



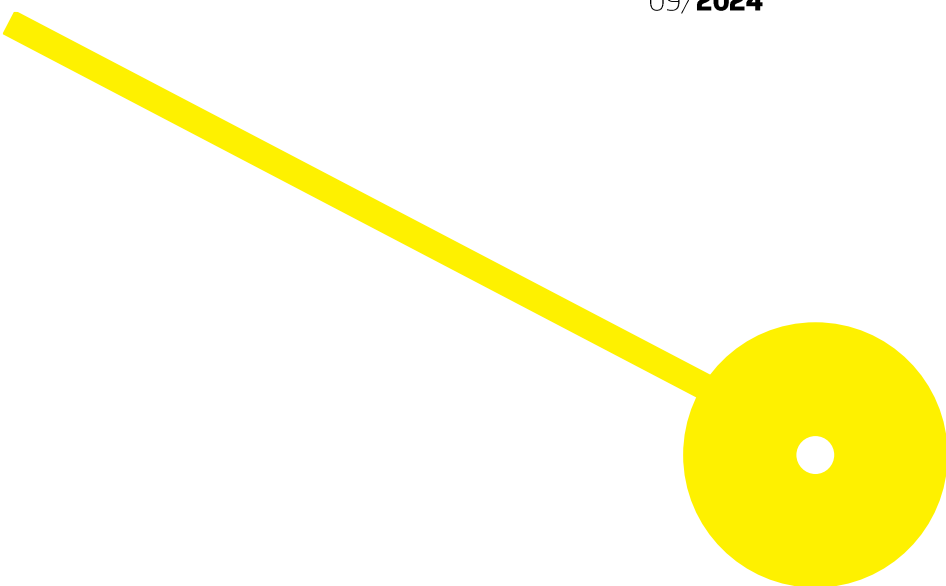
MESTRADO

ANÁLISES CLÍNICAS E SAÚDE PÚBLICA - RAMO DE MICROBIOLOGIA E SAÚDE PÚBLICA

O papel emergente dos RNAs não codificantes como biomarcadores dos cancros causados por HPV: do diagnóstico à terapêutica

Liliana Faria Alves

09/2024





**ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE**

**O papel emergente dos RNAs não codificantes como biomarcadores dos cancros causados
por HPV: do diagnóstico à terapêutica**

Autor

Liliana Faria Alves

Orientadores

Doutora/Joana Maria de Oliveira Santos/E2S-IPP

Mestre/Catarina Alexandre Da Rocha Rodrigues/IPO-Porto

Especialista/Maria Manuela Amorim de Silva e Sousa/E2S-IPP

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de **Mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública** – Ramo de **Microbiologia e Saúde Pública** pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

Agradecimentos

A conclusão deste capítulo da minha vida contou, não só com o meu esforço, mas também com o apoio incondicional de algumas das pessoas que me ajudaram a superar desafios e a crescer como pessoa e academicamente.

Primeiro, queria expressar a minha profunda gratidão às minhas orientadoras, que contribuíram de uma forma ativa para o desenvolvimento deste trabalho e por toda a paciência, pelo tempo dispensado, pela motivação que sempre me transmitiram e pelos ensinamentos.

Aos meus amigos, familiares e em especial ao meu namorado, por acreditarem sempre em mim quando achava que não era capaz, por terem sempre uma palavra reconfortante a dar nos momentos mais difíceis e por estarem sempre ao meu lado em cada passo deste percurso.

Aos meus professores, que ao longo do mestrado compartilharam os seus conhecimentos, ofereceram sempre apoio em todas as dúvidas que tive e fizeram parte da construção da minha formação enquanto profissional de saúde.

A todos vocês, o meu mais sincero obrigada, sem vocês nada disto era possível.

Foi um caminho exigente, cheio de obstáculos, mas finalmente está concluído!

Resumo

O vírus do Papiloma Humano (HPV) é o agente infeccioso responsável por mais infecções sexualmente transmissíveis, e está associado aos câncros do colo do útero, da cabeça e pescoço e anogenitais.

Um dos mecanismos de carcinogénese do HPV é a desregulação de RNA não codificantes (ncRNAs) através das oncoproteínas virais. Assim, a literatura tem demonstrado que os ncRNAs podem ser uma ferramenta clínica útil, tendo potencial para serem utilizados como biomarcadores para o diagnóstico, prognóstico e preditivos de resposta terapêutica.

O objetivo desta revisão sistemática da literatura é sistematizar e analisar o valor clínico dos ncRNAs em câncros relacionados com a infeção por HPV.

Utilizaram-se as bases de dados *PubMed*, *Web of Science*, *Scopus* e *Cochrane* e foram considerados artigos redigidos em inglês ou português, cujo objeto de estudo fosse o ser humano e que relacionassem ncRNAs como biomarcadores em câncros HPV-positivos.

Foram encontrados 1082 artigos e, após aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, foram mantidos 90. O número de artigos obtidos após o processo de avaliação da qualidade da evidência foi 55.

A análise detalhada das três vertentes de interesse clínico – diagnóstico, prognóstico e terapêutica – é fundamental para compreender a aplicabilidade clínica dos ncRNAs em diferentes contextos dos tumores malignos HPV-positivos.

Nos resultados obtidos, observou-se que o cancro do colo do útero é o cancro HPV-positivo mais estudado e que os miRs foram os ncRNAs mais evidentes, sendo que o miR-21 e o miR-34a foram os mais explorados e que apresentam um maior potencial como biomarcadores de diagnóstico e prognóstico.

Observou-se alguma heterogeneidade metodológica entre os resultados, o que destaca a necessidade de uma maior padronização entre as investigações que utilizam ncRNAs como presumíveis biomarcadores e assim, potenciar a integração dos ncRNAs na rotina clínica.

O tipo de amostra utilizada nos diversos estudos foi predominantemente de biópsias invasivas. Assim, a condução de mais estudos com técnicas de colheita menos invasivas (biópsias líquidas) é fundamental.

Palavras-chave: *Non-Coding RNA*; Human Papillomavirus; Cancers; Tumor Biomarkers; Human

Abstract

The Human Papillomavirus (HPV) is the infectious agent responsible for most sexually transmitted infections and is associated with cervical, head and neck and anogenitals cancers.

One of the mechanisms of HPV carcinogenesis is the deregulation of non-coding RNAs (ncRNAs) by viral oncoproteins. Thus, the literature has shown that ncRNAs can be a useful clinical tool, with the potential to be used as biomarkers for diagnosis, prognosis and predictive of therapeutic response.

The purpose of this systematic literature review is to assemble and analyse the clinical value of non-coding RNAs in HPV-related cancers.

The PubMed, Web of Science, Scopus and Cochrane databases searched for articles written in English or Portuguese, in which were studied human samples, and in which ncRNAs were studied as biomarkers of HPV-positive tumors.

In this review, a total of 1082 articles were found, and after applying the inclusion and exclusion criteria, 90 remained. The number of articles obtained at the end of the quality assessment process was 55.

A detailed analysis of clinical interest – diagnosis, prognosis and therapeutics – is essential to understand the clinical applicability of ncRNAs in different contexts of HPV-positive malignancies.

The results showed cervical cancer is the most studied HPV-positive cancer and that miRs are the most prominent ncRNAs, with miR-21 and miR-34a being the most investigated and showing the greatest potential as diagnostic and prognostic biomarkers.

There was some methodological heterogeneity among the results, highlighting the need for greater standardization among studies using ncRNAs as putative biomarkers and thus improving the application of ncRNAs into clinical routine.

The sample type used in the different studies was predominantly obtained by invasive biopsies. Given the promising results obtained when using non-invasive methods, conducting more studies on the ncRNA expression analysis in liquid biopsies is essential.

Keywords: *Non-Coding RNA*; Human Papillomavirus; Cancers; Tumor Biomarkers; Human

Índice

Lista de Siglas e Abreviaturas.....	VII
Índice de Figuras.....	IX
Índice de Tabelas.....	X
1. Introdução.....	1
1.1. Vírus do Papiloma Humano.....	1
1.2. Genoma e Proteínas Virais do HPV.....	2
1.3. Modo de Infecção por HPV.....	4
1.4. Prevenção, Diagnóstico e Tratamento dos câncros provocados pelo HPV.....	7
1.4.1. Câncer do Colo do Útero.....	8
1.4.2. Câncros Anogenitais.....	10
1.4.3. Câncer da Cabeça e Pescoço.....	11
1.5. RNAs não codificantes.....	12
1.5.1. ncRNAs Curtos.....	14
1.5.2. ncRNAs Longos.....	15
2. Questões de Investigação.....	16
3. Objetivo.....	17
4. Metodologia.....	17
4.1. Tipo de Estudo.....	17
4.2. Seleção das Palavras-Chave.....	17
4.3. Critérios para localização e seleção de estudos relevantes.....	17
5. Resultados.....	20
5.1. RNAs não codificantes como biomarcadores no diagnóstico e prognóstico dos câncros causados pelo HPV.....	22
5.1.1. Câncer do Colo do Útero.....	23
5.1.2. Câncros Anogenitais.....	26
5.1.3. Câncer da Cabeça e Pescoço.....	27
6. Discussão.....	30
7. Conclusão.....	37
Referências Bibliográficas.....	39
ANEXOS.....	54

ANEXO 1 – Representação Esquemática da Metodologia de Pesquisa (baseada no método PRISMA).....	54
ANEXO 2 – Domínios e Questões.....	55
ANEXO 3 – <i>Outputs</i> resultantes da revisão sistemática.....	56
ANEXO 4 – Resultados da Avaliação da Qualidade da Evidência.....	57
ANEXO 5 – Informação Resumo/Chave dos Artigos Seleccionados para Inclusão.....	60
ANEXO 6 – Poster apresentado no 6º Encontro Nacional de Jovens Investigadores em Oncologia.....	88

Lista de Siglas e Abreviaturas

AJCC – Comité Americano de Estadiamento do Cancro, do inglês *American Joint Committee on Cancer*

ASC-H – Células Pavimentosas Atípicas sem Exclusão de HSIL, do inglês *Atypical Squamous Cells, Cannot Rule Out High Grade Squamous Intra-epithelial Lesion*

ASC-US – Células Pavimentosas Atípicas de Significado Indeterminado, do inglês *Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance*

AUC – Área Sob a Curva, do inglês *Area Under the Curve*

BP – Pares-de-Base, do inglês *Base Pairs*

CIN – Neoplasia Cervical Intraepitelial, do inglês *Cervical Intraepithelial Neoplasia*

circRNAs – RNAs Circulares, do inglês *Circular RNAs*

DNA – Ácido Desoxirribonucleico, do inglês *Deoxyribonucleic Acid*

EGFR – Recetor do Fator de Crescimento Epidérmico, do inglês *Epidermal Growth Factor Receptor*

ER – Região Precoce, do inglês *Early Region*

GEO – Sem tradução para português, do inglês *Gene Expression Omnibus*

HPV – Vírus do Papiloma Humano, do inglês *Human Papillomavirus*

HSIL – Lesões Escamosas Intraepiteliais de Alto Grau, do inglês *High-grade Squamous Intraepithelial Lesions*

HSPG – Proteoglicanos de Sulfato de Heparano, do inglês *Heparan Sulfate Proteoglycans*

LCR – Região Longa Reguladora, do inglês *Long Control Region*

lncRNAs – ncRNAs Longos, do inglês *Long non-coding RNAs*

LR – Região Tardia, do inglês *Late Region*

LSIL – Lesões Escamosas Intraepiteliais de Baixo Grau, do inglês *Low-grade Squamous Intraepithelial Lesions*

MHC – Complexo Maior de Histocompatibilidade, do inglês *Major Histocompatibility Complex*

MSP – PCR Específico para Metilação, do inglês *Methylation-Specific PCR*

miRNAs/miRs – Sem tradução para português, do inglês *MicroRNAs*

mRNAs – Ácidos Ribonucléicos Mensageiros, do inglês *Messenger Ribonucleic Acids*

ncRNAs – Ácidos Ribonucléicos Não Codificantes, do inglês *Non-coding RNAs*

NILM – Negativo para lesão intraepitelial ou neoplasia maligna, do inglês *Negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy*

ORFs – Fases de Leitura Aberta, do inglês *Open Reading Frames*

qRT-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real de Transcrição Reversa, do inglês *Reverse Transcription Real Time Polymerase Chain Reaction*

piRNAs/piwiRNAs – Sem tradução para português, do inglês *Piwi-interacting RNAs*

PNV – Programa Nacional de Vacinação Português

pRb – Proteína do Retinoblastoma, do inglês *Retinoblastoma Protein*

RISC – Complexo de Silenciamento Induzido por RNA, do inglês *RNA-Induced Silencing Complex*

rRNAs – RNAs Ribossômicos, do inglês *Ribosomal Ribonucleic Acids*

SIL – Lesões Escamosas Intraepiteliais, do inglês *Squamous Intraepithelial Lesions*

siRNAs – Pequenos RNAs de interferência, do inglês *Small interfering RNAs*

sncRNAs – ncRNAs Pequenos/Curtos, do inglês *Small non-coding RNAs*

snoRNAs – Pequenos RNAs nucleolares, do inglês *Small nucleolar RNAs*

snRNAs – Pequenos RNAs nucleares, do inglês *Small nuclear RNAs*

TCGA – Sem tradução para português, do inglês *The Cancer Genome Atlas*

tRNAs – RNAs de transferência, do inglês *Transfer RNAs*

OMS – Organização Mundial de Saúde, do inglês *World Health Organization (WHO)*

Índice de Figuras

Figura 1 – Percentagem de casos de cancro por agente infeccioso no mundo (dados estimados em 2018), segundo WHO e IARC. Adaptado de (5).....	1
Figura 2 – Estrutura do genoma viral do género alpha do vírus do papiloma humano. Adaptado de (10).....	3
Figura 3 – Explicação do modo de infeção HPV e interação com as proteínas virais. Adaptado de (9).....	5
Figura 4 – Diagrama de Classificação das Classes de RNAs não codificantes. Adaptado de (33).	13
Figura 5 – Gráfico de Barras da Avaliação da Qualidade da Evidência (em percentagem).....	21
Figura 6 – Representação Esquemática da Metodologia de Pesquisa (baseada no método PRISMA).....	54
Figura 7 – Poster Científico 6º ENJIO.....	88
Figura 8 – Abstract do poster do 6º ENJIO.....	89

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Função das principais proteínas do HPV de alto risco (1,4,7,9,12).....	3
Tabela 2 – Termos de pesquisa desenvolvidos e filtros utilizados em cada base de dados eletrónica.....	18
Tabela 3 – Valor Clínico potencial dos ncRNAs no cancro do colo do útero.....	24
Tabela 4 – Valor Clínico potencial dos ncRNAs avaliados nos cancros anogenitais.....	27
Tabela 5 – Valor Clínico potencial dos ncRNAs no cancro da cabeça e pescoço.....	28
Tabela 6 – Resultados da Avaliação da Qualidade da Evidência.....	57
Tabela 7 – Cancro do Colo do Útero – Diagnóstico	60
Tabela 8 – Cancro do Colo do Útero – Diagnóstico e Prognóstico.....	72
Tabela 9 – Cancro do Colo do Útero – Prognóstico	78
Tabela 10 – Cancros Anogenitais – Diagnóstico.....	79
Tabela 11 – Cancros Anogenitais – Diagnóstico e Prognóstico.....	79
Tabela 12 – Cancro da Cabeça e Pescoço – Diagnóstico.....	80
Tabela 13 – Cancro da Cabeça e Pescoço – Diagnóstico e Prognóstico.....	83
Tabela 14 – Cancro da Cabeça e Pescoço – Prognóstico.....	87

1. Introdução

1.1. Vírus do Papiloma Humano

O vírus do Papiloma Humano (HPV) é um agente infeccioso da família *Papillomaviridae*, não envelopado, de pequenas dimensões e com uma cápside icosaédrica, que possui uma única molécula de ácido desoxirribonucleico (DNA), de cadeia dupla com cerca de 8000 pares-de-base (bp). O HPV caracteriza-se por ser epiteliotrópico, ou seja, infeta especificamente as células epiteliais cutâneas e/ou mucosas do ser humano, dispondo de potencial para induzir lesões proliferativas, tais como verrugas cutâneas. A via de transmissão mais comum do vírus é através do contacto sexual (oral, vaginal ou anal), mas, embora menos frequente, pode também ocorrer por via vertical, isto é, no momento do parto, da mãe para o filho (1–3).

