uma terapia multi alvo para tratamento do câncer de mama” foi apresentado pelas referidas alunas durante a 38ª Mostra Internacional de Ciência e Tecnologia (MOSTRATEC), realizada em outubro de 2023, e na 22ª Feira Brasileira de Ciências e Engenharia (FEBRACE), realizada em março de 2024.

5 CONCLUSÕES

- O método de desenho, ranqueamento e seleção de RNAi desenvolvido mostrou-se eficiente e preciso, como pode ser constatado pela verificação *in silico* com dados já registrados em patentes depositadas no INPI e pelos testes *in vitro*;
- Todos os miRNA selecionados para este estudo apresentaram relação causal com a progressão tumoral, sendo conhecidos como onco-miRNA, o que poderá contribuir significativamente para a eficácia da atividade do RNA circular na terapia proposta;
- A análise dos resultados da expressão gênica mostrou redução após 48 horas de 41 a 93% nos níveis de expressão dos RNAs mensageiros de E6 e E7 nas células submetidas a tratamento com siRNA. Porém, não foi possível estabelecer relação clara entre as concentrações de siRNA utilizadas e o nível de expressão dos alvos;
- A análise dos resultados da expressão gênica mostrou redução após 72 horas de 36 a 99% nos níveis de expressão dos RNAs mensageiros de E6 e E7 nas células submetidas a tratamento com siRNA. Porém, não foi possível estabelecer relação clara entre as concentrações de siRNA utilizadas e o nível de expressão dos alvos. Além disso, os valores de desvio padrão observados para esse grupo de amostras indica grandes variações nos valores de Ct das amostras, o que poderão ser corrigidas com mais testes.

6 PERSPECTIVAS

- Há possibilidade de implementar recursos de *deep learning* às ferramentas de bioinformática desenvolvidas nesse trabalho;
- A substituição do gene U6 pelo GAPDH como normalizador da qPCR pode melhorar a análise da expressão gênica dos RNAm alvos;
- Para melhorar a análise da citotoxicidade relacionada com a transfecção, serão realizados testes usando marcadores do ciclo celular e de citotoxicidade em resposta à lipofectamina;
- Após finalizar os testes *in vitro* com os siRNA desenvolvidos neste estudo, dar-se-á início a novos testes com shRNA sintetizados a partir dos desenhos realizados durante a fase *in silico*;
- Após finalizar os testes *in vitro* com o circRNA desenvolvido neste estudo, serão realizados teste com a inserção do DNA codificante deste circRNA em um vetor viral AAV;
- Os testes com shRNA também serão realizados utilizando transfecção com vetor viral adenovírus associado AAV;
- Os recursos financeiros para os testes supracitados já foram adquiridos no âmbito do Edital N. 010/2021- CT&I ÁREAS PRIORITÁRIAS da FAPEAM;
- Caso haja captação de mais recursos, haverá possibilidade de analisar o efeito dos RNAi desenvolvidos neste trabalho sobre a concentração das proteínas E6 e E7, por ELISA.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGGARWAL, Sumit; AGARWAL, Pragati; SINGH, Amit Kumar. Human papilloma virus vaccines: A comprehensive narrative review. *Cancer Treatment and Research Communications*, p. 100780, 2023.
- ALMOUH, M.; RAZMARA, E.; BITARAF, A.; GHAZIMORADI, M. H.; HASSAN, Z. M.; BABASHAH, S. Circular RNAs play roles in regulatory networks of cell signaling pathways in human cancers. *Life Sciences*, 309, 120975, 2022.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 25(17): 3389-3402, 1997.
- BÄFVERSTEDT, B. Condylomata acuminata--past and present. *Acta dermato-venereologica*, 47(5), 376-381, 1967.
- BARBOSA FILHO, R. A. A.; DO NASCIMENTO, W. M.; DE OLIVEIRA, C. M. C.; ASTOLFI-FILHO, S. Cervical cancer and the SUS: Impact of the HPV vaccination campaign on cervical cancer treatment. *Concilium*, v. 24, 2024.
- BAXI, K.; SAWARKAR, S.; MOMIM, M.; PATEL, V.; FERNANDES, T. Vaginal siRNA delivery: Overview on novel delivery approaches. *Drug Delivery and Translational Research*, 10(4), 962-974, 2020.
- BERNARDO, C.; SICILIANO, V.; DI PASQUA, L. G.; RICHELMI, P.; VAIRETTI, M.; FERRIGNO, A. Comparison between Lipofectamine RNAiMAX and GenMute transfection agents in two cellular models of human hepatoma. *European Journal of Histochemistry: EJH*, 63(3), 2019.
- BONELLI, P.; BORRELI, A.; TOCCILLO, F. M.; BUONAGURO, F. M.; TORNESELLO, M. L. The role of circRNAs in human papillomavirus (HPV)-associated cancers. *Cancers*, 13(5), 1173, 2021.
- BURK, R. D.; HARARI, A.; CHEN, Z. Human papillomavirus genome variants. *Virology*, Oct;445 (1-2): 232-43, 2013.
- BURMEISTER, C. A.; KHAN, S. F.; SCHÄFER, G.; MBATANI, N.; ADAMS, T.; MOODLE, J.; PRINCE, S. Cervical cancer therapies: Current challenges and future perspectives. *Tumour Virus Research*, v. 13, p. 200238. 2022.
- CHEN, X.; LU, Y. RNA circular: Biossíntese in vitro. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 9, 2021.
- CRAWFORD, L. V. A study of human papillomavirus DNA. *Journal of Molecular Biology*, 13(2), 362-372, 1965.
- CROSBIE, E. M.; EINSTEIN, M. H.; FRANCESCHI, S.; KITCHENER, H. C. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Lancet*. 382, 289-299, 2013.
- DE VILLIERS, E-M. Cross-roads in the classification of papillomavíruses. *Virology*, 2013.
- DIETERICH, C.; PAPANTONIS, A. Circular RNAs: Methods and Protocols. Humana Press, New York, NY. 2018.
- DOORBAR, J.; QUINT, W.; BANKS, L.; BRAVO, I. G.; STOLER, M.; BROKER, T. R.; STANLEY, M. A. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*, 30, F55-F70, 2012.
- DÜRST, M.; GISSMANN, L.; IKENBERG, H.; ZUR HAUSEN, H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(12), 3812-3815, 1983.

- EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*. 32(5): 1792-1797, 2004.
- EGLI, M.; MANOHARAN, M. Chemistry, structure and function of approved oligonucleotide therapeutics. *Nucleic Acids Research*, 51(6), 2529-2573, 2023.
- ELLWANGER, D. C.; BÜTTNER, F. A.; MEWES, H. W.; STÜMPFLEN, V. The sufficient minimal set of miRNA seed types. *Bioinformatics*, 27(10), 1346-1350, 2011.
- FERRAZ, L. C.; SANTOS, A. B. R.; DISCACCIATI, M. G. Ciclo celular, HPV e evolução da neoplasia intraepitelial cervical: seleção de marcadores biológicos. *J. Health Sci. Inst*, 2012.
- FRIAS-DE-DIEGO, A.; JARA, M.; ESCOBAR, L. E. Papillomavirus in Wildlife. *Front. Ecol. Evol.* 7:406, 2019.
- GALVÃO, P. V. C.; NASCIMENTO, W. M.; BARBOSA FILHO, R. A. A. Degenerate-bases: criação de bancos de dados a partir de oligonucleotídeos com bases degeneradas / Degenerate-bases: databases creation from oligonucleotides with degenerated bases. *Brazilian Journal of Development*, [S. l.], v. 7, n. 12, p. 114384–114395, 2021.
- GARBUGLIA, A. R.; LAPA, D.; SIAS, C.; CAPOBIANCHI, M. R.; DEL PORTO, P. The use of both therapeutic and prophylactic vaccines in the therapy of papillomavirus disease. *Frontiers in immunology*, 11, 188, 2020.
- GUO, M. W.; ZHU, L.; LI, H. Y.; WU, Z. N.; LI, Z. Y.; LI, J. Evaluation of reference genes for normalization of mRNA and microRNA expression by RT-qPCR under different experimental conditions in *Medicago ruthenica* (L.) Ledeb. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 1-14, 2022.
- HA, M.; KIM, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*, v. 15, n. 8, p. 509-524, 2014.
- HANSEN, T. B. et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature*, v. 495, n. 7441, p. 384-388, 2013.
- HU, B.; ZHONG, L.; WENG, Y.; PENG, L.; HUANG, Y.; ZHAO, Y.; LIANG, X. J. Therapeutic siRNA: state of the art. *Signal transduction and targeted therapy*, 5(1), 101, 2020.
- INCA – Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2023: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde. 2022.
- JIANG, M.; MILNER, J. Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells treated with siRNA, a primer of RNA interference. *Oncogene*, 21(39), 6041-6048, 2002.
- JONAS, S.; IZAURRALDE, E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nature reviews genetics*, 16(7), 421-433, 2015.
- JUNG, H. S.; RAJASEKARAN, N.; JU, W.; SHIN, Y. K.; Human Papillomavirus: Current and Future RNAi Therapeutic Strategies for Cervical Cancer. *J. Clin. Med.* 4, 1126-1155. 2015.
- KLUG, A. Structure of viruses of the papilloma-polyoma type: II. comments on other work. *Journal of Molecular Biology*, 11(2), 424-445, 1965.
- KULKARNI, J. A.; WITZIGMANN, D.; THOMSON, S. B.; CHEN, S.; LEAVITT, B. R.; CULLIS, P. R.; VAN DER MEEL, R. The current landscape of nucleic acid therapeutics. *Nature nanotechnology*, 16(6), 630-643, 2021.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35(6):1547–1549, 2018.

- LAUFFER, M. C.; VAN ROON-MOM, W.; AARTSMA-RUS, A. Possibilities and limitations of antisense oligonucleotide therapies for the treatment of monogenic disorders. *Communications Medicine*, 4(1), 6, 2024.
- LAVENNIAH, A.; LUU, T. D. A.; LI, Y. P.; et al. Engineered circular RNA sponges act as miRNA inhibitors to attenuate pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Molecular Therapy*, 28(6), 1506-1517, 2020.
- LI, N.; CUI, T.; GUO, W.; WANG, D.; MAO, L. MiR-155-5p accelerates the metastasis of cervical cancer cell via targeting TP53INP1. *Onco Targets Ther.* Apr 29; 12, 3181-3196, 2019.
- LU, Z.; HAGHOLLAHI, S.; AFZAL, M. Potential Therapeutic Targets for the Treatment of HPV-Associated Malignancies. *Cancers*, 16(20), 3474, 2024.
- MARSHALL, O. J.. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics*. 20(15): 2471-2472, 2004.
- MCINTYRE, G. J.; FANNING, G. C. Design and cloning strategies for constructing shRNA expression vectors. *BMC biotechnology*, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2006.
- MOLIN, G. Z. D.; DE ALMEIDA, D. V. P.; PIMENTA, J. Câncer de colo do útero - O que é? Disponível em: <https://vencerocancer.org.br/tipos-de-cancer/cancer-de-colo-do-utero-o-que-e/>. Acesso em 02/02/2024
- MUÑOZ, N.; BOSCH, F. X.; SANJOSÉ, S.; HERRERO, R.; CASTELLSAGUÉ, X.; SHAH, K.V.; SNIJDERS, P. J. F.; MEIJER, C. J. L. M. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *N Engl J Med*. 348:518-527, 2003.
- NAITO, Y.; UI-TEI, K. siRNA Design Software for a Target Gene-Specific RNA Interference. *Frontiers in Genetics*. 3: 102, 2012.
- O'BRIEN, J.; HAYDER, H.; ZAYED, Y.; PENG, C. Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Frontiers in endocrinology*, 9, 402, 2018.
- OYERVIDES-MUÑOZ, M. A.; PÉREZ-MAYA, A. A.; RODRÍGUEZ-GUTIÉRREZ, H. F. ET AL. Understanding the HPV integration and its progression to cervical cancer. *Infection, Genetics and Evolution*, 61, 134-144, 2018.
- PAANICHAMY, J. K.; MEHNDIRATTA, M.; BHAGAT, M.; RAMALINGAM, P.; DAS, B.; DAS, P.; CHATTOPADHYAY, P. Silencing of Integrated Human Papillomavirus-16 Oncogenes by Small Interfering RNA-Mediated Heterochromatization. *Molecular cancer therapeutics*, 9(7), 2114-2122. 2010.
- QURESHI, A.; TANTRAY, V. G.; KIRMANI, A. R.; AHANGAR, A. G. A review on current status of antiviral siRNA. *Reviews in Medical Virology*, 28(4), e1976, 2018.
- RAO, D. D.; VORHIES, J. S.; SENZER, N.; NEMUNAITIS, J. siRNA vs. shRNA: similarities and differences. *Advanced drug delivery reviews*, 61(9), 746-759, 2009.
- RIBEIRO, A. L.; CAODAGLIO, A. S.; SICHERO, L. Regulation of HPV transcription. *Clinics*, v. 73, 2018.
- RSTUDIO TEAM. RStudio: Integrated Development Environment for R. Boston, MA. Disponível em <http://www.rstudio.com>. Acesso em 30 de setembro de 2021.
- SALINAS-MONTALVO, A. M.; SUPRAMANIAM, A.; MCMILLAN, N. A.; IDRIS, A. RNA-based gene targeting therapies for human papillomavirus driven cancers. *Cancer Letters*, 523, 111-120, 2021.
- SANTOS, J. M. O.; PEIXOTO DA SILVA, S.; COSTA, N. R.; GIL DA COSTA, R. M.; MEDEIROS, R. The Role of MicroRNAs in the Metastatic Process of High-Risk HPV-Induced Cancers. *Cancers (Basel)*, 10(12):493, 2018.

- SHARMA, G.; SHARMA, A. R.; BHATTACHARYA, M.; LEE, S. S.; CHAKRABORTY, C. CRISPR-Cas9: a preclinical and clinical perspective for the treatment of human diseases. *Molecular Therapy*, 29(2), 571-586, 2021.
- SHI, Y.; ZHEN, X.; ZHANG, Y.; LI, Y.; KOO, S.; SAIDING, Q.; TAO, W. Chemically Modified Platforms for Better RNA Therapeutics. *Chemical Reviews*, 2024.
- SMALLEY RUMFIELD, C.; ROLLER, N.; PELLOM, S. T.; SCHLOM, J.; JOCHEMS, C. Therapeutic vaccines for HPV-associated malignancies. *ImmunoTargets and therapy*, 167-200, 2020.
- SPARMANN, A.; VOGEL, J. RNA-based medicine: from molecular mechanisms to therapy. *The EMBO Journal*, v. 42, n. 21, p. e114760, 2023.
- STEWART, B. W.; WILD, C. P. (Ed.). *World Cancer Report*. Lyon: IARC, 2014.
- STRAUSS, M. J.; SHAW, E. W.; BUNTING, H.; MELNICK, J. L. "Crystalline" Virus-Like Particles from Skin Papillomas Characterized by Intranuclear Inclusion Bodies. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 72(1), 46-50, 1949.
- SVEC, D.; TICHOPAD, A.; NOVOSADOVA, V.; PFAFFL, M.W.; KUBISTA, M. How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomolecular detection and quantification*, 3, 9-16. 2015.
- SYRJÄNEN, S. Oral manifestations of human papillomavirus infections. *European journal of oral sciences*, v. 126, p. 49-66, 2018.
- TAJIMA, F. Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585-595, 1989.
- TAN, S.; DE VRIES, E.G.E.; VAN DER ZEE, A.G.J.; DE JONG, S. Anticancer Drugs Aimed at E6 and E7 Activity in HPV-Positive Cervical Cancer. *Current Cancer Drug Targets*. 12, 170-184. 2012.
- TANG, T.; WONG, H.K.; GU, W.; et al. MicroRNA-182 plays an onco-miRNA role in cervical cancer. *Gynecol Oncol*, Apr;129(1):199-208, 2013.
- TAYLOR, S. C.; NADEAU, K.; ABBASI, M.; LACHANCE, C., NGUYEN, M.; FENRICH, J. The ultimate qPCR experiment: producing publication quality, reproducible data the first time. *Trends in biotechnology*, 37(7), 761-774, 2019.
- TORRE, G. D.; PILOTTI, S.; DE PALO, G.; RILKE, F. Viral particles in cervical condylomatous lesions. *Tumori Journal*, 64(5), 549-553, 1978.
- UI-TEI, K.; NAITO, Y.; NISHI, K.; JUNI, A.; SAIGO, K. Thermodynamic stability and Watson-Crick base pairing in the seed duplex are major determinants of the efficiency of the siRNA-based off-target effect. *Nucleic Acids Res.* 36, 7100-7109, 2008.
- VAN DOORSLAER, K. Evolution of the papillomaviridae. *Virology*, v. 445, n. 1-2, p. 11-20, 2013.
- WILD, C.P.; WEIDERPASS, E.; STEWART, B.W. editors (2020). *World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <http://publications.iarc.fr/586>. Licence: CC BY-NC-ND 3.0 IGO.
- XI, J.; CHEN, J.; XU, M.; YANG, H.; WEN, S.; PAN, Y.; WANG, X.; YE, C.; QIU, L.; SUN, Q. The polymorphisms of LCR, E6, and E7 of HPV-58 isolates in Yunnan, Southwest China. *Virology Journal*. 15:76, 2018.
- YOUSEFI, Z.; ARIA, H.; GHAEDRAHMATI, F.; BAKHTIARI, T.; AZIZI, M.; BASTAN, R.; HOSSEINI, R.; ESKANDARI, N. An Update on Human Papilloma Virus Vaccines: History, Types, Protection, and Efficacy. *Frontiers in immunology*. 12, 2022.

YU, J-Y.; DERUITER, S. L.; TURNER, D. L. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 99, n. 9, p. 6047-6052, 2002.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses in the causation of human cancers—a brief historical account. *Virology*, 384(2), 260-265, 2009.

ZUR HAUSEN, H. Oncogenic herpes viruses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 417(1), 25-53, 1975.

ZUR HAUSEN, H., Gissmann, L., Steiner, W., Dippold, W., & Dreger, I. Human Papilloma Viruses and Cancer¹. In *Comparative Leukemia Research 1975* (Vol. 43, pp. 569-571). Karger Publishers, 1976.

8 ANEXOS

8.1 Certificado de Registro de Programa de Computador do *workflow* siRNA



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA, COMÉRCIO E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
DIRETORIA DE PATENTES, PROGRAMAS DE COMPUTADOR E TOPOGRAFIAS DE CIRCUITOS

Certificado de Registro de Programa de Computador

Processo Nº: **BR512023003837-7**

O Instituto Nacional da Propriedade Industrial expede o presente certificado de registro de programa de computador, válido por 50 anos a partir de 1º de janeiro subsequente à data de 15/07/2023, em conformidade com o §2º, art. 2º da Lei 9.609, de 19 de Fevereiro de 1998.

Título: Workflow para busca de sequências para RNAi

Data de publicação: 15/07/2023

Data de criação: 11/06/2022

Titular(es): ROBERTO ALEXANDRE ALVES BARBOSA FILHO; PAULO VINÍCIUS CASTRO GALVÃO; WHENDEL MESQUITA DO NASCIMENTO; SPARTACO ASTOLFI FILHO; CINTIA MARA COSTA DE OLIVEIRA; WILHAM KELVEN BATISTA DA SILVA; KEICY SIQUEIRA CAVALCANTE; ENEDINA NOGUEIRA DE ASSUNÇÃO

Autor(es): ROBERTO ALEXANDRE ALVES BARBOSA FILHO; PAULO VINÍCIUS CASTRO GALVÃO; WHENDEL MESQUITA DO NASCIMENTO; SPARTACO ASTOLFI FILHO; CINTIA MARA COSTA DE OLIVEIRA; WILHAM KELVEN BATISTA DA SILVA; KEICY SIQUEIRA CAVALCANTE; ENEDINA NOGUEIRA DE ASSUNÇÃO

Linguagem: PYTHON

Campo de aplicação: SD-09

Tipo de programa: IT-03

Algoritmo hash: SHA-512

Resumo digital hash:

f7727cb427d138443f4f26aa4d1b2b958e34239d36a73e439568ad0349d1293496ffec7398f51ebc64c69777513c76971c2cc88eaeaf9b46c7be80b2187e853c

Expedido em: 19/12/2023

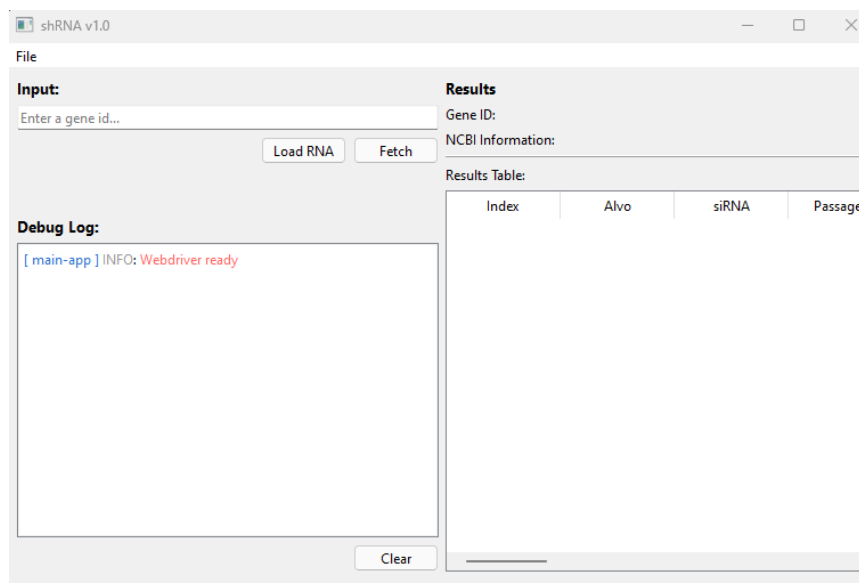
Aprovado por:

Flávia Romano

Coordenadora Geral Substituta da CEPIT

8.2 Descrição e código do *workflow* siRNA

Para iniciar o programa, o usuário deve executar o arquivo 'main.py', que abrirá uma janela conforme a figura abaixo.



Após iniciado, o algoritmo do programa importa as bibliotecas `os`, `re`, `pathlib`, `pygetwindow`, `datetime`, `bs4`, `pyunpack`, `time`, `html5lib`, `numpy`, `os.path`, `selenium`, `pandas`, `shutil`, `csv`, `zipfile`, `etree`, `Bio.Seq`, `Bio.Align`, e `tkinter`, para manipular todos os arquivos e pastas do sistema necessários para a execução completa do *workflow*.

Em seguida, o usuário deve digitar o ID do gene alvo para que o *workflow* inicie a busca das sequências dos transcritos no site do NCBI (disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Em seguida, o algoritmo realiza o alinhamento usando Muscle e gera uma sequência consenso a partir desse alinhamento.

Com a sequência consenso anotada, o algoritmo a utiliza como base no site do siDirect (disponível em <http://sidirect2.rnai.jp/>), para produzir sequências de siRNA. Ao final do processo, todas as sequências de siRNA são salvas em uma planilha, onde a fita guia de cada siRNA é adicionada a uma coluna separada da fita passageira.

Com essas informações, o algoritmo acessa o site siRNA Target Finder (disponível em <https://www.genscript.com/tools/sirna-target-finder>) para verificar todos os possíveis alvos das fitas guias e passageiras geradas.

Por fim, os resultados de todas as consultas são salvos na mesma planilha das sequências.