O HPV é o microrganismo responsável por mais infeções sexualmente transmissíveis, o segundo agente infeccioso que promove o desenvolvimento de cancro mais prevalente no mundo e responsável por 5% de todos os cancros mundialmente (Figura 1). Cerca de 50 a 80% de todos os homens e mulheres são infetados pelo menos uma vez ao longo da sua vida, normalmente após pouco tempo do início da sua atividade sexual (2,4–6). A maioria destas infeções é eliminada pelo sistema imunitário (infeções transientes), mas infeções persistentes podem levar a alterações pré-malignas e progredir para cancro (2,6,7).

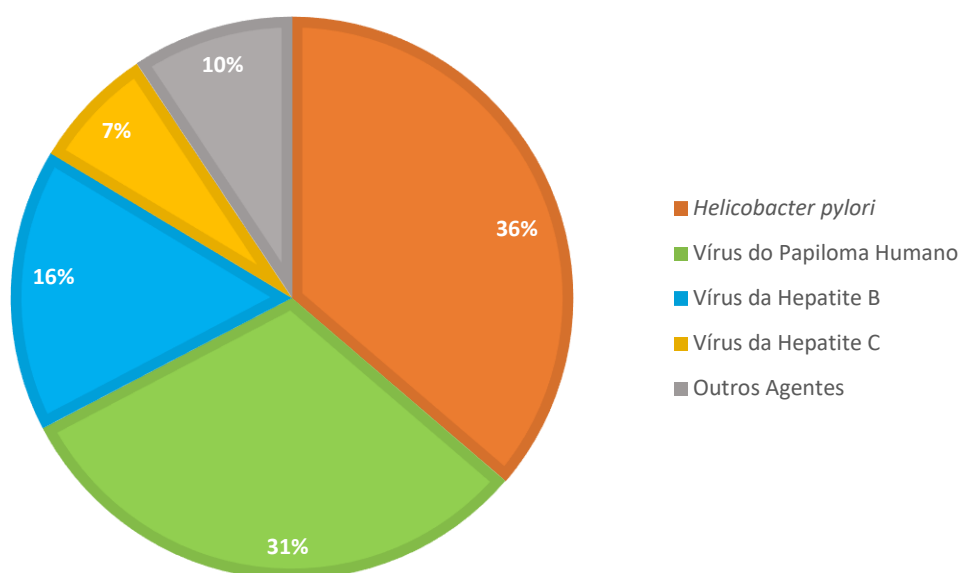


Figura 1 – Percentagem de casos de cancro por agente infeccioso no mundo (dados estimados em 2018), segundo WHO e IARC. Adaptado de (5).

Até ao momento foram identificados mais de 200 tipos de HPV que infetam o ser humano, caracterizados em baixo e alto risco, de acordo com o potencial de desenvolvimento de neoplasias malignas (1–4). Os tipos de baixo risco, como o 6 e 11, podem causar anomalias benignas nas células, verrugas anogenitais ou papilomas do trato respiratório. Já os tipos de alto risco, onde se destacam o 16 e 18, são considerados carcinogênicos para humanos e estão intimamente relacionados com o desenvolvimento de cancro. Apesar de o risco ser menor, há evidência científica que indica possibilidade de alguns tipos de baixo risco também potenciarem o desenvolvimento de cancro (4,6–8).

A infecção por HPV é o agente etiológico mais comum do cancro do colo do útero, sendo responsável por 99% dos casos. Este vírus também está associado aos câncros anogenitais (onde se incluem os câncros anais, vaginais, vulvares e do pênis) e da cabeça e pescoço, onde se destaca o cancro orofaríngeo, mas que pode afetar igualmente a cavidade oral, faringe, laringe, as glândulas salivares, os seios paranasais e a cavidade nasal (1–3,7,8).

1.2. Genoma e Proteínas Virais do HPV

O vírus do Papiloma Humano é dividido em cinco diferentes géneros (*alpha*, *beta*, *gama*, *mu*, *nu*), mediante as diferenças principalmente nas sequências de DNA no gene L1. Cada tipo, de baixo ou alto risco, encontra-se inserido dentro de cada um destes géneros (9–11).

O género *alpha* é o mais amplo, mais bem identificado e alvo de mais estudos. Este género contém tipos de HPV de alto e baixo risco capazes de infetar o epitélio cutâneo e mucoso, ao contrário dos restantes géneros que infetam somente o epitélio cutâneo (4,6,9).

Apesar das diferenças dentro de cada grupo de HPV, todos apresentam a mesma organização genética e proteínas em comum (4,10,11). Assim o vírus do Papiloma Humano é constituído por três principais regiões genómicas (Figura 2): uma região não codificante, a *Long Control Region* (LCR), também denominada *Upstream Regulatory Region* (URR); uma região precoce, a *Early Region* (ER) e uma região tardia, a *Late Region* (LR) (4,8,10,11).

A LCR é constituída por sequências reguladoras responsáveis por controlar a transcrição e replicação viral. Por sua vez, a ER compreende as fases de leitura aberta, *Open Reading Frames* (ORFs) E1, E2, E4 a E7, codificando proteínas com a mesma denominação, importantes para que a replicação e transcrição do vírus se realize. Já a LR contém os genes tardios, L1 e L2 que produzem proteínas necessárias à montagem dos virões e formação da cápside (1,8,11).

Apesar desta constituição geral entre os diferentes grupos de HPV, existem diferenças no tamanho das sequências de DNA e na quantidade de ORFs na sua estrutura. As ORFs E1, E2, L1 e L2, genes conservados entre os diferentes grupos, são cruciais para a replicação, escape ao sistema imune, sobrevivência e disseminação do vírus (9,10).

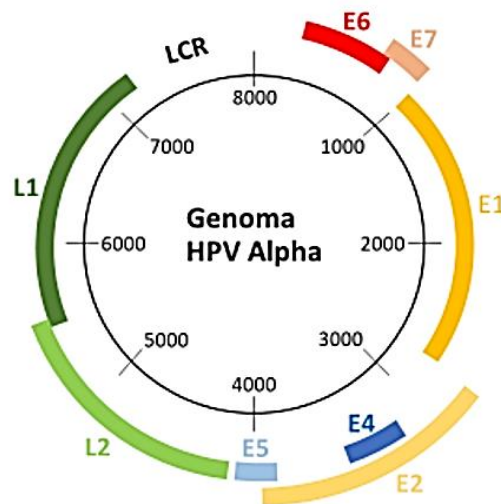


Figura 2 – Estrutura do genoma viral do género alpha do vírus do papiloma humano. Adaptado de (10).

Na Tabela 1 estão apresentadas as funções das proteínas *core* dos HPV de alto risco, vírus estes envolvidos no desenvolvimento de cancro pela cooperação conjunta das proteínas virais. Somente nos HPV de alto risco, as proteínas E6 e E7 conseguem adquirir um rearranjo capaz de se ligar às proteínas supressoras tumorais p53 e proteína do retinoblastoma (pRb), respetivamente. Estas ligações são fundamentais para a manutenção da transformação maligna induzida pelo HPV de alto risco (2,10,12).

Tabela 1 – Função das principais proteínas do HPV de alto risco (1,4,7,9,12)

Designação da Proteína do Vírus	Função da Proteína Viral
E1	É uma helicase de DNA, essencial para a replicação genómica do vírus. Está envolvida na ativação da proliferação e diferenciação celular, bem como no escape à resposta imunológica inata antiviral.
E2	Fator viral de transcrição, liga-se à E1 para facilitar a iniciação da replicação viral, tendo um papel fulcral no ciclo de vida do vírus, uma vez que permite a sincronização da replicação do DNA viral com o DNA da célula hospedeira. Controla negativamente a expressão das proteínas E6 e E7.

Tabela 1 (continuação)

Designação da Proteína do Vírus	Função da Proteína Viral
E4	Regula a expressão de L1 e L2. Interage com proteínas do citoesqueleto da célula para facilitar a libertação dos viriões.
E5	Oncoproteína encontrada maioritariamente no aparelho de Golgi e retículo endoplasmático. Promove a modulação do sistema imune, inibindo o transporte à superfície celular do complexo maior de histocompatibilidade I (MHC-I) e a proliferação celular pela formação de complexos ativadores de recetores de fatores de crescimento como o <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> (EGFR). Auxilia as proteínas E6 e E7 na transformação maligna das células hospedeiras.
E6	Oncoproteína que se liga à p53 degradando-a por ubiquitinação, inibindo a apoptose e permitindo a imortalização das células. Também causa perda de adesão e polaridade celular.
E7	Oncoproteína envolvida na degradação da pRb por ubiquitinação. Induz a entrada prematura na fase S, desregula o checkpoint G1/S do ciclo celular, levando a um aumento da proliferação celular.
L1	Proteína principal do capsídeo, liga-se aos recetores celulares antes da entrada na célula. É necessária para a montagem dos viriões e formação dos capsómeros.
L2	Proteína secundária do capsídeo, necessária ao encapsulamento do genoma e montagem dos viriões. Favorece a entrada e transporte das partículas virais na célula.

As oncoproteínas E5, E6 e E7 desregulam funções essenciais da célula, o que permite o desenvolvimento de vários *hallmarks* do cancro, conduzindo a uma acumulação de erros genéticos, proporcionando instabilidade genómica, levando a proliferação celular desmedida e a resistência à morte celular (1,4,8,12).

1.3. Modo de Infeção por HPV

O modo de infeção do HPV está intimamente relacionado com a renovação e diferenciação programada dos queratinócitos, infetando primeiramente as células epiteliais indiferenciadas e primitivas da camada basal por intermédio de micro-lesões, micro-fissuras ou, mais comumente, através dos folículos pilosos (1,9,10). No colo do útero e no ânus, os vírus de alto risco têm uma maior propensão para a zona de transformação e na orofaringe pensa-se que a infeção tem início nas fossas amigdalinas e na base da língua (6,8,9,11).

O vírus entra no interior dos queratinócitos pela ligação entre os recetores celulares, preferencialmente os proteoglicanos de sulfato de heparano (HSPG) encontrados na membrana celular ou na matriz extracelular, e a proteína L1 do vírus. Esta interação provoca uma alteração conformacional da estrutura do capsídeo que expõe a região N-terminal da proteína L2 na

superfície do vírus. Através da clivagem da região N-terminal pela furina (uma protease), um local específico da proteína L2 fica evidenciado. Este processo é necessário para a diminuição da afinidade da L1 ao recetor primário e para a ligação e reconhecimento do vírus por um segundo recetor celular (não HSPG) e conseqüentemente para o estabelecimento da infeção (9,12,13). O método de internalização do vírus após a ligação à célula e a formação das vesículas de endocitose, ainda não são bem compreendidos. Após a entrada do vírus na célula, ocorre a dissociação entre as proteínas do capsídeo, levando à descapsidação. Posteriormente, a proteína L2 auxilia na saída do genoma viral dos endossomas e no transporte até ao núcleo, onde decorre a replicação do HPV, iniciada pela expressão das proteínas E1 e E2 (Figura 3) (9,12). A replicação do DNA viral mantém-se, com a função essencial das proteínas *early* em sincronia com a replicação do DNA do hospedeiro, nas células basais e parabasais, com um baixo número de cópias e num estado epissomal, ou seja, permanecendo no núcleo da célula mas sem integração do DNA do vírus no genoma humano (8,9,12).