Código fonte

```

print("\nInstalando todas as bibliotecas relacionadas\n')
import os
import os.path
import zipfile
import pathlib
import shutil
import re
import time
from tkinter import filedialog
from tkinter import filedialog as dlg
from tkinter import Tk
from tkinter.filedialog import askopenfilename
from pyunpack import Archive
from selenium import webdriver
from selenium.webdriver.common.by import By
from selenium.webdriver.common.keys import Keys
from selenium.webdriver.chrome.options import Options
import pandas as pd
import numpy as np
from bs4 import BeautifulSoup
import urllib.request
import urllib.error
import urllib.parse
import html5lib
import lxml
from lxml import etree
import csv
from Bio.Seq import Seq
from Bio.Seq import MutableSeq
from Bio import AlignIO
import Bio.Align.Applications
from Bio.Align import AlignInfo
from Bio.Align.Applications import MuscleCommandline

#tornando a janela do navegador oculta
options = webdriver.ChromeOptions()
options.add_argument("--headless")

#Selecionando a pasta Downloads do computador
print("\nSelecione a pasta de Downloads do seu computador\n')

downloads = filedialog.askdirectory()
downloads = str(downloads)

#Informando o ID do gene
print("\nDigite o ID do gene')
ID=input("ID: ")

#Identificando o gene a partir do ID
print("\nReconhecendo o gene...\n')
navegador = webdriver.Chrome(chrome_options=options)
navegador.get("https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/tables/genes/")
time.sleep(5)
gene = navegador.find_element_by_xpath('//*[@id="btn-get-started"]').click()
time.sleep(5)

```

```

gene = navegador.find_element_by_xpath('//*[@id="id-type-select"]/div[1]').click()
time.sleep(5)
gene = navegador.find_element_by_xpath('//*[@id="gene_id"]').click()
time.sleep(5)
gene = navegador.find_element_by_xpath('//*[@id="id-list-text"]')
time.sleep(5)
gene.send_keys(ID)
resultado = navegador.find_element_by_xpath('//*[@id="dlg-add-genes-button"]/div').click()
time.sleep(5)
resultado = navegador.page_source.encode('utf-8')
html = BeautifulSoup(resultado, 'html.parser')
time.sleep(5)
gene = html.find_all('td')[2].get_text()
NOME_DO_GENE = str(gene)
if gene == "":
    gene = 'Gene não identificado'
    print('\n'+gene)
else:
    print("\n GENE: '+NOME_DO_GENE)

#Buscando a sequência
print('\n NCBI buscando as sequências dos transcritos...\n')
time.sleep(5)
navegador = webdriver.Chrome()
NCBI = 'https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/'+ID
NCBI = str(NCBI)
time.sleep(5)
navegador.get(NCBI)
time.sleep(5)
transcritos = navegador.find_element_by_xpath("//a[contains(text(),'Transcript
table')]").click()#busca mais precisa de uma palavra no botão!
time.sleep(5)
transcritos = navegador.find_element_by_xpath('//*[@id="data-table"]/div[1]/table/thead/tr/th[1]/div/input').c
lick()
time.sleep(5)
download = navegador.find_element_by_xpath('//*[@id="button-open-download-menu"]/div').click()
time.sleep(5)
download = navegador.find_element_by_xpath('//*[@id="action-bar"]/div[2]/div/ul/li[2]/span[2]').click()
time.sleep(5)
download = navegador.find_element_by_xpath('//*[@id="protein-sequences"]').click()
time.sleep(5)
download = navegador.find_element_by_xpath('//*[@id="download-dataset-dialog--button"]/span').click()
time.sleep(10)
ncbi = downloads +'/' + 'ncbi_dataset.zip'
print(ncbi)
destino = os.path.dirname(os.path.abspath(__file__))
time.sleep(5)
shutil.move(ncbi, destino)
time.sleep(5)
pasta = zipfile.ZipFile('ncbi_dataset.zip', 'r')
time.sleep(5)
transcritos = pasta.read('ncbi_dataset/data/rna.fna')#acessa o arquivo dos alinhamentos
dentro da pasta zipada

```

```

with open('temp.fas', 'wb') as f:
    f.write(transcritos)
    f.close()
pasta.close()
os.remove('ncbi_dataset.zip')
muscle_cline = MuscleCommandline(r"muscle3.8.31_i86win32.exe", input = r'temp.fas', out =
r'aln.fas')#executa o alinhamento de sequências pelo MUSCLE
muscle_cline = str(muscle_cline)#transforma a linha de comando em string
os.system(muscle_cline)#cola a string no terminal e roda
aln = AlignIO.read('aln.fas', 'fasta')
aln = AlignInfo.SummaryInfo(aln)
consensus = aln.gap_consensus(threshold=1.0, ambiguous='X', require_multiple=0)
consensus = str(consensus)
print(consensus)
os.remove('temp.fas')#exclui o arquivo

print('\n siDirect buscando a sequência a partir do número de acesso...\n')
time.sleep(5)
navegador = webdriver.Chrome(chrome_options=options)
navegador.get("http://sidirect2.rnai.jp/")
time.sleep(5)
seq = navegador.find_element_by_xpath('//*[@id="useq"]')
time.sleep(5)
seq = navegador.find_element_by_xpath('//*[@id="useq"]').clear()
time.sleep(5)
seq = navegador.find_element_by_xpath('//*[@id="useq"]')
time.sleep(5)
seq.send_keys(consensus)
time.sleep(10)

#Definindo os parâmetros das opções
print('\nDefinindo os parâmetros de busca no siDirect...\n')
click = navegador.find_element_by_xpath('/html/body/form/h3/font/a/img').click()
click = navegador.find_element_by_xpath('//*[@id="more1"]').click()
click = navegador.find_element_by_xpath('//*[@id="options"]/div[1]/table/tbody/tr/td[1]/p[2]/input').click()
click = navegador.find_element_by_xpath('//*[@id="functional_options"]/p[2]/input[3]').click()
click = navegador.find_element_by_xpath('//*[@id="nrdbSpe"]').click()
click = navegador.find_element_by_xpath('//*[@id="nrdbSpe"]/option[1]').click()
click = navegador.find_element_by_xpath('//*[@id="options"]/div[4]/p[4]/input[1]').click()
GC_minimo = navegador.find_element_by_xpath('//*[@id="options"]/div[4]/p[4]/input[2]').clear()
GC_minimo = navegador.find_element_by_xpath('//*[@id="options"]/div[4]/p[4]/input[2]')
GC_minimo.send_keys('30')
GC_maximo = navegador.find_element_by_xpath('//*[@id="options"]/div[4]/p[4]/input[3]').clear()
GC_maximo = navegador.find_element_by_xpath('//*[@id="options"]/div[4]/p[4]/input[3]')
GC_maximo.send_keys('50')
click = navegador.find_element_by_xpath('//*[@id="options"]/div[4]/p[5]/input[1]').click()
seq = navegador.find_element_by_xpath('//*[@id="options"]/div[4]/p[5]/input[2]').clear()
seq = navegador.find_element_by_xpath('//*[@id="options"]/div[4]/p[5]/input[2]')
seq.send_keys('WWNNNNNNNNNNNNNNNNNSNN')

#Gerando os siRNAs
time.sleep(5)
print('\nGerando lista de siRNA...\n')

```



```

TM = [tm[i:i + 2] for i in range(0, len(tm), 2)]
seed = []
for i in TM:
    del i[1]
    for j in i:
        seed.append(j)
tm = []
for i in seed:
    seed = []
    for j in i:
        j = j.replace('>', '')
        j = j.replace('\"', '')
        seed.append(j)
    seed = ''.join(seed)
    tm.append(seed)
for i in tm:
    i = float(i)

print("\nCalculando o percentual de GC e contando os possíveis alvos da sequência
senso\n")

alvos_senso = []
GC_SENSO = []
NUM_ALVOS_SENSO = []
for i in seq_senso:
    #Calculando o percentual de GC
    DNA_senso = Seq(i)
    GC_senso = (((DNA_senso.count("G"))+(DNA_senso.count("C")))/len(DNA_senso))*100
    GC_SENSO.append(GC_senso)

    #contando os alvos do senso
    navegador = webdriver.Chrome(chrome_options=options)
    navegador.get("https://www.genscript.com/tools/sirna-target-finder")
    time.sleep(5)
    off = navegador.find_element_by_xpath('//*[@id="sequence"]')
    off.send_keys(i)

    off = navegador.find_element_by_xpath('//*[@id="mainContent2"]/div/div/form/div[11]/input[1]')
    time.sleep(5)
    html = navegador.page_source.encode('utf-8')
    html = BeautifulSoup(html, 'html.parser')
    html = etree.HTML(str(html))
    off = html.xpath('//*[@id="mainContent2"]/div/p[1]')[0].text
    off = str(off)
    off = off.split('ref|')
    del off[0]
    if off == []:
        none = 'none'
        NUM_ALVOS_SENSO.append(none)
        alvos_senso.append(none)
    else:
        target1 = []
        num_alvos_senso = []
        for i in off:
            i = list(i)
            offtarget = []
            for j in i:

```

```

        j = j.replace('|','')
        j = j.replace(';','')
        j = j.replace(' ','')
        offtarget.append(j)
        alvossenso = ".join(offtarget)
num_alvos_senso.append(alvossenso)
alvo = len(alvossenso)
target1.append(alvo)
Target1 = len(target1)
alvos_senso.append(Target1)
NUM_ALVOS_SENSE.append(num_alvos_senso)
TOTAL_ALVOS_SENSE = []
for i in NUM_ALVOS_SENSE:
    ALVOS_S = []
    for j in i:
        navegador = webdriver.Chrome(chrome_options=options)
        navegador.get("https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/"+j)
        time.sleep(5)
        alvo = navegador.page_source.encode('utf-8')
        html = BeautifulSoup(alvo, 'html.parser')
        time.sleep(5)
        alvo = html.find_all('h1')[1]
        alvo = str(alvo)
        alvo = re.findall("<h1>(.*?)</h1>", alvo)
        print(alvo)
        for k in alvo:
            ALVOS_S.append(k)
    TOTAL_ALVOS_SENSE.append(ALVOS_S)
print(TOTAL_ALVOS_SENSE)

alvos_guia = []
GC_GUIA = []
NUM_ALVOS_GUIA = []
for i in seq_guia:
    #Calculando o percentual de GC
    DNA_guia = Seq(i)
    GC_guia = (((DNA_guia.count("G"))+(DNA_guia.count("C")))/len(DNA_guia))*100
    GC_GUIA.append(GC_guia)

    #Contando os alvos do guia
    navegador = webdriver.Chrome(chrome_options=options)
    navegador.get("https://www.genscript.com/tools/sirna-target-finder")
    time.sleep(5)
    off = navegador.find_element_by_xpath('//*[@id="sequence"]')
    time.sleep(5)
    off.send_keys(i)

    click =
navegador.find_element_by_xpath('//*[@id="mainContent2"]/div/div/form/div[11]/input[1]').click()
    time.sleep(5)
    html = navegador.page_source.encode('utf-8')
    html = BeautifulSoup(html, 'html.parser')
    html = etree.HTML(str(html))
    off = html.xpath('//*[@id="mainContent2"]/div/p[1]')[0].text
    off = str(off)
    off = off.split('ref|')
    del off[0]