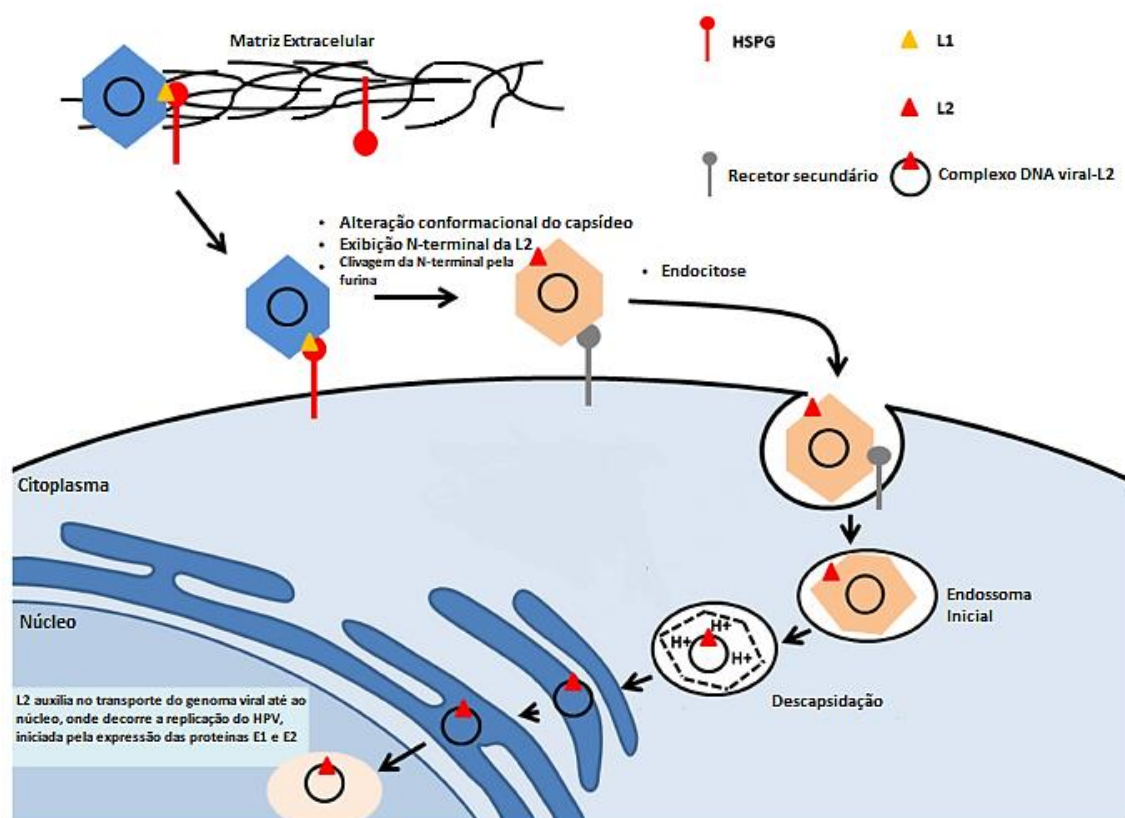


Figura 3 - Explicação do modo de infeção HPV e interação com as proteínas virais. Adaptado de (9).

Os queratinócitos não infetados migram para as camadas suprabasais e cessam o ciclo celular, suspendendo a replicação do seu DNA (9,12). Apesar deste acontecimento, a amplificação do DNA viral e a expressão exacerbada de proteínas do vírus (fase proliferativa) ocorre no epitélio

diferenciado e nas camadas superiores, pois a ação das proteínas virais E6 e E7 favorece a entrada das células infetadas novamente no ciclo celular e a inibição da apoptose, proporcionando a amplificação do genoma do vírus e o aumento do número de cópias virais por célula (1,9,11).

Finalizada a amplificação do genoma viral nas camadas superiores do tecido infetado e a saída das células do ciclo celular, a progressão da infecção requer a expressão das proteínas estruturais L1 e L2 para efetuar a encapsidação do genoma e montagem dos viriões, concluindo a produção de novas partículas virais. A maturação dos viriões é efetuada posteriormente e implica a acumulação de pontes de dissulfeto entre as proteínas L1, criando resistência à digestão proteolítica. Por fim, a libertação dos vírus ocorre por perda normal da integridade nuclear e citoplasmática das células infetadas, com a proteína E4 a auxiliar na transposição dos filamentos de queratina do epitélio (3,9,11,12).

Durante uma grande parte do ciclo de vida, o vírus permanece quase impercetível no hospedeiro, pois as células entram em morte celular naturalmente sem ocorrer citólise, impedindo a libertação de citocinas pró-inflamatórias e, assim, impossibilitando uma resposta imunológica eficaz por parte do organismo humano, prolongando o processo de infecção, podendo desenrolar uma infecção persistente e conseqüentemente verificar-se o desenvolvimento de lesões. O período entre o início da infecção e o aparecimento de lesões pode variar entre semanas e meses. Nos HPV de alto risco pode verificar-se uma infecção assintomática, com o genoma viral unicamente na camada basal, sem ocorrer doença, ou ser capaz de infetar as camadas epiteliais superiores com a expressão viral controlada à medida que as células se diferenciam, desenvolvendo assim uma lesão de baixo grau. Em casos mais graves pode irromper para uma lesão de alto grau, pré-cancerosa, com desregulação da expressão dos genes virais e potenciando o desenvolvimento de neoplasias malignas (1,10).

Na grande parte dos casos de tumores associados ao HPV de alto risco, não ocorre infecção produtiva, isto é, não existe produção de novos vírus. Através da quebra da cadeia dupla de ambos os DNAs viral e celular, desencadeada pela atividade das proteínas E6 e E7, as seqüências de DNA do vírus permanecem integradas no genoma do hospedeiro, desregulando a sua atividade e expressão. Esta integração promove a paragem da replicação viral mas é essencial para a promoção da carcinogénese, ocorrendo de forma frequente a fratura da zona ORF E2, que promove a perda de controlo da E2 na inibição do funcionamento da E6 e E7, levando a um incremento desregulado da expressão destas oncoproteínas virais. O HPV é necessário mas não

suficiente para a transformação maligna das lesões. Para além da persistência da infeção, integração viral e da atividade das oncoproteínas (fatores virais), que levam à disseminação de células com erros genéticos, a progressão da tumorigénese deve-se também a fatores ambientais e genéticos do indivíduo (4,8,14).

1.4. Prevenção, Diagnóstico e Tratamento dos cancros provocados pelo HPV

A prevenção da infeção por HPV e das suas manifestações, nomeadamente progressão de lesões pré-existentes para cancro, assentam atualmente em duas estratégias principais: a vacinação (prevenção primária) e testes de rastreio para deteção do vírus e lesões pré-malignas (prevenção secundária) (2,14).

A vacinação profilática contra o vírus do papiloma humano é o melhor método de prevenção e está indicada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para raparigas, e sempre que possível para rapazes, dos 9 aos 26 anos de idade, tendo uma maior eficácia quando administrada aos 11-12 anos, pois são mais eficazes antes da exposição inicial ao HPV, ou seja, previamente ao estabelecimento de qualquer infeção. Por este motivo a vacina, segundo a OMS, tem como alvo principal raparigas dos 9 aos 14 anos em uma ou duas doses da vacina, coincidindo com o intervalo etário que antecede o início da vida sexual (2,3,15). O Programa Nacional de Vacinação Português (PNV) inclui, desde outubro de 2020 com a atualização do programa, o sexo masculino na vacina HPV e este é realizado a crianças (sexo masculino e feminino) aos 10 anos de idade contra infeções de 9 genótipos de HPV (vacina nonavalente) em duas doses com intervalos de 6 meses entre ambas (16).

Os três tipos de vacinas, bivalente, quadrivalente e nonavalente, disponíveis protegem contra os dois tipos de alto risco mais comuns, HPV16 e HPV18 e são compostas por proteínas L1 recombinantes do vírus, diferentes para cada tipo de vírus incluído na vacina, que induzem alta produção de anticorpos neutralizantes e, conseqüentemente, uma forte imunidade. Estas são a Gardasil®4v, Gardasil®9v e Cervarix®2v. A Cervarix®2v engloba proteção contra o HPV16 e HPV18, sendo bivalente. Por sua vez, a Gardasil®4v é uma vacina quadrivalente e protege contra os tipos de baixo risco HPV6, HPV11 e de alto risco HPV16, HPV18. A vacina nonavalente, Gardasil®9v, tem como alvo nove tipos do vírus do papiloma humano, incluindo os tipos de HPV de baixo risco: HPV6 e HPV11 e de alto risco: HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV45, HPV52 e HPV58 (2,3,11,14).

As vacinas estão desenvolvidas e aprovadas para a prevenção do cancro do colo do útero, mas também auxiliam na prevenção de verrugas anogenitais, a maioria dos cancros anais, vaginais, vulvares e a evidência científica recente começa a demonstrar que pode, de igual forma, reduzir o risco do desenvolvimento do cancro orofaríngeo e do pênis (2).

Atualmente estão a ser realizados estudos no âmbito de desenvolver vacinas após a infeção se instalar no indivíduo, ou seja, vacinas para contexto terapêutico, como é o caso das que têm como foco as oncoproteínas E6 e E7 (3,11,17).

A prevenção secundária é importante para um processo contínuo de diminuição da incidência da infeção e as suas manifestações, iniciado com a vacinação. Atualmente, apenas existem exames de rastreio para o cancro do colo do útero. Outros cancros causados pelo HPV, como o caso do cancro orofaríngeo, não têm, para já, exames amplamente utilizados.

O diagnóstico e tratamento são afetados e diferem mediante a zona anatómica a ser intervencionada e o estadiamento da lesão ou tumor.

1.4.1. Cancro do Colo do Útero

De acordo com os dados da *Globocan 2022*, o cancro do colo do útero é o quarto tumor maligno com maior incidência (6.9%) e mortalidade (8.1%) nas mulheres a nível mundial (18).

Os fatores de risco para a progressão da infeção persistente para tumor maligno cervical englobam o comprometimento do sistema imunitário, o uso prolongado de contraceptivos orais, fumo do tabaco, a existência de coinfeção, múltiplos parceiros sexuais e diversas gestações (2,8).

Devido à implementação de testes de rastreio e vacinação nos países desenvolvidos, as taxas de incidência e mortalidade deste cancro têm vindo progressivamente a diminuir. Contudo, verifica-se que a realidade é oposta nos países menos desenvolvidos, onde ainda é necessário um maior acesso e investimento na prevenção, verificando por isso maiores taxas de incidência e mortalidade nestes países (2,4,8,18,19).

É recomendado como prevenção secundária, para o cancro do colo do útero, a realização de citologia cervical, vulgo "teste do Papanicolau", e/ou de teste HPV-DNA a mulheres, tanto para rastreio como auxiliar de diagnóstico, para que seja possível a identificação de mulheres assintomáticas com presença de lesões pré-malignas, permitindo estabelecer um diagnóstico e tratamento antecedentes ao desenvolvimento de cancro.

O teste HPV-DNA é um tipo de teste de rastreio mais sensível do que a citologia, sendo importante a realização dos dois procedimentos para a deteção precoce do cancro do colo do útero.

Os rastreios organizados a nível mundial tornam-se extremamente fundamentais já que reduzem, deste modo, em 50 a 80% os casos de cancro cervical (2,3,20). O Serviço Nacional de Saúde recomenda a execução da citologia cervical a mulheres entre os 20 e os 30 anos e até aos 60 anos de idade, de cinco em cinco anos (21,22). Após um teste positivo para a presença de HPV/teste de rastreio anormal, é realizada a colposcopia para inspeção da vulva, vagina e colo do útero; podendo ter, ou não, biópsia associada. A colposcopia é realizada recolhendo uma amostra de células cervicais, que posteriormente é enviada ao laboratório para análise. É utilizado o sistema de avaliação padronizado de Bethesda para classificação das lesões, mediante a sua gravidade, através da observação das células microscopicamente, pela perda da razão normal núcleo-citoplasma, alteração de tamanho e forma nuclear e visualização de atipia celular. O sistema Bethesda inclui a nomenclatura, por um processo crescente de atipia celular, "negativo para lesão intraepitelial ou neoplasia maligna" (NILM), "células pavimentosas atípicas de significado indeterminado" (ASC-US), "células pavimentosas atípicas sem exclusão de HSIL" (ASC-H), lesões escamosas intraepiteliais de baixo grau (LSIL) e lesões escamosas intraepiteliais de alto grau (HSIL) (14,19,20,23).

As HSIL correlacionam-se com achados histológicos de alto grau, devendo nestas utentes realizar-se tratamento excisional para prevenir uma evolução para tumor invasivo (20).

Outro tipo de prevenção secundária para este tipo de cancro é a realização de testes de HPV moleculares, onde ocorre a recolha de células cervicais, como na citologia, mas estas são testadas para a presença de DNA de um tipo oncogénico (de alto risco) do vírus do Papiloma Humano.

Apesar do aumento do sucesso da prevenção de cancro pela estratégia de rastreio existente, torna-se importante melhorar e desenvolver novos processos de deteção do cancro cervical. O teste de HPV pode levar a alguns falsos positivos aumentando sentimentos de ansiedade no encaminhamento para colposcopia, podendo levar a diagnósticos e tratamentos excessivos, e mesmo apresentando alta sensibilidade para o rastreio do cancro do colo do útero, os resultados positivos têm de ser confirmados com testes mais específicos e se possível que possam reduzir a realização de colposcopia de forma desnecessária. Também a citologia tem as suas desvantagens, por ser um teste menos sensível leva a uma menor deteção de lesões pré-

malignas, havendo a necessidade de uma frequência maior de testes citológicos ao longo das décadas para impedir a evolução para cancro. Assim, novas técnicas estão a ser estudadas e desenvolvidas para um aumento da fiabilidade, centrando-se no papel de biomarcadores e outros testes moleculares, como é o caso dos RNAs não codificantes (ncRNAs) (19,20).

A conização (biópsia em cone), que consiste na remoção de um fragmento de tecido do colo do útero, é um procedimento importante integrado tanto no diagnóstico de lesões como no seu tratamento, podendo ser suficiente como estratégia terapêutica para o carcinoma microinvasor. As mulheres com carcinoma invasor estabelecido são tratadas com radioterapia, quimioterapia e/ou cirurgia radical (histerectomia), dependendo da progressão vigente (24,25).

No caso do diagnóstico histológico, as lesões qualificam-se somente por escamosas intraepiteliais (SIL), outrora mencionadas como neoplasia cervical intraepitelial (CIN). As SIL têm uma escala de dois níveis, tal como na citologia, LSIL e HSIL. Já a CIN tinha uma escala de três níveis (CIN1, CIN2, CIN3). O CIN1 correspondia a displasia leve, o CIN2 a displasia moderada e o CIN3 a displasia severa ou carcinoma *in situ* (7,14).

Os exames de imagem são também essenciais para auxílio no diagnóstico e avaliação do tratamento a efetuar (26).

1.4.2. Cancros Anogenitais

Os cancros anogenitais incluem os cancros anais, vulvares, vaginais e do pénis e uma percentagem variável destes cancros esta associada aos HPV de alto risco. Estes tipos de cancros têm taxas de incidência menor do que o cancro do colo do útero mas, nos últimos anos, têm vindo a aumentar (27).

A prevenção secundária, pela deteção do DNA, torna-se fundamental para os cancros anogenitais. No entanto, em Portugal, não existe a execução deste tipo de rastreios neste grupo de cancros (28). O rastreio com recurso à citologia é importante para os cancros anais em grupos de alto risco. Nos restantes tipos de cancros anogenitais (vulvares, vaginais e penianos) não existe evidência que fundamente a sua utilização. No entanto, em mulheres submetidas a citologia para despiste de cancro cervical podem detetar-se, também, lesões pré-malignas vulvares e vaginais (27,29).

O argumento a favor da triagem citológica para este tipo de cancros fundamenta-se na taxa de sucesso na deteção do cancro cervical, no entanto, existem ainda poucos estudos que sustentem que o *screening* reduz a incidência de cancros anogenitais. Assim, é importante haver mais

estudos clínicos nesta área e a pesquisa e implementação de biomarcadores para a prevenção da progressão tumoral destes tumores (29).

Os indivíduos positivos no rastreio citológico para cancro anal são encaminhados para colposcopia anal (anuscopia de alta resolução), com decisões médicas de tratamento baseadas no grau de desenvolvimento observado da lesão. A biópsia é realizada para confirmação do diagnóstico, com o auxílio de exames de imagem (27,29).

No tratamento de pequenas lesões bem diferenciadas, a excisão pode ser combinada (ou não) com quimioterapia ou radioterapia. No entanto para a maioria das lesões, a primeira linha de tratamento consiste em quimioterapia e radioterapia (27).

No caso dos cancros do pénis causados pela infeção por HPV, uma das estratégias de prevenção é a circuncisão, contribuindo para que a taxa de incidência da infeção diminua (29).

1.4.3. Cancro da Cabeça e Pescoço

O número de casos de cancro da cabeça e pescoço têm vindo a aumentar mundialmente, apesar da diminuição do consumo do tabaco e álcool. Este aumento, deve-se a maior taxa de infeção por HPV, particularmente nos casos de cancro orofaríngeo. Este subtipo de cancro da cabeça e pescoço está associado aos HPV, particularmente os de alto risco (30,31).

O cancro orofaríngeo associado ao HPV tem vindo a surgir de uma forma crescente, afetando, em maior número, indivíduos mais jovens, caucasianos e com vários parceiros sexuais e tem uma grande proporção de metástases regionais, pela capacidade dos linfócitos de transgredirem a membrana intermédia basal porosa, levando ao seu desenvolvimento sem a necessidade de danificar a membrana basal (31,32).

Dado o seu comportamento biológico e características distintas comparativamente a outros cancros relacionados ao HPV ou cancros orofaríngeos HPV-negativos, houve a necessidade de atualizar o sistema de estadiamento e o protocolo de tratamento desta classe de carcinomas. Este protocolo de estadiamento foi desenvolvido na oitava edição do *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) (33), não se aplica a outros cancros da cabeça e pescoço HPV-positivos além do orofaríngeo e tenta diminuir a longo prazo a toxicidade dos tratamentos realizados, através de doses mais baixas de quimioterapia e radioterapia. Verificou-se e foi descrito no protocolo que a maioria dos cancros orofaríngeos HPV-positivos têm um aumento da proteína p16, assim é possível com o auxílio da imunohistoquímica distinguir, nestas circunstâncias específicas, tumores malignos orofaríngeos HPV-negativos de tumores positivos para o referido vírus, sendo

fundamental no diagnóstico para caracterizar o tipo de cancro e seguir o protocolo adequado (31,32,34).

Apesar das campanhas de sensibilização para a vacinação terem mais enfoque para o cancro do colo do útero, vaginal e anal, existem já vários estudos que sugerem eficácia das vacinas contra o HPV neste grupo de tumores malignos. Contudo, devido ao facto do início da vacinação profilática ser relativamente recente, os estudos só serão confirmatórios dentro de 10 a 15 anos (30,31).

Testes citológicos, assim como testes moleculares para deteção do HPV, tornam-se desadequados para estes cancros, não sendo técnicas validadas e recomendadas nestes casos. As zaragoas ou lavados realizados em amostras da cabeça e pescoço podem não ter células suficientes para a deteção vírica, originando deste modo um número considerável de falsos-negativos, diminuindo drasticamente a sensibilidade. Relativamente às modalidades terapêuticas adotadas nos cancros de cabeça e pescoço, podem ser utilizadas a cirurgia, quimioterapia, radioterapia ou imunoterapia (30).

Os pacientes com carcinomas da cabeça e pescoço positivos para HPV têm melhor prognóstico e são mais sensíveis aos tratamentos do que aqueles que são negativos para este vírus (30–32).

1.5. RNAs não codificantes

Os ncRNAs são transcritos abundantes no genoma humano que não codificam proteínas. Nos últimos anos, os ncRNAs têm sido alvo de maior estudo, nomeadamente na revelação de novas classes de ncRNAs e novas funções, principalmente ao nível da patologia humana (35,36). Estes transcritos participam em diversos processos biológicos, quer fisiológicos, como a regulação da expressão genética, desenvolvimento e diferenciação celular e reparação de danos no DNA; como patológicos, tal como a proliferação desregulada, mecanismos de escape tumoral e invasão de tecidos (35–37).

A divisão dos ncRNAs pode ser realizada, mediante a sua função, em ncRNAs *housekeeping* e ncRNAs reguladores (Figura 4).

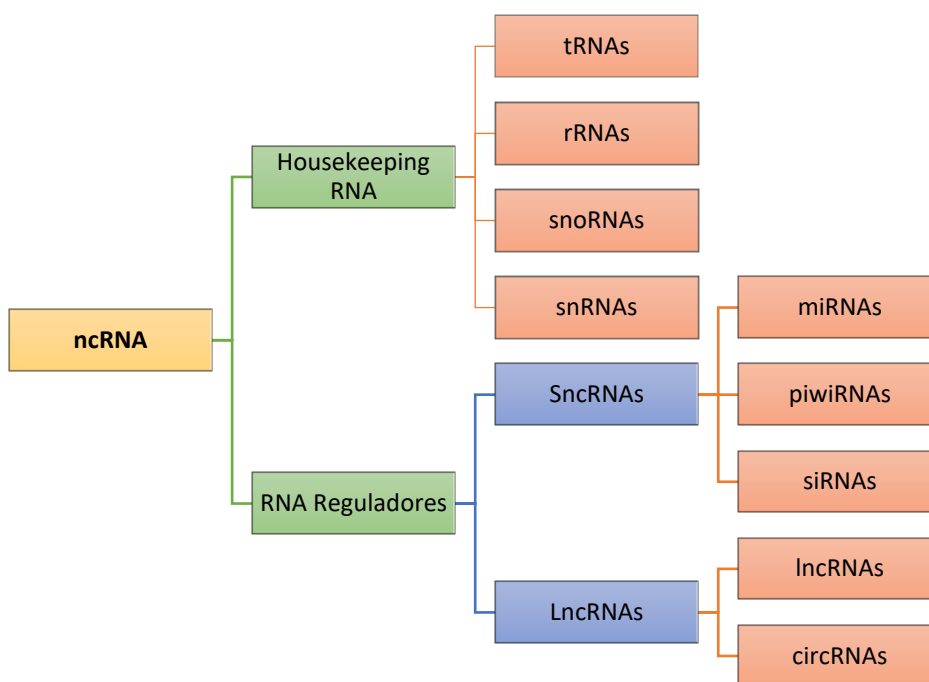


Figura 4 – Diagrama de Classificação das Classes de RNAs não codificantes. Adaptado de (33).

Os RNAs *housekeeping* variam de 50 a 500 nucleótidos, são moléculas que estão constitutivamente a ser expressas nas células humanas, sendo abundantes e fundamentais para a viabilidade celular, atuando nos processos de tradução do RNA em proteínas e no *splicing* (35,38–40).

Os ncRNAs *housekeeping* incluem os RNAs de transferência (tRNAs), RNAs ribossômicos (rRNAs), pequenos RNAs nucleares (snRNAs) e pequenos RNAs nucleolares (snoRNAs) (41,42). Os tRNAs apresentam uma estrutura secundária em forma de trevo com 70 a 90 nucleótidos e são indispensáveis durante o processo de tradução, decodificando as informações da sequência do ácido ribonucléico mensageiro (mRNA), fornecendo aminoácidos à cadeia polipeptídica que se está a gerar por reconhecimento específico de sequências de três nucleótidos do mRNA, auxiliando os ribossomas na produção de proteínas (38,39,41,43).

RNA ribossômico refere-se a um tipo de ácido ribonucléico presente em grande quantidade nas células, que se origina e matura nos nucléolos e faz parte da constituição dos ribossomas (sendo estes formados por rRNA e proteínas estruturais) (38,44). Os rRNAs contribuem para a ligação de fatores extra-ribossomais e proteínas associadas ao ribossoma, fazendo parte essencial da atividade enzimática da tradução de proteínas (39,41).

Os snRNAs correspondem a moléculas de ncRNA que influenciam no *splicing* do pré-mRNA. Estes ncRNAs formam complexos através da sua associação com proteínas, chamados

pequenas ribonucleoproteínas nucleares (snRNPs) e assim construindo o spliceossoma, cooperando na sua função de reconhecer intrões (35,39,41,45).

SnoRNAs são produzidos no nucleoplasma e que atuam no nucléolo das células eucarióticas, responsáveis por realizar modificações nos rRNAs e snRNAs, auxiliando deste modo nas interações químicas e ligações da formação e síntese do ribossoma e do spliceossoma (39,42,44). Estudos recentes indicam que os snoRNAs podem também interferir na modificação de tRNAs e mRNAs (46).

Os ncRNAs reguladores são transcritos ainda pouco compreendidos e muito heterogêneos entre si, produzidos durante certos estágios do desenvolvimento e diferenciação das células ou em resposta a alterações celulares, podendo regular a expressão genética de diferentes formas (35,38–40). As subclasses de ncRNAs reguladores, não *housekeeping*, são divididas de acordo com o número de nucleótidos que as compõem. Estas englobam os ncRNAs pequenos ou curtos (sncRNAs), com 20 a 200 nucleótidos, e os ncRNAs longos (lncRNAs), constituídos por mais de 200 nucleótidos (37,47).

1.5.1. ncRNAs Curtos

Dentro do vasto grupo dos sncRNAs, os grupos de RNAs mais explorados são os microRNAs (miRNAs/miRs), *piwi-interacting RNAs* (piRNAs/piwiRNAs) e pequenos RNAs de interferência (siRNAs) (38,42).

O conjunto mais conhecido e estudado é o dos microRNAs, que tem como principal função a regulação negativa da expressão genética através da sua ligação a mRNAs e, mediante a sua complementariedade, induzir a clivagem, degradação ou inibir a tradução dos mesmos (39,40,47).

Os miRs são transcritos pela RNA polimerase II ou III em longas moléculas de miRs primários (os pri-miRNAs), com fita dupla e estrutura em loop. No núcleo, os pri-miRNAs são processados por um complexo enzimático contendo a Drosha em miRNAs precursores (pré-miRNAs). Posteriormente, o pré-miRNA é transportado do núcleo até ao citoplasma através da proteína Exportina-5, onde é clivado pela Dicer e perde a estrutura em loop, formando RNAs de cadeia dupla. Esta cadeia dupla é composta por um miRNA funcional e por um miRNA complementar (miRNA*). O miRNA funcional associa-se ao complexo RNA-induced silencing complex (RISC) pela proteína Argonauta-2, formando o miRNA maduro. Este miRNA vai então encaminhar o RISC para os mRNAs alvo (48).

Os miRNAs, com 19 a 24 nucleótidos, associam-se à extremidade 3' dos mRNAs e têm a capacidade de realizar múltiplas ligações a vários mRNAs. Estes estão associados a variadas patologias como doenças cardiovasculares, cancro e doenças mentais (38,49).

Os piRNAs são RNAs não codificantes com comprimento entre 26 a 31 nucleótidos, que só são funcionais através da formação de complexos com as proteínas da família *Piwi* (35,39). Este grupo de RNAs, associados às proteínas *piwi*, influenciam no silenciamento de transposões durante o desenvolvimento das células germinativas (36,39). Estudos recentes têm demonstrado que este tipo de ncRNAs, além do seu papel nas células germinativas para a manutenção da estabilidade genómica, apresentam também expressão a nível das células somáticas, embora a um nível muito baixo, pelo que se evidencia a necessidade de uma maior investigação neste ramo (36,38).

Os siRNAs, pequenos RNAs de cadeia dupla, interferem na produção de proteínas específicas pela inibição da expressão de mRNAs alvo (35,41). Estas moléculas originam-se pela clivagem de RNA de cadeia dupla (dsRNA) pela enzima Dicer e são incorporadas ao RISC, para assim auxiliar no processo de degradação do mRNA e conseqüentemente no silenciamento genético (50). Os siRNAs têm de ser totalmente complementares ao mRNA alvo para o silenciamento genético ser eficaz (48).

1.5.2. ncRNAs Longos

Os RNAs não codificantes longos são transcritos reguladores constituídos por mais de 200 nucleótidos, tal como mencionado anteriormente. Estes ncRNAs são muito semelhantes em termos de estrutura aos mRNAs, tendo presente também uma estrutura cap na extremidade 5' e uma cauda poli-(A) na extremidade 3', supondo assim que estes ncRNAs são transcritos tal como os mRNAs mas não possuem capacidade de ser traduzidos em proteínas, possuindo um menor número de exões e um nível de expressão baixo (41).

Os lncRNAs regulam a expressão genética através do mecanismo de regulação *cis-*, ligando-se perto dos seus locais de transcrição, influenciando a expressão (por ativação ou repressão) ou o estado da cromatina de genes vizinhos no mesmo alelo, e *trans-*, afastando-se dos seus locais de transcrição e regulando a expressão de proteínas, genes e outras moléculas de RNA mais distantes, podendo inibir a tradução do mRNA e o *splicing* (35,37,41).

Dentro dos ncRNAs longos existe uma classe de RNAs não codificantes conhecida como RNA circular (circRNA). Os RNAs circulares são moléculas de RNA de cadeia simples que, tal como o nome indica, se fecham covalentemente, criando isoformas circulares (35,36,44). Estes

circRNAs apresentam uma grande variedade de tamanhos (diferindo desde os 100 até os 10000 nucleótidos) e podem ser formados no decurso de um processo de *back-splicing* de pré-mRNAs ou constituídos por exões, intrões, regiões não traduzidas e até tRNAs, apesar da sua biogénese não se encontrar totalmente elucidada (35). O *back-splicing* é um tipo de *splicing* onde são formados circRNAs pela ligação da extremidade 5' terminal de um exão a montante à extremidade 3' de um exão a jusante do pré-mRNA. A falta de uma estrutura 5' cap e uma cauda poli-(A) a este tipo de RNAs possibilita que estes sejam mais resistentes a uma possível degradação por RNases (51). Algumas das funções conhecidas destes RNAs são o bloqueio da atividade dos miRNAs (pela ligação entre ambos, impedindo a ação dos microRNAs aos mRNAs alvo), regulação do *splicing* alternativo e transcrição e participação na formação de complexos de proteínas (35,44).