```

```

if off == []:
    none = 'none'
    NUM_ALVOS_GUIA.append(none)
    alvos_guia.append(none)
else:
    target2 = []
    num_alvos_guia = []
    for i in off:
        i = list(i)
        offtarget = []
        for j in i:
            j = j.replace('|', '')
            j = j.replace(';', '')
            j = j.replace(' ', '')
            offtarget.append(j)
            alvosguia = ".join(offtarget)
            num_alvos_guia.append(alvosguia)
            alvo = len(alvosguia)
            target2.append(alvo)
    Target2 = len(target2)
    alvos_guia.append(Target2)
    NUM_ALVOS_GUIA.append(num_alvos_guia)
    TOTAL_ALVOS_GUIA = []
    for i in NUM_ALVOS_GUIA:
        ALVOS_G = []
        for j in i:
            navegador = webdriver.Chrome(chrome_options=options)
            navegador.get("https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/"+j)
            time.sleep(5)
            alvo = navegador.page_source.encode('utf-8')
            html = BeautifulSoup(alvo, 'html.parser')
            time.sleep(5)
            alvo = html.find_all('h1')[1]
            alvo = str(alvo)
            alvo = re.findall("<h1>(.*?)</h1>", alvo)
            for k in alvo:
                ALVOS_G.append(k)
            TOTAL_ALVOS_GUIA.append(ALVOS_G)
    print(TOTAL_ALVOS_GUIA)

resultados = pd.DataFrame(list(zip(RNAi, seq_senso, GC_SENSE, guia_cauda, GC_GUIA,
alvos_senso, TOTAL_ALVOS_SENSE, alvos_guia, TOTAL_ALVOS_GUIA)),
columns=['shRNA', 'Senso', 'GC', 'Guia', 'GC', 'Alvos em H. sapiens para a senso',
'Descrição', 'Alvos em H. sapiens para a guia', 'Descrição'])
print(resultados)
resultados.to_csv('Resultado.csv')

```

8.3 Sequências consenso utilizadas no desenho de shRNA e iniciadores

Sequência consenso de E6 de HPV 16

XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXATGTTXCAGGACCCACAGGAGCGACCCXAAAGTTACCAXAXTTATG
CACAGAGCTGCAAACAACATACATGAXATAATATTAGAATGTGTGTACTGCAAGCAACAGTTACTGCG
ACGTGAGGTATATGACTTTGCTTTTCGGGATTATGCATAGTATATAGAGATGGGAXTCCATATGCXGTX
TGTGATAAATGTTTAAAGTTTTATTCTAAAATTAGTGAGTATAGAXATTATTGTTATAGTGTATGGAACA
ACATTAGAACAGCAATACAACAAACCGTTGTGTGATTTGTTXATTAGGTGTATTAAGTGTCAAAAGCCA
CTXTGTCCTGAAGAAAAGCAAAGACATCTGGACAAAAGCAAAGATTCCATAATATAAGGGGTGCGTG
GACCGGTGCGATGTATGTCTTGTTCAGATCATCXAGAACACGTAGAGAAACCCAGCTGTAA

Sequência consenso de E7 de HPV 16

ATGCATGGAGATACACCTACATTGCATGAATATATGTTAGATTGCAACCAGAGACAACCTGATCTCTACT
GTTATGAGCAATTAAXTGACAGCTCAGAGGAGGAXGATGAAATAGATGGTCCAGCTGGACAAGCAGA
ACCGGACAGAGCCCATTACAATATTGTAACCTTGTGTTGCAAGTGTGACTCTACGCTTCGTTGTGCG
TACAAAGCACACACGTAGACATXCGTACXTTGGAAGACCTGTTAATGGGCACACTAGGAATTGTGTGC
CCCATCTGTTCXCAGAAACCATAA

Sequência consenso de E6 de HPV 18

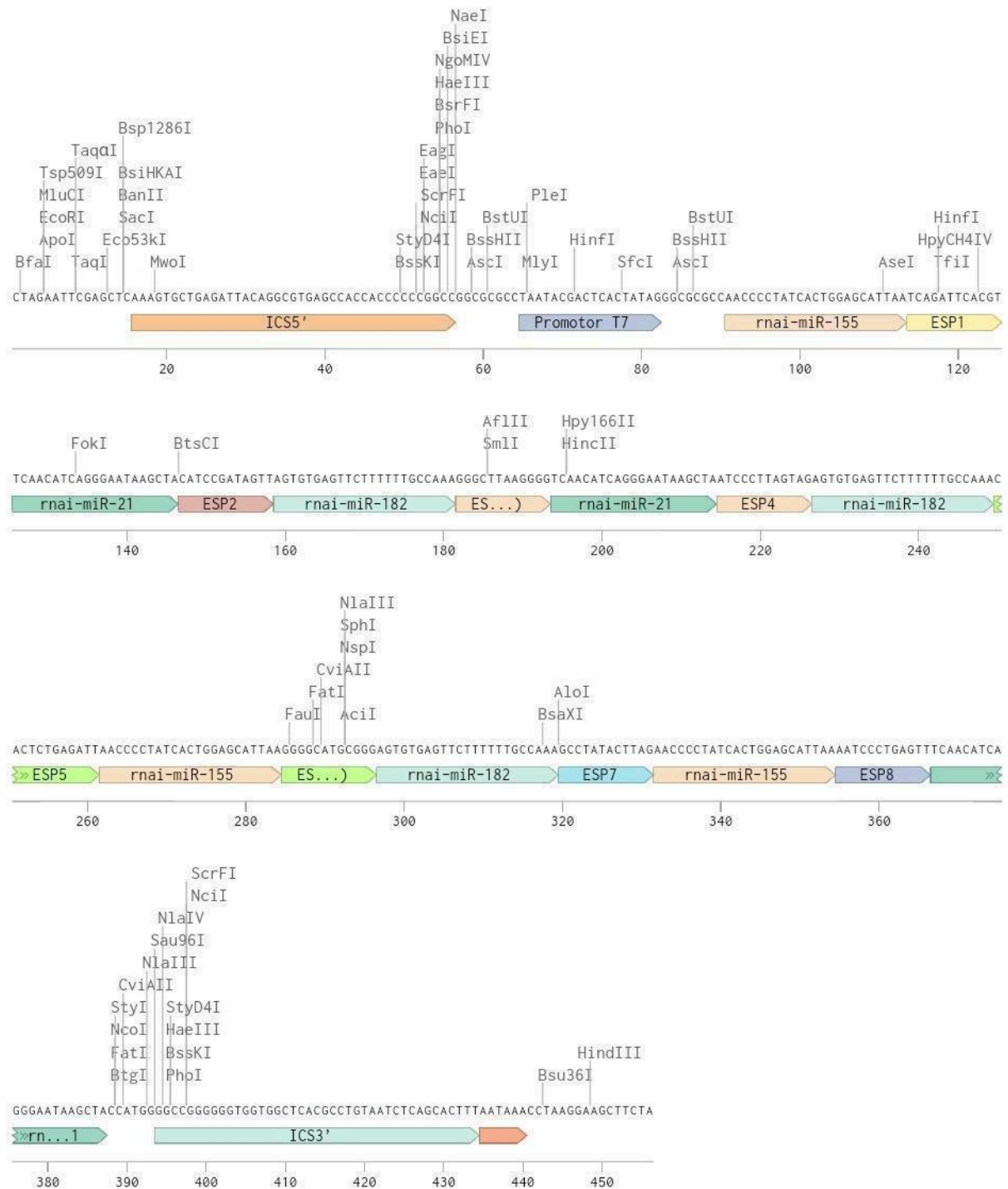
ATGGCGCGCTTTGAGGATCCAACACGGCGACCCTACAAGCTACCXGATCTGTGCACGGAACCTGAAC
ACTTCACTGCAAGACATAGAAAACCTGTGTATATTGCAAGACAGTATTGGAACCTACAGXGGTATTT
GAATTTGCATTXAAAGATTTATTTGTGXTGTATAGAGACAGTATACCGCATGCTGCATGCCATAAATGTA
TAGATTTXTATTCTAGAATTAGAGAATTAAGAXATTATTCAGACTCTGTGTATGGAGACACATTXGAXAA
ACTAACTAACACTGGGTATACAATTTATTAATAAGGTGCCTGCGGTGCCAGAAACCXTTGAATCCAGC
AGAAAAACTTAGACACCTTAATGAAAAACGACGATTXCACAAXATAGCTGGGCACTATAGAGGCCAGT
GCCATTCGTGCTGCAACCGAGCACGACAGGAXXGXCTCCAACGACGCAGAGAAACACAAGTATAA

Sequência consenso de E7 de HPV 18

ATGXATGGACCTAAGGCAACATTGCAAGACATTGTATTGCATTTAGAGCCXCAAATGAXATTCCGGTT
GACCTXCTATGTCACGAGCAATTAAGCGACTCAGAGGAAGAAAACGATGAAATAGATGGAGTTAATCA
TCAACATTTXCCAGCCCAGGAGCXGAACCACAACGTCACACAATGTTGTGTATGTGTTGTAAGTGT
GAAGCCAGAATTGAGCTAGTAGTAGAAAGCTCAGCAGACGACCTTCGAGCATTCCAGCAGCTGTTTC
TGAXXACCCTGTCXTTGTGTGTCCGTGGTGTGCATCCCAGCAGTAA

8.4 Sequência linearizada do circRNA utilizado neste estudo

DNAcirc2 (456 bp)



8.5 Artigo aprovado pela Revista CONCILIUM (Qualis A2)



DOI: 10.53660/CLM-2780-24B34

Cervical cancer and the SUS: Impact of the HPV vaccination campaign on cervical cancer treatment

O câncer de colo do útero e o SUS: Impacto da campanha de vacinação contra HPV no tratamento para o câncer cervical

Received: 28-12-2023 | Accepted: 30-01-2024 | Published: 02-02-2024

Roberto Alexandre Alves Barbosa Filho

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7555-8100>

Universidade do Estado do Amazonas, Brasil

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia – Rede Bionorte

E-mail: robertoaabfilho@gmail.com

Whendel Mesquita do Nascimento

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7556-4423>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

E-mail: whendelmesquita@ufam.edu.br

Spartaco Astolfi-Filho

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7246-6350>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia – Rede Bionorte

E-mail: spartaco.biotec@gmail.com

Cintia Mara Costa de Oliveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1065-8418>

Universidade Federal do Amazonas

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia – Rede Bionorte

E-mail: cmaraoliveira.cmc@gmail.com

ABSTRACT

Cervical cancer (or cervical cancer) has been among the top five causes of cancer mortality in women worldwide and HPV infection is considered a necessary condition for the development of more than 90% of cervical cancer cases. of the uterus. The SUS provides treatments for malignant neoplasia of the cervix and, since 2014, has also provided tetravalent vaccines (against HPVs 6, 11, 16, and 18) and bivalent vaccines (against HPVs 16 and 18), as well as medications to treat anogenital warts. and cervical injuries. The objective of this work was to analyze the impact of the quadrivalent HPV vaccine on the services offered by the SUS for the treatment of cervical cancer. It was possible to observe a statistically significant relationship between the doses of the female HPV vaccine applied and the variations in treatments performed and also in the recorded diagnoses of malignant neoplasia of the cervix.

Keywords: HPV; Vaccine; Cancer; SUS

RESUMO

O câncer do colo uterino (ou câncer cervical) está entre as cinco maiores causas de mortalidade por câncer em mulheres em todo o mundo e a infecção pelo HPV é considerada uma condição necessária para desenvolvimento em mais de 90% dos casos de câncer de colo do útero. O SUS disponibiliza tratamentos para a neoplasia maligna do colo uterino e, desde 2014, também disponibiliza a vacina quadrivalente (contra HPV's 6, 11, 16, e 18) e bivalente (contra HPV's 16 e 18), além de medicamentos para tratar verrugas anogenitais e lesões cervicais. O objetivo deste trabalho foi analisar o impacto da vacina tetravalente contra HPV nos serviços oferecidos pelo SUS para tratamento do câncer cervical. Foi possível observar relação estatisticamente significativa entre as doses aplicadas da vacina feminina para HPV e as variações dos tratamentos realizados e também dos diagnósticos registrados de neoplasia maligna do colo do útero.

Palavras-chave: HPV; Vacina; Câncer; SUS

INTRODUÇÃO

O Câncer do Colo Uterino (ou Câncer Cervical) está entre as cinco maiores causas de mortalidade por câncer em mulheres em todo o mundo, de acordo com a *International Agency for Research on Cancer* (IARC). Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), o câncer do colo do útero é o segundo mais incidente nas Regiões Norte (21,20/100 mil), Nordeste (17,62/100 mil) e Centro-Oeste (15,92/100 mil), ficando atrás apenas de tumores de pele não melanoma. Já na Região Sul (17,48/100 mil), ocupa a quarta posição e, na Região Sudeste (12,01/100 mil), a quinta posição (FERRAZ *et al.*, 2012; INCA, 2020).