A literatura científica tem evidenciado que os ncRNAs têm um papel fundamental no desenvolvimento de diferentes patologias oncológicas no ser humano, atuando como indutores ou supressores tumorais, dependendo do efeito modulador que exercem sobre os seus genes-alvo, com a sua desregulação a promover ou antagonizar os *hallmarks* do cancro (52,53).

Os ncRNAs podem ser detetados não só em tecido tumoral, mas também em diversos fluidos corporais, como sangue periférico, saliva e urina. De facto, num contexto tumoral, os ncRNAs são libertados em circulação pelas células tumorais (denominados ncRNAs circulantes) por, pelo menos, duas formas: acoplados a proteínas (*cell free*), ou empacotados em vesículas extracelulares, o que lhes confere grande estabilidade em diferentes condições, reforçando, de igual modo, o seu potencial como biomarcadores em biópsias líquidas (54,55).

Estudos têm vindo a constatar que tumores positivos para HPV têm expressão distinta de ncRNAs, comparativamente com tumores que são negativos para este vírus. Assim, a investigação começa a demonstrar interesse na análise da desregulação deste grupo de RNAs nos vários cancros procedentes da infeção por HPV, podendo vir a ser uma ferramenta clínica útil como biomarcadores para o diagnóstico e prognóstico nos cancros relacionados com a infeção por HPV, bem como potenciais alvos terapêuticos nestas patologias (56,57).

2. Questões de Investigação

A finalidade da presente dissertação é dar resposta às seguintes questões de investigação:

- “Será relevante perspetivar e valorizar os RNAs não codificantes como biomarcadores, no ser humano, para os vários tipos de cancros provocados pelo HPV, quer como auxiliar de diagnóstico, quer como preditivos de resposta?”
- “Existirá relevância futura destes ncRNAs como alvos terapêuticos neste grupo de tumores malignos?”

3. Objetivo

O objetivo desta revisão sistemática é realizar uma recolha abrangente e rigorosa das evidências disponíveis na literatura atual, com o intuito de sistematizar, organizar e avaliar criticamente os dados relativos ao papel dos RNAs não codificantes como biomarcadores em cancros induzidos pelo vírus HPV.

4. Metodologia

4.1. Tipo de Estudo

O tipo de estudo realizado trata-se de uma revisão sistemática da literatura.

4.2. Seleção das Palavras-Chave

As principais palavras-chave utilizadas na revisão sistemática como auxílio inicial para a pesquisa de artigos foram “*Non-Coding RNA*”; “*Human Papillomavirus*”; “*Cancers*”; “*Tumor Biomarkers*” e “*Human*”. No entanto, para estruturar uma pesquisa mais concreta dentro das bases de dados utilizadas, diferentes variações e conjugações destas palavras foram definidas.

4.3. Critérios para localização e seleção de estudos relevantes

Os termos de pesquisa selecionados e os filtros utilizados em cada base de dados para a estratégia de pesquisa encontram-se apresentados na Tabela 2.

A pesquisa e seleção dos artigos a incluir nesta revisão seguiram as orientações e metodologia PRISMA (58) e o protocolo de pesquisa foi registado na base de revisões sistemáticas PROSPERO (59), com a identificação CRD42023397761.

Na metodologia de pesquisa de artigos científicos relevantes foram utilizadas as bases de dados informáticas *PubMed*, *Web of Science*, *Scopus* e *Cochrane*, considerando artigos publicados desde janeiro de 2013 até julho de 2023, redigidos em Inglês ou Português e cujo objeto de estudo

fosse o ser humano, fazendo uso dos operadores booleanos para estabelecer uma relação entre os vários termos. Também na base de dados *PubMed*, aplicou-se o vocabulário *Medical Subject Headings (MeSH)* entre a combinação dos diferentes termos.

Tabela 2 – Termos de pesquisa desenvolvidos e filtros utilizados em cada base de dados eletrônica

Base de Dados	Termos de Pesquisa	Filtros Utilizados	Número de Artigos Obtidos
PubMed	(Non-Coding RNA OR ncRNA OR Untranslated RNA OR Long Non-Coding RNA OR lncRNA OR Long Untranslated RNA OR Small Non-Coding RNA OR sncRNA OR Small Untranslated RNA OR Short Non-Coding RNA OR microRNA[Mesh] OR miR OR Circular RNA OR circRNA OR Piwi-Interacting RNA OR piRNA OR piwiRNA OR Small Interfering RNA OR siRNA) AND (Human Papillomavirus Viruses [Mesh] OR HPV) AND Biomarker AND Cancer	Intervalo de Tempo (2013–2023) Idioma (Inglês, Português) Humanos	222
Web of Science	("Non-Coding RNA*" OR ncRNA* OR "Untranslat* RNA*" OR "Long Non-Coding RNA*" OR lncRNA* OR "Long Untranslat* RNA*" OR "Circular RNA*" OR circRNA* OR "Small Non-Coding RNA*" OR sncRNA* OR "Small Untranslat* RNA*" OR "Short Non-Coding RNA*" OR miRNA* OR microRNA* OR miR* OR "Piwi-Interacting RNA*" OR piRNA* OR piwiRNA* OR "Small Interfering RNA*" OR siRNA*) AND ("Human Papillomavirus*" OR HPV*) AND Biomarker* AND Cancer*	Intervalo de Tempo (2013–2023) Idioma (Inglês)	495

Tabela 2 (continuação)

Base de Dados	Termos de Pesquisa	Filtros Utilizados	Número de Artigos Obtidos
Scopus	("Non-Coding RNA*" OR ncRNA* OR "Untranslat* RNA*" OR "Long Non-Coding RNA*" OR lncRNA* OR "Long Untranslat* RNA*" OR "Circular RNA*" OR circRNA* OR "Small Non-Coding RNA*" OR sncRNA* OR "Small Untranslat* RNA*" OR "Short Non-Coding RNA*" OR miRNA* OR microRNA* OR miR* OR "Piwi-Interacting RNA*" OR piRNA* OR piwiRNA* OR "Small Interfering RNA*" OR siRNA*) AND ("Human Papillomavirus*" OR HPV*) AND Biomarker* AND Cancer*	Intervalo de Tempo (2013–2023) Idioma (Inglês, Português)	356
Cochrane	("Non-Coding RNA*" OR ncRNA* OR "Untranslat* RNA*" OR "Long Non-Coding RNA*" OR lncRNA* OR "Long Untranslat* RNA*" OR "Circular RNA*" OR circRNA* OR "Small Non-Coding RNA*" OR sncRNA* OR "Small Untranslat* RNA*" OR "Short Non-Coding RNA*" OR miRNA* OR microRNA* OR miR* OR "Piwi-Interacting RNA*" OR piRNA* OR piwiRNA* OR "Small Interfering RNA*" OR siRNA*) AND ("Human Papillomavirus*" OR HPV*) AND Biomarker* AND Cancer*	Intervalo de Tempo (2013–2023)	9

Os artigos recolhidos através das diferentes bases de dados eletrónicas foram transferidos para a ferramenta Rayyan (60) para auxiliar na sua seleção.

Nem todos os artigos obtidos demonstraram pertinência para o tema em estudo, pelo que foram excluídos os que se enquadraram nos critérios de exclusão, a seguir descritos.

Primeiramente, foram eliminados aqueles que se encontravam em duplicado nas bases de dados. De seguida, após a leitura do título e resumo, os seguintes critérios de exclusão foram considerados: serem revisões, livros, meta-análises, relatos de casos, protocolos, resumos de conferências, artigos retirados, comentários de autor/editor, não estabelecerem uma associação de pelo menos duas das palavras-chave, utilizarem amostras não humanas e/ou *in vitro*, não

relacionarem os ncRNAs como biomarcadores em câncros HPV-positivos e não avaliarem o valor diagnóstico, prognóstico ou terapêutico destes ncRNAs.

Após este processo, realizou-se a leitura integral das referências obtidas, fazendo, por fim, a remoção dos artigos que no seu conteúdo não forneceram elementos e dados essenciais, nem apresentaram considerações suficientes para o objetivo da revisão sistemática (ANEXO 1 e Figura 6).

De salientar que todos os artigos obtidos que fazem menção a câncros do colo do útero foram considerados HPV-positivos dada a etiologia deste tipo de tumores, como é referida na introdução desta revisão (1,3,7,8), à exceção daqueles que claramente constataram a presença de HPV-negativos nas coortes analisadas. Nestes casos, foram considerados para análise apenas os artigos que incluíram até 10% (inclusive) de casos de cancro do colo do útero HPV-negativos no número total de amostras, à exceção daqueles que analisaram separadamente as amostras HPV-positivas e negativas.

Para a avaliação da qualidade e robustez dos artigos elegidos (qualidade da evidência) e dada a heterogeneidade do valor dos biomarcadores analisados (diagnóstico, prognóstico e terapêutico), utilizou-se um sistema de classificação baseado na literatura disponível (61), adaptado ao tema e com condições pertinentes para a presente revisão sistemática. Os domínios e questões implementadas e avaliadas individualmente em cada estudo incluído estão referidas no ANEXO 2.

Todo o processo metodológico de inclusão e de avaliação da qualidade da evidência foi realizado de forma independente por duas investigadoras (Liliana Alves e Catarina Rodrigues) e as divergências foram discutidas e decididas com uma terceira investigadora (Joana Santos).

Os *outputs* resultantes do presente trabalho estão enunciados no ANEXO 3.

5. Resultados

A metodologia de pesquisa efetuada, realizada em julho de 2023, devolveu inicialmente 1082 artigos. No ANEXO 1 e Figura 6 encontra-se a representação esquemática da metodologia de pesquisa, baseada no método PRISMA, e o número de artigos conservados após cada fase deste processo. Neste passo, para o conseqüente processo de avaliação da qualidade da evidência, o número de estudos reunidos foi de 90.

Os resultados obtidos com a avaliação da qualidade da evidência para cada artigo estão sumariados no ANEXO 4, na Tabela 6 e os seus valores de percentagem representados na Figura 5.

Os domínios avaliados com a qualidade da evidência, apresentadas no ANEXO 2 e no Tabela 6, correspondem à população em estudo (pacientes com neoplasias malignas induzidas pelo HPV)(domínio 1), à avaliação do objetivo de estudo do artigo (domínio 2), à metodologia de deteção utilizada para o HPV e para o biomarcador utilizado em cada artigo (domínio 3) e por fim, com o domínio 4 referente à avaliação da análise estatística e demonstração de resultados.

Após este procedimento, o número final de artigos a serem explorados na revisão sistemática da literatura restringiu-se a 55, o que corresponde à classificação final baixa ou intermédia do risco de viés e a uma percentagem de 61% do total de artigos recolhidos.

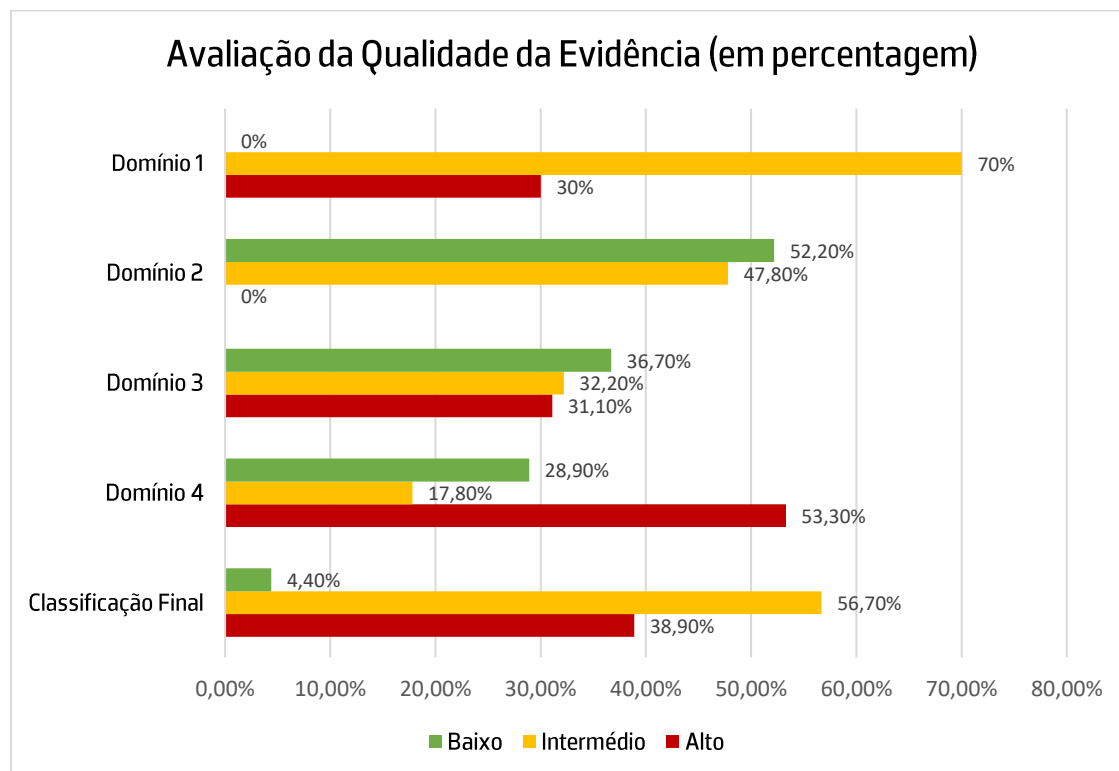


Figura 5 – Gráfico de Barras da Avaliação da Qualidade da Evidência (em percentagem)

De notar que, nos artigos que continham informação incompleta, foi realizada uma tentativa de contacto com os autores, a fim de solicitar a informação em falta.

As características retiradas de cada artigo foram: autor, data de publicação, país(es) da origem das amostras, grupo(s) controlo(s), localização/tipo(s) de amostra(s), biomarcador(es), expressão

do(s) biomarcador(es) no cancro, método de análise do(s) biomarcador(es), normalização de expressão, valor de p da expressão na(s) amostra(s) vs. controlo(s), área sob a curva (AUC), valor de p da *area under curve*, percentagens de sensibilidade e especificidade, medidas de associação – regressão de Cox, validação em diferentes coortes e por fim, o valor clínico do(s) biomarcador(es).

A informação e características chave dos artigos recolhidos foi compilada, de forma organizada e resumida, sob a forma de tabela (ANEXO 5) e procedeu-se à sua análise crítica.

5.1. RNAs não codificantes como biomarcadores no diagnóstico e prognóstico dos cancros causados pelo HPV

Os ncRNAs foram investigados como possíveis marcadores diagnóstico e prognóstico nos estudos incluídos. No entanto, de acordo com os critérios de inclusão e exclusão, bem como os critérios de qualidade da evidência estabelecidos, não foi identificado nenhum estudo que explorasse os ncRNAs como biomarcadores preditivos de resposta terapêutica.

Os resultados obtidos revelam uma distinção entre lesões cancerígenas e amostras benignas, demonstrando também a discriminação entre cancros HPV-positivos de cancros HPV-negativos nos três diferentes grupos de tumores malignos analisados.

Mediante a informação reunida e analisada a partir dos artigos obtidos, verificou-se que os grupos de ncRNAs estudados foram os miRNAs, lncRNAs, circRNAs e sncRNAs. No total, foram identificados e estudados 85 miRNAs, 22 lncRNAs, 5 circRNAs e 1 sncRNA, os quais foram avaliados de forma isolada ou em combinação, através de painéis de ncRNAs. Estes eventuais biomarcadores foram investigados em amostras de 21 países distintos, evidenciando a abrangência geográfica dos artigos e reforçando a relevância a nível global dos ncRNAs para a investigação e prática clínica.

Dos 55 artigos incluídos, a maioria avaliou a expressão dos ncRNAs a partir do método de Reação em cadeia da polimerase em tempo real de transcrição reversa (qRT-PCR). Para os casos em que foi realizada a análise de padrões de metilação de genes dos ncRNAs, os estudos recorreram ao tratamento das amostras com bissulfito para posterior realização de PCR ou de um PCR específico para metilação (MSP) para a execução de análises de padrões de metilação de genes dos ncRNAs. Alguns estudos utilizavam microarrays ou RNAseq para a obtenção de resultados em análises *in silico* de dados obtidos a partir de amostras biológicas.

O tipo de controlos endógenos utilizados para normalização dos resultados apresentou uma grande variabilidade entre os artigos. Enquanto algumas publicações optaram por fazer uso de somente um controlo endógeno, que variava de acordo com o estudo, outras investigações aplicaram múltiplos controlos endógenos na mesma tipologia de amostra, visando aumentar a confiabilidade dos dados. Adicionalmente, foram identificados artigos que não mencionaram quais os controlos endógenos que foram utilizados (16,4%), o que pode comprometer a comparação e a robustez dos seus resultados.

A natureza das amostras utilizadas difere consideravelmente entre os grupos de cancro, pois cada tumor maligno tem as suas particularidades, como diferentes zonas anatómicas e formas de colheita da amostra, o que influencia os resultados e interpretações, sendo por isso mencionada mais adiante nesta revisão sistemática.

Todos os ncRNAs referidos nos resultados da presente revisão sistemática evidenciam um valor de p estatisticamente significativo ($p < 0,05$), contribuindo para a relevância e validação estatística dos achados.

5.1.1. Cancro do Colo do Útero

Dentro dos artigos estudados e presentes no ANEXO 5, 42 focaram-se no estudo dos ncRNAs como biomarcadores no cancro do colo do útero, o que representa uma percentagem de 76,4% do total dos artigos. Nos artigos sobre este tipo de cancro, os ncRNAs foram extraídos de amostras de tecido tumoral fresco (57,1%), células esfoliadas cervicais (16,7%), soro (14,3%), tecido tumoral fixado em formalina e incluído em parafina (FFPE) (11,9%), bem como plasma (11,9%), amostras de citologia de base líquida (7,2%), vesículas extracelulares de plasma (4,7%), urina (2,4%) e muco do colo do útero (2,4%).

A maioria dos artigos concentrou-se em populações da China (54,7%). No entanto, também se observou uma variedade de publicações que investigaram amostras provenientes da Hungria, Portugal, Iraque, Coreia do Sul, Índia, Países Baixos, Irão, Japão, México, Rússia. Além disso, um artigo em específico recorre a amostras de quatro países europeus distintos para alcançar as suas conclusões, sendo estes: Escócia, Dinamarca, Eslovénia e Países Baixos. Adicionalmente, alguns estudos incluíram análises *in silico* de dados obtidos a partir de amostras biológicas extraídas de bases de dados amplamente conhecidas, como *Gene Expression Omnibus* (GEO) e o *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) (62).

Foram estudados 60 miRs, 2 circRNAs, 13 lncRNAs, 3 análises de padrão de metilação e 1 combinação entre um miR, um lncRNA e um mRNA. Os miRs e lncRNAs foram estudados isoladamente ou em combinações (63).

O valor clínico mais evidente dos possíveis biomarcadores ncRNAs em estudos que especificam o cancro do colo de útero é o diagnóstico, contabilizando 41 artigos (97,6%). Por outro lado, o número de estudos que investigam o valor provável prognóstico no cancro cervical totaliza apenas 11. Dentro destes, existe somente 1 estudo que se dedica exclusivamente a investigar isoladamente o valor clínico prognóstico dos ncRNAs no cancro do colo do útero. Cheng *et al.* conclui neste artigo em específico que a combinação dos lncRNAs LINC00619, FGF13-AS1, EMX2OS, WT1-AS, C9orf147 e LINC00908 é estudado com base num modelo prognóstico e este modelo está associado a pior sobrevivência global no grupo de pacientes de alto risco em comparação com os de baixo risco (64).

Na Tabela 3 estão representados quais os diferentes ncRNAs identificados no grupo de cancro do colo do útero, assim como o seu valor clínico analisado (valor diagnóstico e/ou prognóstico). Observou-se que o miR-21 e o miR-34a foram os biomarcadores mais explorados nos diferentes artigos do cancro do colo do útero.

Tabela 3 – Valor Clínico potencial dos ncRNAs no cancro do colo do útero

Referência(s)	ncRNA	Valor Clínico
miRNAs		
(65-70)	miR-21	Diagnóstico
(65,67,70-73)	miR-34a	Diagnóstico e Prognóstico
(71)	miR-27a	Diagnóstico
(71)	miR-196a	Diagnóstico
(71)	miR-203	Diagnóstico
(72,74)	miR-125b	Diagnóstico
(66,70,75,76)	miR-155	Diagnóstico
(66,74,77)	miR-9	Diagnóstico
(78)	miR-20a	Diagnóstico
(78)	miR-92a	Diagnóstico
(78)	miR-141	Diagnóstico
(78)	miR-183*	Diagnóstico
(78)	miR-210	Diagnóstico
(78,79)	miR-944	Diagnóstico e Prognóstico
(78)	Combinação miR-20a, miR-92a, miR-141, miR-183*, miR-210, miR-944	Diagnóstico
(70,73,80)	miR-218	Diagnóstico e Prognóstico
(67)	let7a	Diagnóstico
(67)	miR-146a	Diagnóstico
(67)	miR-95	Diagnóstico
(67)	miR-200b	Diagnóstico
(67)	miR-1	Diagnóstico
(67)	miR-3130	Diagnóstico

Tabela 3 (continuação)

Referência(s)	ncRNA miRNAs	Valor Clínico
(67)	miR-576-3p	Diagnóstico
(67-69)	miR-29a	Diagnóstico
(67)	miR-449b	Diagnóstico
(67)	miR-23b	Diagnóstico
(67)	miR-136	Diagnóstico
(67)	miR-19a	Diagnóstico
(67)	miR-222	Diagnóstico
(67)	miR-184	Diagnóstico
(67)	miR-17	Diagnóstico
(81)	miR-143	Diagnóstico e Prognóstico
(73,74)	miR-15b	Diagnóstico
(74)	miR-149	Diagnóstico
(74)	miR-375	Diagnóstico
(74)	Combinação miR-15b-5p, miR-375	Diagnóstico
(74)	miR-203a-3p	Diagnóstico
(63,77)	miR-192	Diagnóstico
(77,82)	miR-205	Diagnóstico
(70,82)	miR-145	Diagnóstico
(83)	miR-126-3p	Diagnóstico
(83)	miR-20b	Diagnóstico
(83)	miR-451a	Diagnóstico
(83)	miR-144-3p	Diagnóstico
(84)	miR-638	Diagnóstico
(84)	miR-521	Diagnóstico
(84)	miR-1914	Diagnóstico
(85)	miR-125a	Diagnóstico
(86)	miR-26b	Diagnóstico
(86)	miR-146b	Diagnóstico
(86)	miR-191	Diagnóstico
(86)	miR-484	Diagnóstico
(86)	miR-574-3p	Diagnóstico
(86)	miR-625-3p	Diagnóstico
(86)	Combinação miR-26b, miR-146b, miR-191, miR-484, miR-574-3p, miR-625-3p	Diagnóstico
(87)	miR-18a	Diagnóstico
(88)	Par miR-21/miR-375	Diagnóstico
(88)	Par miR-145/miR-196b	Diagnóstico
(88)	Par miR-20a/miR-375	Diagnóstico
(89)	miR-1246	Diagnóstico
(90)	miR-93	Diagnóstico
(70)	miR-199	Diagnóstico
(70)	Combinação miR-21, miR-155, miR-199	Diagnóstico
(70)	Combinação miR-145, miR-218, miR-34a	Diagnóstico
(91)	miR-3653	Diagnóstico e Prognóstico
(92)	miR-100	Diagnóstico e Prognóstico
(93)	miR-497	Diagnóstico e Prognóstico
circRNA		
(94)	circMT01	Diagnóstico
(95)	circ_0000276	Diagnóstico

Tabela 3 (continuação)

Referência(s)	ncRNA	Valor Clínico
lncRNA		
(96)	ANRIL	Diagnóstico
(97)	MVIH	Diagnóstico
(63)	HNF1A-AS1	Diagnóstico
(98)	SOX21-AS1	Diagnóstico
(99)	DLEU1	Diagnóstico e Prognóstico
(100)	HOXA-AS3	Diagnóstico e Prognóstico
(101)	PCAT6	Diagnóstico e Prognóstico
(64)	LINC00619	Prognóstico
(64)	FGF13-AS1	Prognóstico
(64)	EMX205	Prognóstico
(64)	WT1-AS	Prognóstico
(64)	C9orf147	Prognóstico
(64)	LINC00908	Prognóstico
(64)	Combinação LINC00619, FGF13-AS1, EMX205, WT1-AS, C9orf147, LINC00908	Prognóstico
Análise do padrão de Metilação		
(62,102)	Metilação de FAM19A4/miR124-2	Diagnóstico
(98)	Metilação do lncRNA SOX21-AS1	Diagnóstico
(103)	Metilação de lncRNA MEG3	Diagnóstico e Prognóstico
Outros		
(63)	Combinação miR-192, lncRNA HNF1A-AS1, mRNA VIL1	Diagnóstico

5.1.2. Cancros Anogenitais

Aproximadamente 5.4% das publicações exploradas (ANEXO 5), correspondendo a 3 estudos, focaram especificamente no grupo dos cancros anogenitais. As amostras utilizadas nos artigos que abordaram estes tipos de tumor foram somente amostras FFPE. Estas amostras foram recolhidas em dois países: Estados Unidos (1 artigo) e Brasil (2 artigos), revelando a prevalência notável das pesquisas conduzidas no Brasil (104–106).

Os ncRNAs avaliados como potenciais biomarcadores no contexto dos cancros anogenitais incluíram 4 miRs. Especificamente, os miRs investigados foram miR-145, miR-223-3p, miR-107 e miR-21. Além destes, foram considerados 3 circRNAs: ARHGAP5, COR01C e ZKSCAN1.

O miR-145 foi estudado como possível biomarcador de diagnóstico, revelando uma sobre-expressão em lesões primárias tumorais do pênis em comparação com tecido adjacente não-tumoral, sendo a infeção por HPV detetada em 86.5% das amostras tumorais primárias examinadas (105).

Os outros 3 miRs apresentam um valor clínico de biomarcadores prováveis de diagnóstico com uma sobre-expressão no cancro do pênis em relação ao tecido adjacente não-tumoral (104).

Já os circRNAs mostraram um presumível valor diagnóstico com um aumento significativo da sua expressão em tumores HPV-positivos em relação a HPV-negativos em câncros da vulva (106). O único ncRNA, neste grupo de tumores, que contém um provável valor clínico de prognóstico é o miR-107, com o aumento da expressão no tecido tumoral do pênis associado a pior sobrevivência livre de doença (104).

Nos artigos que analisaram os câncros anogenitais não foram avaliados os lncRNAs.

Na Tabela 4 está resumida a informação do valor clínico dos ncRNAs referidos nos câncros anogenitais.

Tabela 4 – Valor Clínico potencial dos ncRNAs avaliados nos câncros anogenitais

Referência(s)	ncRNA	Valor Clínico
	miRNAs	
(105)	miR-145	Diagnóstico
(104)	miR-223-3p	Diagnóstico
(104)	miR-107	Diagnóstico e Prognóstico
(104)	miR-21	Diagnóstico
	circRNA	
(106)	ARHGAP5	Diagnóstico
(106)	COR01C	Diagnóstico
(106)	ZKSCAN1	Diagnóstico

Ademais, os 2 estudos que mencionam o cancro do pênis são os que obtêm amostras de populações do Brasil. Isto deve-se ao facto de haver uma maior incidência destes tumores nesta região geográfica em relação a outros países (104,105,107).

5.1.3. Cancro da Cabeça e Pescoço

Os artigos que incluíram o grupo do cancro da cabeça (ANEXO 5) e pescoço totalizaram 18.2%, o que corresponde a 10 estudos recolhidos. Estes foram direccionados para a desregulação dos ncRNAs em amostras de FFPE, saliva e tecido tumoral fresco. Os estudos focados neste tipo de cancro foram conduzidos no Reino Unido, Austrália, Croácia, Suécia e Estados Unidos. Em amostras de análises *in silico* de dados obtidos a partir de amostras biológicas foram utilizadas amostras da Alemanha da base de dados GEO e dos Estados Unidos da base de dados TCGA.

Os locais anatómicos estudados no grupo de artigos que analisaram o cancro a cabeça e pescoço foram a orofaringe, sendo este o local mais estudado (8/10), a cavidade oral, a hipofaringe, a laringe, as amígdalas e a base da língua.

Nos artigos examinados que englobaram o cancro da cabeça e pescoço, os ncRNAs avaliados compreenderam um total de 38 miRs, 1 sncRNA (YRNA3) e 9 lncRNAs.