Estima-se que mais de 90% dos casos de câncer de colo do útero são precedidos de infecção pelo papilomavírus humano (HPV). Entretanto, outros fatores contribuem para a etiologia deste tumor, como: tabagismo, hipovitaminoses, multiplicidade de parceiros sexuais, iniciação sexual precoce e uso de contraceptivos orais (CROSBIE *et al.*, 2013; DE VILLIERS, 2013; INCA, 2020; MUÑOZ *et al.*, 2003; WILD *et al.*, 2020).

É bem evidenciado que o câncer do colo do útero é precedido por lesões teciduais que são classificadas pela OMS de acordo com o grau de comprometimento tecidual, esta classificação sofreu inúmeras alterações ao longo dos anos, como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1. Comparação entre as classificações criadas pela OMS ao longo dos anos para as lesões precursoras de carcinoma de células escamosas do colo do útero

Classificação da OMS 1975/1994	Classificação da OMS 2003	Classificação da OMS 2014
Displasia leve	Neoplasia Intraepitelial Cervical 1 (NIC1)	Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau (LSIL)
Displasia Moderada Displasia Severa Carcinoma <i>in situ</i>	Neoplasia Intraepitelial Cervical 1 (NIC2) Neoplasia Intraepitelial Cervical 1 (NIC3)	Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau (HSIL)

Fonte: WILD *et al.*, 2020

Atualmente as Lesões Intraepiteliais Escamosas são classificadas como de Baixo Grau (*Low-grade squamous intraepithelial lesion* - LSIL) ou de Alto Grau (*High-grade squamous intraepithelial lesion* - HSIL) de acordo com o grau de comprometimento epitelial e são caracterizadas pela perda gradual das funções celulares básicas, como o controle da divisão celular e capacidade de amadurecimento. Tal progressão tem relação direta com a interação das oncoproteínas do HPV com os fatores de regulação do ciclo celular do hospedeiro (FERRAZ *et al.*, 2012; WILD *et al.*, 2020).

Os métodos para o tratamento das lesões provocadas por HPV são divididos em: métodos destrutivos por recursos físicos (Criocauterização e a terapia a Laser) e químicos (Podofilina, Ácido Tricloroacético e a 5-Fluorouracil) e por métodos excisionais, como a cirurgia clássica (conização com o bisturi) e a CAF (Cirurgia de Alta Frequência). Nas neoplasias mais graves, são usadas ainda a Radioterapia e Quimioterapia (Cisplatina). Os tratamentos que estimulam a imunidade podem ser usados, porque o HPV é um vírus recorrente e ilude, de certa forma, o sistema imune do hospedeiro. São eles: Imiquimod, Interferon, Retinóides, Isoprinosine e Vacinas. (SALINAS-MONTALVO *et al.*, 2021).

A elevada taxa de mortalidade do câncer resultante da infecção pelo HPV, o torna um importante problema de saúde pública a nível mundial e políticas públicas contra o câncer do colo uterino vêm sendo desenvolvidas no Brasil desde meados dos anos 80, sendo inicialmente impulsionadas pelo Programa Viva Mulher, em 1996. O controle do câncer cervical é uma prioridade da agenda de saúde do país e integra o Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) no Brasil, 2011-2022.

O SUS disponibiliza quimioterapias, radioterapias e cirurgias para as pacientes e, desde 2014, também disponibiliza as vacinas preventivas Gardasil (contra HPVs 6, 11, 16, e 18) e Cervarix (contra HPVs 16 e 18), além de medicamentos para tratar as verrugas

anogenitais (como Podofilotoxina e Imiquimode) e lesões cervicais (como a própria Cisplatina). Todavia, as altas taxas de incidência e prevalência do HPV no país levam a custos financeiros e sociais substanciais associados à prevenção da doença e ao tratamento clínico em todos os estágios. É estimado que o custo mínimo por paciente do tratamento quimioterápico seja equivalente a R\$ 1.300,00 para o sistema de saúde (INCA, 2020; JUNG *et al.*, 2015; GASTOS FEDERAIS EM ONCOLOGIA, 2018).

Posto isso, e considerando o impacto positivo que as campanhas de vacinação têm historicamente apresentado na saúde pública do Brasil, o objetivo deste trabalho foi analisar o impacto da vacina quadrivalente (Gardasil) contra HPV no quantitativo de diagnósticos e abordagens utilizadas no tratamento pelo SUS.

METODOLOGIA

Coleta e organização dos dados

Os dados utilizados neste estudo foram obtidos por meio de consulta às bases de dados do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS, disponível em <https://datasus.saude.gov.br/informacoes-de-saude-tabnet/>) e do Sistema IBGE de Recuperação Automática (SIDRA, disponível em <https://sidra.ibge.gov.br/home/pmc/brasil>), acessados entre os meses de setembro a novembro de 2023. Como este trabalho utilizou dados de domínio público, acesso livre e disponibilizados pelo Ministério da Saúde e pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, não precisou ser submetido ao comitê de ética, conforme Resolução CNS 466/2012.

Durante a coleta dos dados, utilizamos como filtro temporal para todas as bases consultadas os anos de 2013 (ano anterior ao início da campanha de vacinação contra HPV) a 2019 (ano anterior ao marco temporal da pandemia de COVID-19 no Brasil). Estabelecemos o ano de 2019 como limite para eliminar o possível viés decorrente da influência das medidas restritivas impostas a partir de 2020 pela pandemia sobre as modalidades terapêuticas analisadas nesse estudo.

Na base DATASUS foi utilizado como filtro o diagnóstico “C53 - Neoplasia maligna do colo do útero”, a partir do qual, foram coletados os dados referentes a pacientes no período considerado (2013 a 2019) bem como dados referentes às modalidades terapêuticas “CIRURGIA”, “QUIMIOTERAPIA” e “RADIOTERAPIA” utilizadas no tratamento de pacientes com esse diagnóstico. Para as informações

referentes à vacina, coletamos as informações referentes às doses aplicadas do imunológico quadrivalente feminino para HPV, que representa 97,4% das doses de vacina contra HPV aplicadas durante o período considerado. Já na base SIDRA foram coletadas as projeções referentes à população feminina brasileira nos anos de referência, uma vez que não houve censo no referido período. Todos os dados foram organizados por região do país e registrados em arquivos com extensão “.csv” para posterior análise estatística.

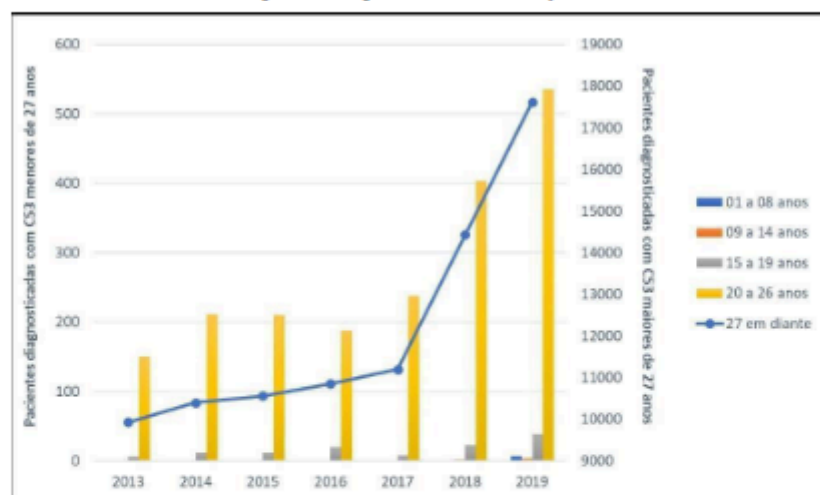
Análise estatística

As análises estatísticas dos dados foram realizadas utilizando a plataforma estatística Rstudio 4.0.2. Foram calculados os valores de média e desvio padrão para os dados analisados, além de testes para verificar a normalidade dos dados para posterior correlação entre as variáveis (RSTUDIO TEAM, 2021).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

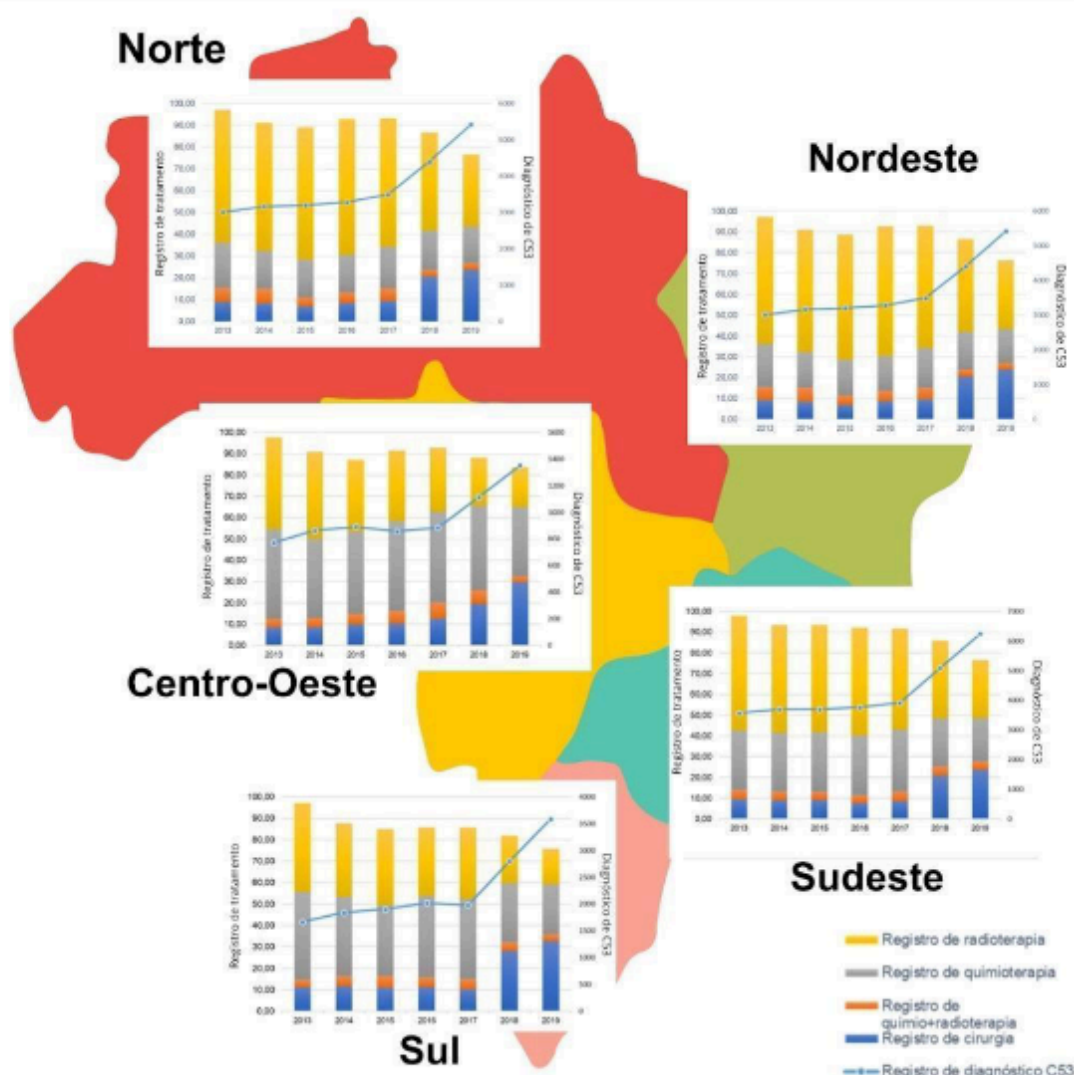
O teste de Qui-quadrado revelou relação diretamente proporcional ($p < 0,05$) entre o aumento dos diagnósticos registrados de neoplasia maligna do colo do útero (C53) e o aumento da população feminina, representada pela projeção do IBGE para período entre 2013 e 2019, que por sua vez apresentou aumento em todas as regiões do Brasil, sendo os maiores para as regiões Norte (com aumento percentual médio de $1,43\% \pm 0,04$) e Centro-Oeste (com aumento percentual médio de $1,43\% \pm 0,07$), seguido das regiões Sul (com média de $0,81\% \pm 0,03$), Sudeste (com média de $0,79\% \pm 0,04$) e Nordeste (com média de $0,63\% \pm 0,02$). Ao segmentarmos os dados entre as idades mais atendidas pela campanha de vacinação (9 a 26 anos), notamos que a maioria dos diagnósticos realizados para essa parte da população foi registrada para a faixa etária entre 20 e 26 anos (com média de 277 ± 140). Contudo, 98% dos diagnósticos de C53 foram registrados para a faixa etária acima de 27 anos (figura 1).

Figura 1. Diagnóstico de neoplasia maligna do colo uterino (C53) para a faixa etária atendida pela campanha de vacinação.



Podemos observar pela Figura 2 que a radioterapia representa a maior parcela dos tratamentos realizados pelo SUS em todas as regiões entre os anos de 2013 e 2019, com exceção para as regiões Sul, durante o ano de 2014 e no período de 2016 a 2019, e Centro-Oeste, durante o ano de 2015 e no período de 2017 a 2019, quando a quimioterapia passou a representar a principal forma de tratamento para pacientes diagnosticadas com neoplasia maligna do colo do útero.

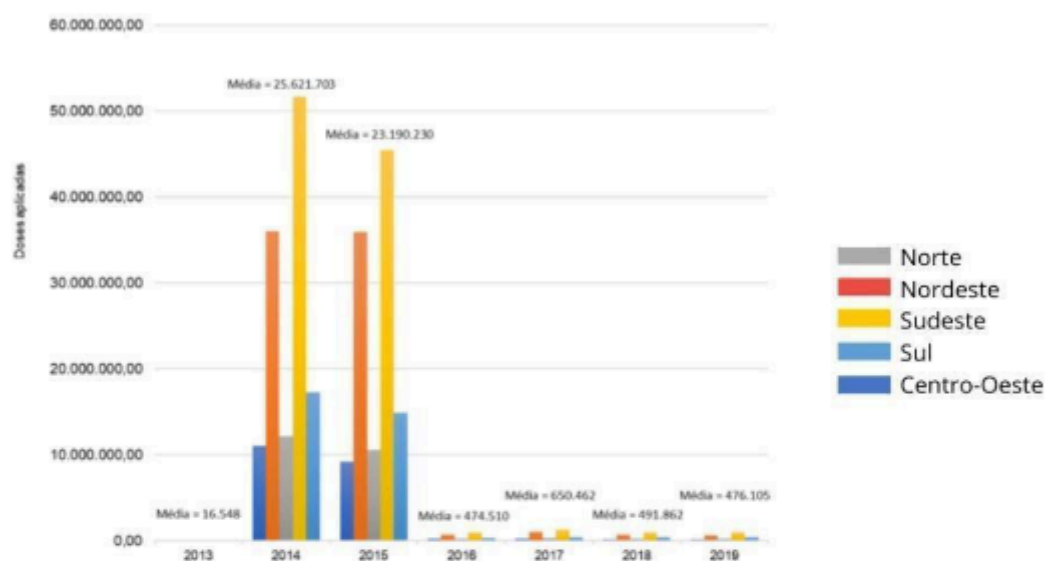
Figura 2. Relação entre o diagnóstico de neoplasia maligna do colo uterino (C53) e formas de tratamento entre as regiões do Brasil.



A Figura 3 mostra um aumento nas doses aplicadas da vacina quadrivalente feminina para HPV a partir de 2014 (ano que corresponde ao início da campanha de vacinação contra HPV), com média de aproximadamente 25 ± 17 milhões de doses, e estendendo-se até 2015 com média de 23 ± 16 milhões de doses. De 2016 em diante, a média de doses aplicadas reduziu aproximadamente 98% (cerca de 474.510 ± 323.248 a 650.462 ± 471.010 doses aplicadas), porém ainda permanecendo superior ao ano de 2013 (média de 16.548 ± 30.395 doses). Esse declínio brusco das doses aplicadas está relacionado diretamente com as características de aplicação desse imunobiológico, que deve ocorrer em três doses aplicadas em um intervalo de 8 meses (PINTO *et al.*, 2018). As regiões que apresentaram a maior quantidade de doses aplicadas foram a região

Sudeste (com 51 milhões de doses em 2014 e 45 milhões em 2015) e a região Nordeste (com 35 milhões de doses em 2014 e em 2015).

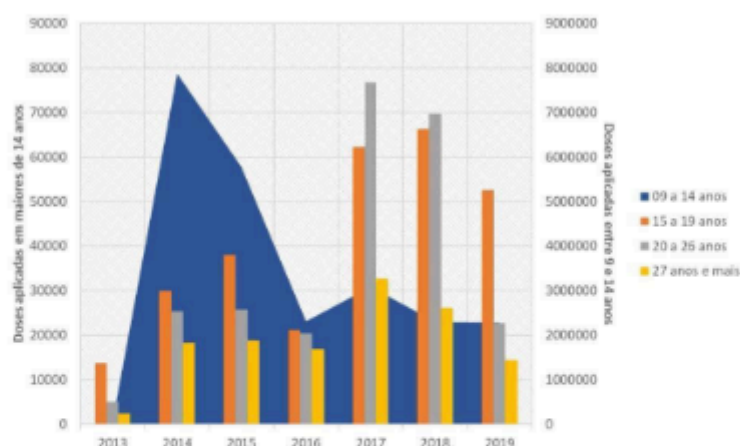
Figura 3. Doses aplicadas da vacina quadrivalente feminina para HPV por região.



Nota-se nas Figuras 1 e 2 que o aumento dos diagnósticos de C53 na faixa etária mais atendida pela campanha de vacinação (9 a 26 anos) foi mais atenuado nos anos 2014 e 2015, quando o número de doses aplicadas da vacina quadrivalente para HPV foi maior (Figura 3). Essa relação estatisticamente significativa entre os diagnósticos registrados de neoplasia maligna do colo do útero (C53) e as doses aplicadas da vacina feminina para o HPV foi confirmada pelo teste de Qui-quadrado ($p < 0,05$).

Além disso, o teste de Qui-quadrado também revelou relação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as doses aplicadas da vacina feminina para o HPV e os tratamentos realizados para pacientes com C53, que diminuíram gradativamente a partir de 2014, como pode ser observado na Figura 2. Ao segmentarmos os dados por idade, notamos que a faixa etária de 9 a 26 anos teve o maior número de doses aplicadas durante os anos mais intensos de vacinação (2014 e 2015), com destaque para a faixa entre 9 e 14 anos, que representou 97% dos registros. Já a faixa etária com menor número de doses aplicadas foi a maior de 27 anos, representando apenas 0,5% dos registros (Figura 4).

Figura 4. Doses aplicadas da vacina quadrivalente feminina para HPV por faixa etária.



Apesar do impacto positivo da vacina sobre o diagnóstico e modalidades terapêuticas registradas durante o período analisado, nota-se um aumento no número de diagnósticos em todas as regiões a partir de 2017, acompanhado de uma redução do número de tratamentos registrados, especialmente para a faixa etária menos coberta pela campanha de vacinação (acima de 27 anos), como mostram as Figuras 1 e 2.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos a partir dos testes estatísticos nos permitem concluir que a campanha de vacinação iniciada em 2014 teve um impacto positivo sobre os diagnósticos de neoplasia maligna do colo uterino (C53) e também sobre os registros de tratamentos realizados para este diagnóstico. Todavia, o aumento no número de diagnósticos de C53 em mulheres acima de 27 anos de todas as regiões do Brasil a partir de 2017 demonstra que é de suma importância repensar uma estratégia de imunização para as mulheres nessa faixa etária além de estimular o desenvolvimento e implementação de mais formas de tratamento para o câncer de colo uterino.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Divisão de Detecção Precoce e Apoio à Organização de Rede. Diretrizes brasileiras para o rastreamento do câncer do colo do útero. – 2. ed. rev. atual. – Rio de Janeiro: INCA, 2016.

CROSBIE, E. M.; EINSTEIN, M. H.; FRANCESCHI, S.; KITCHENER, H. C. Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Lancet*. 382, 289-299, 2013.

DE VILLIERS, E-M. Cross-roads in the classification of papilomaviruses. *Virology*, 2013.

FERRAZ, L. C.; SANTOS, A. B. R.; DISCACCIATI, M. G. Ciclo celular, HPV e evolução da neoplasia intraepitelial cervical: seleção de marcadores biológicos. J. Health Sci. Inst, 2012.

Gastos Federais em Oncologia. Observatório de Oncologia, 2018. Disponível em: <https://observatoriodeoncologia.com.br/gastos-federais-em-oncologia/>. Acesso em: 02/10/2023.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2021: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde. 2020.

JUNG, H. S.; RAJASEKARAN, N.; JU, W.; SHIN, Y. K.; Human Papillomavirus: Current and Future RNAi Therapeutic Strategies for Cervical Cancer. J. Clin. Med. 4, 1126-1155. 2015.

MUÑOZ, N.; BOSCH, F. X.; SANJOSE, S.; HERRERO, R.; CASTELLSAGUÉ, X.; SHAH, K. V.; SNIJDERS, P. J. F.; MEIJER, C. J. L. M. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. N Engl J Med. 348:518-527, 2003.

PINTO, L.A.; DILLNER, J.; BEDDOWS, S.; UNGER, E.R. Immunogenicity of HPV prophylactic vaccines: Serology assays and their use in HPV vaccine evaluation and development. Vaccine. 2018 Aug 6;36 (32 Pt A): 4792-4799.

RSTUDIO TEAM. RStudio: Integrated Development Environment for R. Boston, MA. Disponível em <http://www.rstudio.com>. Acesso em 30 de setembro de 2021.

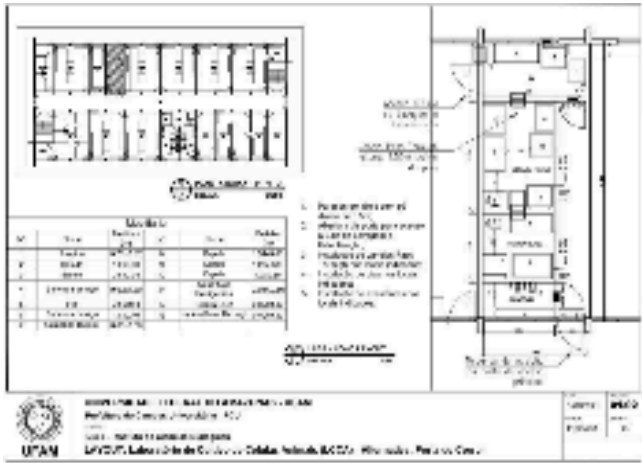
SALINAS-MONTALVO, A. M.; SUPRAMANIAM, A.; MCMILLAN, N. A.; IDRIS, A. RNA-based gene targeting therapies for human papillomavirus driven cancers. Cancer Letters, 523, 111-120, 2021.

SANTOS, J. G. C. & DIAS, J. M. G. (2018). Vacinação pública contra o papilomavirus humano no Brasil. Rev Med Minas Gerais, 28(1), 1-7.

SILVEIRA, L. T.; CARDOSO, G. D. M.; LIMA, D. C.; TEIXEIRA, A. M.; de OLIVEIRA KRAUSS, G. P.; da CRUZ RAMOS, M. L. C. & de PÁDUA NOGUEIRA, M. (2022). Avaliação dos custos relacionados às medidas preventivas e ao tratamento do câncer de colo de útero no Brasil. Brazilian Journal of Health Review, 5(2), 6550-6569.