A combinação de ncRNAs neste grupo de cancro foi exclusivamente realizada com microRNAs. Assim, dentro dos 7 artigos que fazem menção a miRNAs, a maioria estudou a sua função como biomarcadores em forma de painéis, ou seja, conjuntos de miRs combinados (5/7). Este método poderá permitir uma análise mais complexa e uma visão mais abrangente e detalhada do que a avaliação de um miR de forma isolada.

A expressão dos miRs e lncRNAs foi variável mediante a localização anatómica ou a comparação com a coorte controlo, existindo valores clínicos possíveis de diagnóstico e prognóstico nos dois grupos de ncRNAs. No caso do sncRNA YRNA3 foi demonstrada que a sua expressão está significativamente aumentada em estadios tumorais mais avançados em doentes com cancro HPV-positivos, concluindo um valor prognóstico presumível para este ncRNA (108).

Na totalidade dos artigos, o valor clínico mais investigado foi o dos ncRNAs como biomarcadores de diagnóstico, representando 7 dos 10 artigos examinados. Por outro lado, a avaliação do valor prognóstico dos ncRNAs foi abordado em 6 dos 10 estudos avaliados. Esta distribuição demonstrou um predomínio na utilização dos prováveis biomarcadores ncRNAs para fins diagnósticos, enquanto o seu papel como potenciais marcadores prognósticos, embora significativo, foi considerado com menor frequência, tal como se verificou no cancro do colo do útero e nos cancros anogenitais.

Na Tabela 5 está exposto o possível valor clínico observado dos ncRNAs nos estudos que mencionavam o cancro da cabeça e pescoço.

Tabela 5 – Valor Clínico potencial dos ncRNAs no cancro da cabeça e pescoço

Referência(s)	ncRNA	Valor Clínico
miRNAs		
(109)	miR-16	Diagnóstico
(109,110)	miR-29a	Diagnóstico
(109)	miR-29c	Diagnóstico
(109)	miR-150	Diagnóstico
(109)	miR-205	Diagnóstico
(109)	miR-363	Diagnóstico

Tabela 5 (continuação)

Referência(s)	ncRNA	Valor Clínico
miRNAs		
(109)	miR-20b	Diagnóstico
(109)	miR-142	Diagnóstico
(111)	Combinação miR-142-3p, miR-31, miR-146a, miR-26b, miR-24, miR-193b	Prognóstico
(112,113)	miR-155	Diagnóstico e Prognóstico
(112)	Combinação miR-155, miR-185	Diagnóstico
(113)	Combinação miR-21, miR-93, miR-146b, miR-155, miR-182, miR-133b	Diagnóstico e Prognóstico
(112)	miR-193b	Diagnóstico
(112)	miR-185	Diagnóstico e Prognóstico
(114)	Combinação miR-194, miR-449a, miR-3614, miR-7, miR-3529-3p, miR-99A-3p, miR-501-3p, miR-1290, miR-548K	Diagnóstico
(110,115)	miR-9	Diagnóstico
(110,113)	miR-21	Diagnóstico
(110)	miR-100	Diagnóstico
(113)	miR-93	Diagnóstico
(113)	miR-146b	Diagnóstico
(113)	miR-182	Diagnóstico
(115)	miR-210	Diagnóstico
(115)	Combinação miR-191, miR-196b, miR-210, miR-222	Diagnóstico
(115)	Combinação miR-9, miR-134, miR-210, miR-455, miR-196b	Diagnóstico
(115)	miR-196b	Diagnóstico
(115)	miR-134	Diagnóstico
(115)	miR-196a	Diagnóstico
(115)	miR-455	Diagnóstico
(113)	miR-133b	Diagnóstico
sncRNA		
(108)	YRNA3	Prognóstico
lncRNA		
(116)	CDKN2B-AS1	Diagnóstico
(116)	TTY14	Diagnóstico
(116)	TTY15	Diagnóstico
(116)	PRINS	Diagnóstico e Prognóstico
(116)	MEG3	Diagnóstico
(116)	H19	Diagnóstico
(116)	MALAT1	Diagnóstico
(116)	CYTOR	Diagnóstico
(117)	EGOT	Prognóstico

6. Discussão

Com a presente revisão sistemática da literatura realizou-se a compilação da informação existente sobre a relevância dos RNAs não codificantes no diagnóstico e prognóstico dos câncros HPV-positivos. Cada vez mais, o seu papel como biomarcadores tem se tornado mais efetivo, apesar de ainda serem moléculas com estudos relativamente recentes e ainda em exploração científica, havendo necessidade de maior desenvolvimento ao nível do conhecimento dos ncRNAs e de como estes atuam no organismo humano. Estes possíveis biomarcadores têm vindo a ser reconhecidos como moléculas supressoras ou indutoras tumorais, em câncros relacionados com a infeção por HPV (35,36).

Nos resultados obtidos, consegue observar-se que os miRs são os ncRNAs mais evidentes e mais estudados, destacando-se como presumíveis marcadores dos câncros HPV-positivos. Isto acontece, por um lado, porque estes tipos de ncRNAs sofrem menor degradação e são mais estáveis, comparativamente com outras moléculas. Por outro lado, os miRs foram um dos primeiros ncRNAs a ser identificados, o que contribui para o maior número de estudos publicados face a outros ncRNAs (38,118).

No contexto dos câncros do colo do útero verifica-se que o miR-21 e o miR-34a são os mais frequentemente analisados: o miR-21 foi identificado como biomarcador de diagnóstico e o miR-34 estudado como biomarcador quer como biomarcador de diagnóstico, como de prognóstico.

O miR-21 foi avaliado nas amostras tumorais em comparação com controlos saudáveis ou amostras não tumorais como marcador de diagnóstico, apresentando-se sobre-expresso em todos os artigos sobre cancro do colo do útero em que foi avaliado, individualmente ou em combinação com outros miRs, tanto em células esfoliadas, tecido tumoral fixado em formalina e embebido em parafina ou fresco, citologia de base líquida, urina e soro (65–70). Estes dados são corroborados pela literatura disponível. *Rokos et al*, num estudo conduzido em amostras de tecido tumoral, lavados cervicovaginais e amostras de sangue, concluiu que o aumento do miR-21 nas amostras tumorais cervicais está relacionado com crescimento e invasão tumoral, bem como com angiogénese e presença de metastases distantes (65–70,119).

A possibilidade da utilização deste miR como biomarcador foi igualmente estudada em câncros anogenitais e de cabeça e pescoço. Este é examinado também como marcador de diagnóstico sobre-expresso no cancro do pénis e no cancro da mucosa oral, neste último de forma individual e em combinação, em comparação com controlos. Por outro lado, se este for comparado de acordo com a presença ou ausência de HPV nos câncros orofaríngeos, os câncros HPV-positivos

apresentam uma diminuição da sua expressão relativamente aos cancros HPV-negativos (104,110,113).

Os cancros orofaríngeos HPV-negativos são mais agressivos e têm pior prognóstico do que os HPV-positivos. A literatura efetivamente não é concordante neste aspeto; *Kordic et al.*, numa revisão sistemática com o objetivo de obter resultados sobre as diferenças da expressão do miR-21 em tecido tumoral entre pacientes com cancro oral e da orofaringe HPV-positivos em relação aos HPV-negativos, concluiu que o *status* de HPV no cancro oral e orofaríngeo não influencia a expressão do miR-21 (120).

Assim, este ncRNA apresenta bastante potencial para ser utilizado como biomarcador clínico nos cancros causados pelo HPV. No entanto, ainda são necessárias investigações adicionais para validar e estabelecer a sua utilização na prática clínica (119).

No conjunto de artigos incluídos neste trabalho, o miR-34a apenas foi explorado no cancro de colo do útero e a sua expressão é variável mediante o tipo de amostra em estudo. Em contexto diagnóstico, e quando comparando amostras tumorais com amostras não tumorais/controles saudáveis, o miR-34a apresenta-se sobre-expresso quando analisado em células esfoliadas cervicais e sob-expresso em tecido fresco, soro e urina. Em combinação com outros miRs nas amostras tumorais de tecido fresco e urina também se revela sob-expresso. Quanto ao seu valor prognóstico, o aumento deste miR em amostras de urina de doentes com cancro do colo do útero está associado a uma melhor sobrevivência global. Há evidência que este ncRNA se encontra inativo ou significativamente baixo em amostras de tecido tumoral HPV-positivas, mas não em células esfoliadas. É importante realizar mais estudos a este nível para confirmar a influência da tipologia de amostra na expressão do miR-34a e indagar qual o seu papel nos mecanismos moleculares relacionados com a carcinogénese em diferentes tecidos e/ou biofluidos (65,67,70–73,121).

A expressão de microRNAs da família miR-34 é induzida pela proteína p53. A diminuição da expressão do miR-34a pode ser atribuída a mecanismos epigenéticos, mutações nos genes da família miR-34a ou no gene p53, bem como à ação de inibidores virais da p53, como é o caso da oncoproteína E6 do HPV (121).

Segundo a literatura científica, em células cervicais infetadas por HPV, a diminuição na expressão do miR-34a potencia o bloqueio da apoptose e da progressão do ciclo celular, conferindo vantagem às células tumorais. Por outro lado, a sua sobre-expressão inibe a viabilidade das células tumorais HPV-positivas (121–123).

Os miRs analisados nos cancros anogenitais apresentam igualmente potencial valor como biomarcadores de diagnóstico, nomeadamente no cancro do pénis.

A literatura a focar-se no papel do miR-107, particularmente em HPV, é escassa. No entanto, nos resultados obtidos no cancro do pénis este é o único miR que apresenta valor prognóstico, com o aumento da expressão associado a pior sobrevivência livre de doença.

Ayoubian et al. no seu estudo sobre a função dos miRs no carcinoma das células escamosas do pénis constatou que a infeção pelo HPV parece desencadear expressões alteradas dos miRs neste tipo de neoplasias malignas (124).

No entanto, é imperativo que sejam conduzidas pesquisas adicionais direcionadas aos cancros anogenitais e em coortes com maior número de amostras para garantir uma maior fiabilidade na validade e robustez dos resultados obtidos.

No cancro da cabeça e pescoço, os miRNAs, particularmente os analisados em amostras de tecido tumoral ou saliva, constituem biomarcadores promissores tanto para diagnóstico, como prognóstico de cancros associados ao HPV. Encontra-se estabelecido que as proteínas E6 e E7 do vírus HPV conseguem atuar sobre os miRs do hospedeiro, podendo assim alterar a sua expressão e potenciar os mecanismos moleculares subjacentes ao desenvolvimento do cancro da cabeça e pescoço, mas ainda existem poucas informações de como este mecanismo sucede. Uma melhor perceção destas temáticas poderá auxiliar na implementação dos miRs, particularmente em combinação em painéis, na prática clínica em amostras menos invasivas e disponibilizar mais ferramentas aos profissionais de saúde para aumentar o leque de opções de diagnóstico e prognóstico dos doentes com carcinomas da cabeça e pescoço (125).

Diversos lncRNAs são analisados no cancro do colo do útero nos resultados desta revisão e apresentam-se como potenciais marcadores de diagnóstico e prognóstico, sendo detetados em tecido tumoral, citologia de base líquida e plasma. A literatura científica atual confirma a possível utilização dos lncRNAs como promissores biomarcadores no cancro do colo do útero, mas é necessário haver maior caracterização e compreensão dos seus mecanismos de regulação. Por esse motivo, é imperativo existir maior investigação para aumentar o conhecimento e a robustez para a sua utilização como marcadores tumorais. De igual forma, o conhecimento sobre os mecanismos de ação dos lncRNAs nos tumores anogenitais e de cabeça e pescoço é ainda escasso, pelo que mais estudos são necessários (126,127).

No caso dos cancros anogenitais, mediante os critérios de inclusão e exclusão do corrente trabalho, os lncRNAs não foram analisados como biomarcadores, o que corrobora a escassez de estudos com foco no seu papel como marcadores clínicos.

Embora os lncRNAs envolvidos no cancro da cabeça e pescoço tenham sido avaliados em diversos artigos, estes restringiram-se a amostras de tecido fresco tumoral. Esta abordagem restrita de amostras pode limitar a capacidade potencial do seu papel nos cancros da cabeça e pescoço HPV-positivos. Portanto, é fundamental considerar o aumento de estudos destes lncRNAs noutros tipos de amostras, como plasma ou saliva, de forma a aumentar o leque de identificação de biomarcadores minimamente invasivos.

O lncRNA MEG3 apresenta um valor provável de diagnóstico nos cancros da cabeça e pescoço em amostras de tecido tumoral, exibindo uma diminuição da sua expressão em tumores HPV-positivos em relação a tumores HPV-negativos. Adicionalmente, constata-se que a metilação deste ncRNA no cancro do colo do útero surge aumentada em amostras tumorais de plasma e tecido fresco, com esta sobre-expressão em plasma de doentes correlacionada com uma pior sobrevivência livre de doença (103,116).

A metilação do DNA é uma modificação epigenética onde ocorre a adição de um grupo metilo à citosina nas ilhas CpG do DNA e quando ocorre em células normais pode levar a transformação maligna. A hipermetilação dos genes de ncRNAs promove a alteração da transcrição, inibindo a sua expressão e acelerando o desenvolvimento do cancro (128,129).

Este mecanismo molecular corrobora a hipótese do MEG3 ser um potencial biomarcador supressor tumoral, mesmo em grupos diferentes de cancro, contribuindo com a diminuição da sua expressão e a sua hipermetilação como fatores de risco para o desenvolvimento de cancro do colo do útero e da cabeça e pescoço associado à infeção pelo HPV.

A metilação de lncRNAs no cancro do colo do útero foi verificada também com o SOX21-AS1. Em amostras tumorais HPV-positivas de citologia de base líquida, o SOX21-AS1 está sobre-expresso, quando comparado com amostras HPV-negativas livres de tumor. Nestas mesmas amostras, a metilação do gene *SOX21-AS1* está diminuída, o que promove o aumento deste transcrito e a progressão para neoplasia (98).

A metilação de FAM19A4/miR124-2 foi analisada em dois artigos diferentes e ambos concluíram que, em células esfoliadas cervicais, a presença de metilação no padrão-conjunto destes dois genes que são codificados para uma proteína e transcritos para um miR, respetivamente, aumenta o risco de cancro do colo do útero e tem assim um valor clínico de

biomarcador de diagnóstico (62,102). Este painel conjunto proteína/miRNA tem vindo a ser estudado já como possível teste de rastreio na deteção de carcinomas do colo do útero, com resultados promissores, podendo ser uma alternativa à citologia (130).