WILD, C.P.; WEIDERPASS, E.; STEWART, B.W. editors (2020). World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <http://publications.iarc.fr/586>. Licence: CC BY-NC-ND 3.0 IGO.

8.6 Adaptações do Laboratório de Cultura de Células Animais



8.7 Certificado de Registro de Programa de Computador do *Degenerate Bases*

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA, COMÉRCIO E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
DIRETORIA DE PATENTES, PROGRAMAS DE COMPUTADOR E TOPOGRAFIAS DE CIRCUITOS

Certificado de Registro de Programa de Computador

Processo Nº: **BR512024000042-9**

O Instituto Nacional da Propriedade Industrial expede o presente certificado de registro de programa de computador, válido por 50 anos a partir de 1º de janeiro subsequente à data de 25/05/2022, em conformidade com o §2º, art. 2º da Lei 9.609, de 19 de Fevereiro de 1998.

Título: Degenerate Bases - Gerador de sequências de oligonucleotídeos baseadas em uma sequência com bases degeneradas

Data de publicação: 25/05/2022

Data de criação: 24/04/2022

Titular(es): ROBERTO ALEXANDRE ALVES BARBOSA FILHO; PAULO VINÍCIUS CASTRO GALVÃO; WHENDEL MESQUITA DO NASCIMENTO; SPARTACO ASTOLFI FILHO; CINTIA MARA COSTA DE OLIVEIRA

Autor(es): ROBERTO ALEXANDRE ALVES BARBOSA FILHO; PAULO VINÍCIUS CASTRO GALVÃO; WHENDEL MESQUITA DO NASCIMENTO; SPARTACO ASTOLFI FILHO; CINTIA MARA COSTA DE OLIVEIRA

Linguagem: C++

Campo de aplicação: BL-01; BL-02; SD-09

Tipo de programa: GI-04; IT-03

Algoritmo hash: SHA-512

Resumo digital hash:

9109586884f5814cd5cdd662c18d2bb353f7ef3d9dc478d932873a28c42c2fb1aac727d12fca48ba6ebb0e3563ea56f0cae
c6b6cadab1ca77facbb8a6e105b5

Expedido em: 16/01/2024

Aprovado por:
Carlos Alexandre Fernandes Silva
Chefe da DIPTO

8.8 Descrição e código do software *Degenerate Bases*

O algoritmo do programa foi desenvolvido com uma pseudo-linguagem de programação, onde o protótipo foi escrito em Python 3.8.5 e a versão final em C++, utilizando inicialmente o editor de texto “Sublime Text” em Linux e posteriormente o “Visual Studio Community 2019”. Foram utilizadas as bibliotecas padrões: filesystem, sys/stat, algorithm, iostream, fstream, sstream, chrono, vector, cmath e string.

Os tipos de bases degeneradas foram nomeados de acordo com a nomenclatura oficial da IUPAC (2021) e classificados de acordo com o número de possíveis bases nitrogenadas produzidas associadas a elas. Essas bases foram classificadas como: “bases normais”, “bases duplas”, “bases triplas”, “base quádrupla”, conforme a tabela abaixo:

Base	Tipo
A, C, T, G, Gaps	Única
W, Y, M, K, S, R	Dupla
H, B, V, D	Tripla
N	Quádrupla

Ao iniciar o programa, um conjunto de funções são chamadas com o intuito de criar os arquivos e diretórios necessários para execução do mesmo. Uma dessas funções é responsável por criar o arquivo de configurações (caso ele não exista), contendo todas as configurações do usuário, a fim de proporcionar certas funções personalizadas para usuários avançados.

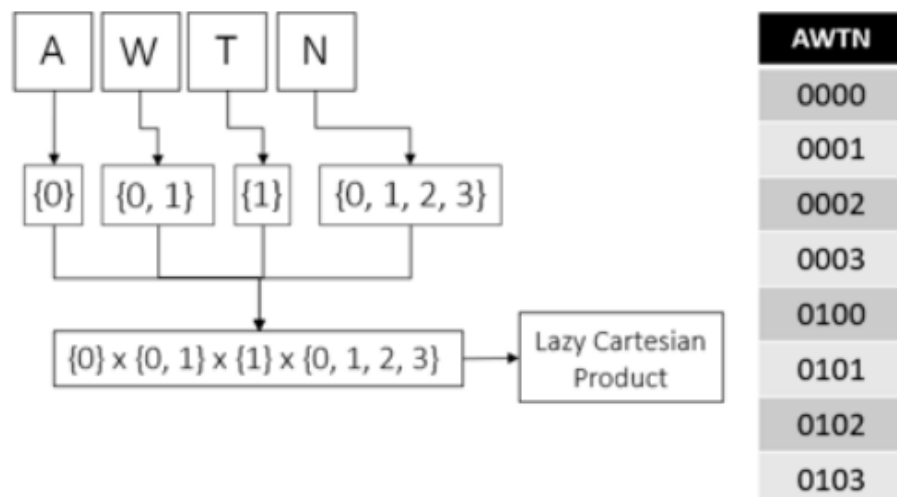
O processo de recolhimento da sequência inserida pelo usuário começa no módulo de “Entradas” e consiste em cinco etapas:

1. Consiste em comparações simples, a fim de alertar o usuário caso ele insira sequências que resultem em mais de 16 milhões de possibilidades, o que resulta em extensos tempos de processamento e arquivos de resultado grandes.
2. Responsável por quatro funções: garantir que todos os caracteres da sequência inserida estejam em maiúsculo; retirar (caso exista) caracteres que não representam nenhum tipo de base válida, e avisar o usuário se for o caso; contar a quantidade de tipos de bases degeneradas, bases nitrogenadas e gaps e calcular a quantidade de possibilidades prevista ao fim da execução do algoritmo.
3. Após garantir uma sequência executável, o programa segue para a etapa de permutação. O primeiro comando a ser executado é uma simples

comparação, que verifica se a base inserida pelo usuário tem pelo menos uma base degenerada. Esse caso foi apelidado como “base limpa” (Clean Base), e o processo subsequente, “Inserção de Base Simples” (Simple Base Insertion), onde o programa escreve a sequência inserida pelo usuário diretamente em um arquivo .fasta, visto que a execução do algoritmo permutador não é necessária.

4. Em seguida, ocorre a criação e implementação de um conjunto chamado “sets”, responsável por converter em conjuntos numéricos as bases nitrogenadas referentes às bases da sequência do usuário, que serão posteriormente utilizados no algoritmo principal do programa. No fim dessa etapa, há a criação de dois conjuntos utilizados no algoritmo principal: o conjunto “moduli”, contendo o tamanho dos conjuntos do “set”, e o conjunto “divisions”, onde estão incluídos elementos compostos pela multiplicação dos tamanhos dos conjuntos.
5. É a preparação do conjunto “chunks”, responsável pelo agrupamento dos resultados, que serão escritos em blocos de resultados. Essa etapa é primordial, pois confere alta velocidade na execução do programa

Após a realização das cinco etapas iniciais, o algoritmo principal é iniciado, que reconhecerá uma sequência de entrada do usuário e produzirá um conjunto de sequências baseado no produto cartesiano gerado a partir das bases da sequência, conforme a figura a seguir.



Código fonte

```

#include "pch.h"
#include "data.h"
#include "input.h"

void dgn::Input::SanitizeInput()
{
    EmptySequence();

    if (Data::invalidSequence)
        return;

    Capitalize();

    PurgeExcess();

    CountBases();

    AnyDegenerate();

    ComputeCartesianSize();
}

void dgn::Input::EmptySequence()
{
    Data::invalidSequence = Data::sequence.empty();
}

void dgn::Input::Capitalize()
{
    std::transform(Data::sequence.begin(), Data::sequence.end(),
Data::sequence.begin(), ::toupper);
}

void dgn::Input::PurgeExcess()
{
    // Getting only the bases:
    std::vector<char> bases;
    for (const auto& base : Data::validBases)
        bases.push_back(base.first);

    // Removing invalid bases:
    Data::sequence.erase(std::remove_if(Data::sequence.begin(), Data::sequence.end(),
[&bases](char& c) {
        return !(std::find(bases.begin(), bases.end(), c) != bases.end());
    }), Data::sequence.end());

    // Check whether there are any valid sequences:
    if (Data::sequence.empty())
        Data::invalidSequence = true;
}

void dgn::Input::CountBases()
{
    for (const auto& character : Data::sequence)
    {

```

```

        for (const auto& [baseName, base] : Data::validBases)
        {
            if (character == baseName)
                Data::baseSizes[base.baseSize] += 1;
        }
    }

void dgn::Input::AnyDegenerate()
{
    Data::anyDegenerate = (Data::baseSizes[4] > 0 ||
                           Data::baseSizes[3] > 0 ||
                           Data::baseSizes[2] > 0);
}

void dgn::Input::ComputeCartesianSize()
{
    uint_least32_t size = 1;

    if (Data::baseSizes[4] > 0) size *= (uint_least32_t)pow(4, Data::baseSizes[4]);
    if (Data::baseSizes[3] > 0) size *= (uint_least32_t)pow(3, Data::baseSizes[3]);
    if (Data::baseSizes[2] > 0) size *= (uint_least32_t)pow(2, Data::baseSizes[2]);

    Data::cartesianSize = size;
}

```

8.9 Certificado de Registro de Programa de Computador do *workflow Bot_Vina*

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA, COMÉRCIO E SERVIÇOS
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
DIRETORIA DE PATENTES, PROGRAMAS DE COMPUTADOR E TOPOGRAFIAS DE CIRCUITOS

Certificado de Registro de Programa de Computador

Processo Nº: **BR512024000037-2**

O Instituto Nacional da Propriedade Industrial expede o presente certificado de registro de programa de computador, válido por 50 anos a partir de 1º de janeiro subsequente à data de 01/07/2023, em conformidade com o §2º, art. 2º da Lei 9.609, de 19 de Fevereiro de 1998.

Título: Workflow para automatização de docking molecular de proteínas com compostos bioativos

Data de publicação: 01/07/2023

Data de criação: 01/05/2023

Titular(es): ROBERTO ALEXANDRE ALVES BARBOSA FILHO; WHENDEL MESQUITA DO NASCIMENTO; SPARTACO ASTOLFI FILHO; CINTIA MARA COSTA DE OLIVEIRA; ADA JAMILE GOMES DE OLIVEIRA BRASILEIRA; MAYANNA LAGO COELHO

Autor(es): ROBERTO ALEXANDRE ALVES BARBOSA FILHO; WHENDEL MESQUITA DO NASCIMENTO; SPARTACO ASTOLFI FILHO; CINTIA MARA COSTA DE OLIVEIRA; ADA JAMILE GOMES DE OLIVEIRA; MAYANNA LAGO COELHO

Linguagem: PYTHON

Campo de aplicação: BL-01; BL-07; SD-09

Tipo de programa: GI-04; IT-03; SM-01; TC-01

Algoritmo hash: SHA-512

Resumo digital hash:

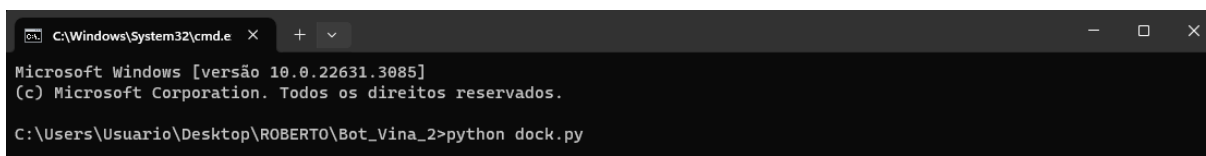
672ec389be3b3dbcbbaa3d5b08eaa0d6db2b533e1c6f1251e8d4459d9d1dd3289252446ade337796e976a1627f71475d240dc65606207773213b0c44e97b97629

Expedido em: 16/01/2024

Aprovado por:
Carlos Alexandre Fernandes Silva
Chefe da DIPTO

8.10 Descrição e código do *workflow Bot_Vina*

Para iniciar o programa, o usuário deve executar o comando pelo terminal, conforme a figura abaixo.



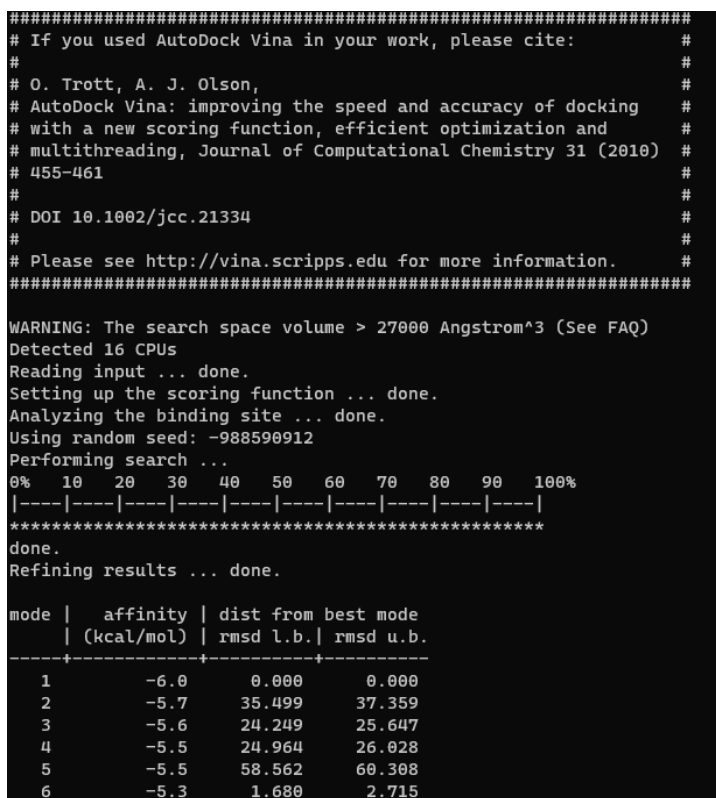
```
C:\Windows\System32\cmd.exe
Microsoft Windows [versão 10.0.22631.3085]
(c) Microsoft Corporation. Todos os direitos reservados.

C:\Users\Usuario\Desktop\ROBERTO\Bot_Vina_2>python dock.py
```

Após iniciado, o algoritmo do programa importa as bibliotecas `os`, `re`, `pathlib`, `pygetwindow`, `datetime`, `time`, `os.path`, `shutil`, `csv` e `tkinter`, para manipular arquivos e pastas do sistema. Além disso, também são criados os arquivos 'ranking.csv', 'config.txt' e 'resultado.pdbqt', para salvar o ranking do resultado, as configurações do docking, e os arquivos tridimensionais do docking, respectivamente.

Em seguida, o usuário seleciona a pasta com os arquivos dos ligantes e o arquivo da proteína alvo, todos no formato .pdbqt, além de configurar também as coordenadas do sítio de interação da proteína alvo.

Após finalizar as configurações, o algoritmo iniciará o docking de cada composto da pasta com a proteína alvo, gerando um ranking com todas as possibilidades de interação do composto e sua respectiva energia de interação, como mostrado na figura a seguir.



```
#####
# If you used AutoDock Vina in your work, please cite:      #
#                                                           #
# O. Trott, A. J. Olson,                                    #
# AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking #
# with a new scoring function, efficient optimization and    #
# multithreading, Journal of Computational Chemistry 31 (2010) #
# 455-461                                                    #
#                                                           #
# DOI 10.1002/jcc.21334                                     #
#                                                           #
# Please see http://vina.scripps.edu for more information.   #
#####

WARNING: The search space volume > 27000 Angstrom^3 (See FAQ)
Detected 16 CPUs
Reading input ... done.
Setting up the scoring function ... done.
Analyzing the binding site ... done.
Using random seed: -988590912
Performing search ...
0% 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100%
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
*****
done.
Refining results ... done.

mode |  affinity | dist from best mode
    | (kcal/mol) | rmsd l.b. | rmsd u.b.
-----+-----+-----+-----
1      -6.0      0.000      0.000
2      -5.7     35.499     37.359
3      -5.6     24.249     25.647
4      -5.5     24.964     26.028
5      -5.5     58.562     60.308
6      -5.3      1.680      2.715
```

O algoritmo seleciona a melhor interação do ranking de cada composto e adiciona ao arquivo 'ranking.csv', como mostrado na figura abaixo.

Alvo,Ligante,Afinidade (kcal/mol),rmsd l.b,rmsd u.b
2ahx(A).pdbqt,NuBBE_1273.pdbqt,-6.0,0.000,0.000
2ahx(A).pdbqt,NuBBE_1556.pdbqt,-6.5,0.000,0.000
2ahx(A).pdbqt,NuBBE_1828.pdbqt,-6.1,0.000,0.000
2ahx(A).pdbqt,NuBBE_1829.pdbqt,-6.1,0.000,0.000

Código fonte

```

import os
import re
import pathlib
import pygetwindow
import datetime
import time
import os.path
import shutil
import csv
from csv import writer
from tkinter import filedialog
from tkinter.filedialog import askopenfilename
from datetime import date

ranking = 'ranking.csv'
config = 'config.txt'
out = 'resultado.pdbqt'
caminhodock = str(os.getcwd())

with open(ranking, 'w+') as r:
    r.write('Alvo,Ligante,Afinidade (kcal/mol),rmsd l.b,rmsd u.b')

print("\nSelecione a pasta de ligantes\n")
ligantesdir = filedialog.askdirectory()
caminholig = f'{os.path.dirname(ligantesdir)}/{os.path.basename(ligantesdir)}'
ligantes = os.listdir(str(ligantesdir))

print("\nSelecione a proteína\n")
protodir = askopenfilename()
caminhoprot = str(os.path.dirname(protodir))
prot = str(os.path.basename(protodir))

c_x = input("Insira a coordenada X da proteína ")
c_y = input("Insira a coordenada Y da proteína ")
c_z = input("Insira a coordenada Z da proteína ")
s_x = input("Insira a coordenada X da caixa ")
s_y = input("Insira a coordenada Y da caixa ")
s_z = input("Insira a coordenada Z da caixa ")

prottemp = f'{caminhodock}\\{prot}'
shutil.move(os.path.join(caminhoprot, prot), prottemp)

for f in ligantes:
    datarela = time.ctime(os.path.getmtime('relatorio.txt'))

    ligante = str(os.path.basename(f))
    ligtemp = f'{caminhodock}\\{ligante}'
    shutil.move(os.path.join(caminholig, ligante), ligtemp)
    time.sleep(5)

    with open(config, "w") as file:
        file.write(f'receptor = {prot} \nligand = {ligante} \n\nout = {out}\n\ncenter_x = {c_x}\ncenter_y = {c_y}\ncenter_z = {c_z}\n\nsize_x = {s_x}\nsize_y = {s_y}\nsize_z = {s_z}\n\nexhaustiveness = 24 \n\nnum_modes = 40\n\nenergy_range = 20')

```

```

time.sleep(5)

os.system('vina.exe --config config.txt --log relatorio.txt')
datarela2 = time.ctime(os.path.getmtime('relatorio.txt'))

while datarela2==datarela:
time.sleep(5)

def extrai_linha_txt(nome_arquivo: str, numero_linha: int):
    with open(file=nome_arquivo, mode='r', encoding='utf8') as fp:
        linhas = fp.read().splitlines()
    try:
        time.sleep(5)
        return linhas[numero_linha].split()
    except:
        time.sleep(10)
        return linhas[numero_linha].split()
try:
    time.sleep(5)
    linha26 = extrai_linha_txt(nome_arquivo='relatorio.txt', numero_linha=26)
except:
    time.sleep(5)
    linha26 = extrai_linha_txt(nome_arquivo='relatorio.txt', numero_linha=26)

remover1 = linha26.pop(0)
addprot = linha26.insert(0, prot)
addlig = linha26.insert(1, ligante)
linha26 = ','.join(linha26)

time.sleep(5)
with open('ranking.csv', 'a') as r:
    r.write("\n"+linha26)

time.sleep(5)
lig = f"{caminholig}\\{ligante}"
shutil.move(os.path.join(caminhodock, ligtemp), lig)
time.sleep(5)

print('docking com '+ligante+' concluído')

prot = f"{caminhoprot}\\{prot}"
shutil.move(os.path.join(caminhodock, prottemp), prot)
os.system('exit')

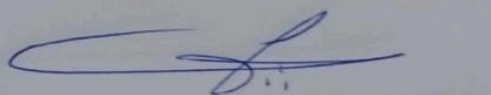
```

8.11 Declaração de orientação de iniciação científica: Paulo Castro Galvão



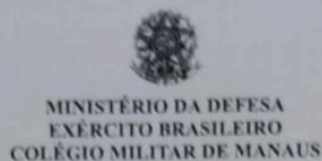
Eu, Coronel **Fábio Luiz da Costa Rangel**, Chefe da Divisão de Ensino do Colégio Militar de Manaus, informo para os devidos fins que **Roberto Alexandre Alves Barbosa Filho**, SIAPE 1923040, professor da carreira do Ensino Básico Técnico e Tecnológico deste Estabelecimento de Ensino, foi orientador do aluno **Paulo Vinícius Castro Galvão**, portadora do CPF 024.442.732-14, no projeto de Iniciação Científica intitulado **Degenerate Bases - Gerador de sequências de oligonucleotídeos baseadas em uma sequência com bases degeneradas**, iniciado em março de 2020 e finalizado em março de 2023.

Atenciosamente,



Fábio Luiz da Costa Rangel - Cel
Chefe da Divisão de Ensino do Colégio Militar de Manaus

8.12 Declaração de orientação de iniciação científica: Ada Jamile Gomes de Oliveira



Eu, Coronel **Fábio Luiz da Costa Rangel**, Chefe da Divisão de Ensino do Colégio Militar de Manaus, informo para os devidos fins que **Roberto Alexandre Alves Barbosa Filho**, SIAPE 1923040, professor da carreira do Ensino Básico Técnico e Tecnológico deste Estabelecimento de Ensino, é orientador da aluna **Ada Jamile Gomes de Oliveira**, portadora do CPF 704.010.852-60, no projeto de Iniciação Científica intitulado **Minerva: Análise in silico da viabilidade de uma terapia multi alvo para o câncer de mama**, iniciado em março de 2023 e com previsão de término em março de 2025.

Atenciosamente,



Fábio Luiz da Costa Rangel - Cel
Chefe da Divisão de Ensino do Colégio Militar de Manaus

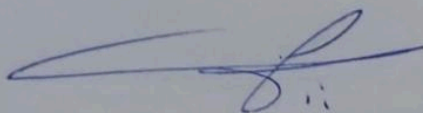
8.13 Declaração de orientação de iniciação científica: Mayanna Lago Coelho



MINISTÉRIO DA DEFESA
EXÉRCITO BRASILEIRO
COLÉGIO MILITAR DE MANAUS

Eu, Coronel **Fábio Luiz da Costa Rangel**, Chefe da Divisão de Ensino do Colégio Militar de Manaus, informo para os devidos fins que **Roberto Alexandre Alves Barbosa Filho**, SIAPE 1923040, professor da carreira do Ensino Básico Técnico e Tecnológico deste Estabelecimento de Ensino, é orientador da aluna **Mayanna Lago Coelho**, portadora do CPF 054485612-09, no projeto de Iniciação Científica intitulado **Minerva: Análise in silico da viabilidade de uma terapia multi alvo para o câncer de mama**, iniciado em março de 2023 e com previsão de término em março de 2025.

Atenciosamente,



Fábio Luiz da Costa Rangel - Cel
Chefe da Divisão de Ensino do Colégio Militar de Manaus