Estudos do padrão de metilação foram somente observados no cancro do colo do útero, o que faz com que o seu valor clínico noutros grupos de cancro HPV-positivos seja ainda pouco explorado. Seria muito vantajoso considerar a avaliação de metilação em cancros anogenitais e da cabeça e pescoço, de forma a ampliar o conhecimento e compreensão destas modificações em diferentes contextos tumorais HPV-positivos, contribuindo, assim, para a expansão da possibilidade de entrada de novos marcadores epigenéticos na prática clínica.

Os circRNAs encontram-se presentes em dois de três tipos de tumores estudados nesta revisão sistemática, nomeadamente nos cancros do colo do útero e anogenitais. Estes ncRNAs são encontrados na literatura científica também no cancro da cabeça e pescoço, mas pouca informação existe neste âmbito, o que pode justificar a inexistência de resultados sobre o papel dos circRNAs nos tumores da cabeça e pescoço neste trabalho (131).

No cancro do colo do útero somente são explorados o circMT01 e o circ_0000276, apresentando valor clínico de diagnóstico e uma sobre-expressão em amostras de plasma e tecido fresco, respetivamente (94,95). De facto, num outro estudo, a sobre-expressão do circMT01 em tecidos e linhas celulares de cancro do colo do útero foi relacionada com resistência à quimioterapia por ativação da autofagia celular (132).

Por outro lado, nos cancros anogenitais foram avaliados 3 circRNAs, ARHGAP5, CORO1C, ZKSCAN1, em tecido tumoral da vulva fixado em formalina e embebido em parafina, apresentando uma expressão aumentada em cancros HPV-positivos em comparação com aqueles que são negativos para este vírus (106).

Pela escassez de literatura sobre o tema e tal como os lncRNAs, os circRNAs são ainda objeto de pouco estudo. Não obstante, mediante os resultados obtidos nos artigos incluídos neste trabalho, os circRNAs possuem valor clínico, uma vez que o padrão de expressão se modifica mediante a presença ou ausência de infeção por HPV. Publicações recentes também interligam os circRNAs a fatores de prognóstico desfavoráveis, como o desenvolvimento de metástases para os doentes com tumores malignos, mas tal relação não foi averiguada nos resultados obtidos nesta revisão (133–135). Nos artigos incluídos, os circRNAs foram considerados biomarcadores prováveis de diagnóstico com a sua expressão aumentada em tumores HPV-positivos comparando a cancros HPV-negativos e a amostras não tumorais. Assim, torna-se fundamental realizar pesquisas mais

aprofundadas e uma caracterização detalhada do potencial dos circRNAs nos câncros HPV-positivos, para que estes possam ser adotados como ferramentas auxiliares de diagnóstico, prognóstico e de monitorização de resposta clínica, podendo também virem a ser explorados como estratégias terapêuticas no futuro, para monitorizar a resposta do doente aos tratamentos e o seu ajuste (133–135).

No grupo de câncros da cabeça e pescoço foi avaliado um outro tipo de ncRNA, além dos comumente mencionados (miRs, lncRNAs, circRNAs), sendo este o sncRNA YRNA3. O YRNA3 é um ncRNA com aproximadamente 100 nucleótidos, que é um transcrito do gene *YRNA* que se encontra no *locus* cromossômico 7q36. Verificou-se que a deteção deste sncRNA mostra uma sobre-expressão em estádios tumorais avançados quando comparados aos estádios iniciais em pacientes com câncro HPV-positivo. Este valor prognóstico do YRNA3 potencia a importância da realização de mais estudos acerca dos sncRNAs como potenciais marcadores para os carcinomas associados ao HPV (136).

Não foram encontrados estudos sobre o papel dos ncRNAs como biomarcadores terapêuticos nos câncros causados pelo HPV. Os estudos existentes na literatura científica são ainda muito preliminares a este nível e focam-se, maioritariamente em estudos pré-clínicos, usando linhas celulares ou verificando a sua eficácia apenas em modelos animais. Destaca-se, então, a importância da existência de mais investigações neste âmbito, de forma a, futuramente, ser uma opção adicional na prática clínica, possibilitando o aumento de tratamentos mais eficazes e personalizados (37,137,138).

Nos artigos analisados nesta revisão sistemática, observa-se alguma heterogeneidade metodológica entre os resultados, o que destaca a necessidade de uma maior padronização entre as investigações que utilizam ncRNAs como presumíveis biomarcadores, no contexto do tipo de amostras utilizadas, normalização das amostras, análises estatísticas e métodos de análise. Igualmente, além das diferenças metodológicas verifica-se que nem todos os artigos fazem menção à sensibilidade e especificidade do biomarcador analisado, forma de deteção, o nível de significância estatística do biomarcador ou até da forma de normalização da expressão. Deste modo, a aplicação prática ainda depende de estudos mais aprofundados, a fim de haver maior homogeneidade entre estes, para que possam confirmar sua eficácia, segurança e aplicabilidade em ambientes clínicos, para implementação de diretrizes reprodutíveis, conclusões mais robustas e assim, a integração dos ncRNAs na rotina de diagnóstico, na evolução e no tratamento dos carcinomas causados pelo HPV.

As limitações observadas durante o processo de seleção dos artigos para esta revisão sistemática foram a restrição de artigos redigidos em Português e Inglês, o que pode ter excluído outros estudos igualmente relevantes em outros idiomas, impossibilitando a leitura dos mesmos e a obtenção de artigos na íntegra. De igual forma, por ser um tema abrangente, com diferentes tipos tumorais, RNAs não codificantes e com diferentes valores clínicos, o número de artigos obtidos foi superior ao esperado, levando a limitações na formulação das conclusões apresentadas e à impossibilidade de realização de uma meta-análise.

7. Conclusão

Os ncRNAs apresentam um papel cada vez mais de destaque, não só pela crescente investigação de novos grupos de ncRNAs, mas também pela descoberta das suas funções, especialmente no âmbito da oncologia e no seu envolvimento em várias vias moleculares relacionadas à tumorigénese induzida pelo HPV.

Assim, estes RNAs mostram um potencial promissor como biomarcadores de diagnóstico e prognóstico no conjunto de cancros HPV-positivos. Torna-se muito importante a existência de mais estudos que possam reconhecer estas moléculas como biomarcadores de cancros causados pelo HPV.

Nesta revisão evidencia-se uma predominância da abordagem diagnóstica em relação à prognóstica no contexto da investigação dos ncRNAs como biomarcadores dos cancros HPV-positivos. Isto sugere que, embora exista um reconhecimento do valor diagnóstico dos ncRNAs, a exploração das suas capacidades prognósticas encontram-se ainda aquém do desejado. Assim, é do interesse científico que se intensifiquem as pesquisas direcionadas ao potencial prognóstico destes ncRNAs, a fim de compreender melhor o seu papel na progressão dos cancros associados ao HPV.

A análise detalhada das três vertentes clinicamente relevantes – diagnóstico, prognóstico e terapêutica – é fundamental para compreender a aplicabilidade clínica dos ncRNAs em diferentes contextos dos tumores malignos HPV-positivos.

O tipo de amostra utilizada nos diversos estudos examinados foi predominantemente de amostras invasivas, como biópsias de tecido tumoral ou células esfoliadas. A realização de mais estudos com amostras menos invasivas, como biópsias líquidas (soro, plasma ou urina), é fundamental, não apenas para minimizar o desconforto dos utentes, mas também porque se trata de uma abordagem viável em contextos de rotina hospitalar, permitindo um acompanhamento mais frequente. Além disso, essas amostras podem refletir a dinâmica dos ncRNAs ao longo da progressão tumoral e da resposta ao tratamento dos cancros HPV-positivos.

Nos resultados obtidos, observa-se que os miRs são os ncRNAs predominantes, com o cancro do colo do útero a ser o cancro HPV-positivo mais estudado. É, então, importante ampliar a investigação científica focando em outros ncRNAs e noutros tipos tumorais.

Dos miRs analisados, destacam-se o miR-21 e o miR-34a, os mais estudados como biomarcadores de diagnóstico e prognóstico, em relação a outros ncRNAs analisados. O miR-21 demonstra potencial para ser utilizado como biomarcador clínico nos três tipos de cancros

associados ao HPV. Contudo, são necessários estudos adicionais para validar a sua aplicação na prática clínica. Por outro lado, embora o miR-34a, tenha sido amplamente estudado, a sua análise foi limitada ao cancro do colo do útero, indicando a necessidade de mais estudos sobre o papel como biomarcador nos cancros anogenitais e no cancro da cabeça e pescoço HPV-positivos.

O estudo dos miRs, especialmente o miR-21 e o miR-34a, é crucial para o desenvolvimento de novos biomarcadores que possam melhorar o diagnóstico e o prognóstico em pacientes com cancros HPV-positivos, contribuindo para avanços significativos na gestão clínica desses pacientes.

Em conclusão, esta revisão sistemática sugere que os ncRNAs têm um grande potencial para serem utilizados como biomarcadores de cancros HPV-positivos, quer isolados quer na combinação em painel, mas mais estudos, com coortes maiores e multicêntricas, com foco no estudo de amostras de biópsias líquidas, com padronização das metodologias de análise e com compreensão mais aprofundada dos mecanismos moleculares envolvidos são recomendados, a fim de contribuir para uma aplicação clínica mais rápida e robusta.

Referências Bibliográficas

1. Stanley MA, Pett MR, Coleman N. HPV: from infection to cancer. In: Transactions BS, editor. Pattern–Recognition Receptors in Human Disease. 2007. p. 1456–60.
2. Szymonowicz KA, Chen J. Biological and clinical aspects of HPV-related cancers. *Cancer Biol Med*. 2020;17:865–78.
3. Bansal A, Singh MP, Rai B. Human papillomavirus-associated cancers: A growing global problem. *Int J Appl Basic Med Res*. 2015;6(2):84–9.
4. Estêvão D, Costa NR, Costa RMG da, Medeiros R. Hallmarks of HPV carcinogenesis: The role of E6, E7 and E5 oncoproteins in cellular malignancy. *BBA – Gene Regul Mech*. 2019;
5. International Agency for Research On Cancer. Cancers Attributable to Infections [Internet]. IARC. 2020 [cited 2023 Jul 7]. Available from: <https://gco.iarc.fr/causes/infections/home>
6. Brianti P, Flammoneis E De, Mercuri SR. Review of HPV-related diseases and cancers. *New Microbiol*. 2017;40(2):80–5.
7. Meites E, Gee J, Unger E, Markowitz L. Human Papillomavirus. In: *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases*. Washington: Centers for Disease Control and Prevention; 2021. p. 165–78.
8. Gupta S, Kumar P, Das BC. HPV: Molecular Pathways and Targets. *Curr Probl Cancer*. 2018;
9. Gheit T. Mucosal and Cutaneous Human Papillomavirus Infections and Cancer Biology. *Front Oncol*. 2019;9(355):1–22.
10. Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev Med Virol*. 2015;25:2–23.
11. Harden ME, Munger K. Human Papillomavirus Molecular Biology. *Mutat Res*. 2016;2–37.
12. Radosevich JA. HPV and Cancer. Springer; 2012.
13. Day PM, Schiller JT. The role of furin in papillomavirus infection. *Futur Microbiol*. 2009;4:1255–1262.
14. Schiffman M, Doorbar J, Wentzensen N, Sanjosé S de, Fakhry C, Monk BJ, et al. Carcinogenic Human Papillomavirus Infection. *Nat Rev Prim*. 2016;2.
15. Organization WH. WHO updates recommendations on HPV vaccination schedule [Internet]. WHO. 2022 [cited 2023 Jul 12]. Available from: <https://www.who.int/news/item/20-12-2022-WHO-updates-recommendations-on-HPV-vaccination-schedule>

16. Direção-Geral da Saúde. Norma nº018/2020 - Programa Nacional de Vacinação 2020 [Internet]. 2020 [cited 2023 Jul 12]. Available from: <https://www.dgs.pt/normas-orientacoes-e-informacoes/normas-e-circulares-normativas/norma-n-0182020-de-27092020-pdf.aspx>
17. Khalil AI, Zhang L, Muwonge R, Sauvaget C, Basu P. Efficacy and safety of therapeutic HPV vaccines to treat CIN 2/CIN 3 lesions: a systematic review and meta-analysis of phase II/III clinical trials. *BMJ*. 2023;13.
18. International Agency for Research On Cancer. Cancer Today [Internet]. 2022 [cited 2023 Sep 28]. Available from: https://gco.iarc.fr/today/en/dataviz/pie?mode=cancer&group_populations=1&sexes=2&types=1
19. Hu Z, Ma D. The precision prevention and therapy of HPV-related cervical cancer: new concepts and clinical implications. *Cancer Med*. 2018;7(10):5217–36.
20. Eun TJ, Perkins RB. Screening for Cervical Cancer. *Med Clin North Am*. 2020;104(6):1063–78.
21. Serviço Nacional de Saúde. Rastreios Oncológicos [Internet]. 2023. Available from: <https://www.sns24.gov.pt/tema/doencas-oncologicas/rastreios-oncologicos/>
22. Serviço Nacional de Saúde. Rastreio do Cancro do Colo do Útero [Internet]. 2023 [cited 2023 Jul 15]. Available from: <https://www.arslvt.min-saude.pt/programas-de-rastreio/rastreio-do-cancro-do-colo-do-utero/>
23. Jug R, Bean SM. Bethesda system [Internet]. PathologyOutlines.com, Inc. 2023 [cited 2023 Jul 16]. Available from: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/cervixcytologybethesda.html>
24. Shepherd JH. Cervical cancer. In: *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*. 2012. p. 293–309.
25. Duenas-González A, Campbell S. Global strategies for the treatment of early-stage and advanced cervical cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2016;28(1).
26. CHPN, Gurram L, Chopra S, Mahantshetty U. The management of locally advanced cervical cancer. *Curr Opin Oncol*. 2018;30(5):323–9.
27. Symer MM, Yeo HL. Recent advances in the management of anal cancer. *F1000Research*. 2018;1–8.
28. Serviço Nacional de Saúde. Rastreio de cancro colo-rectal. Nota Imprensa nº 2,

- 10/02/2018. 2018;1–2.
29. Sanjosé S de, Bruni L, Alemany L. HPV in genital cancers (at the exception of cervical cancer) and anal cancers. *Presse Med.* 2014;43(12).
 30. Tumban E. A Current Update on Human Papillomavirus–Associated Head and Neck Cancers. *Viruses.* 2019;11(922):1–19.
 31. Paver EC, Currie AM, Gupta R, Dahlstrom JE. Human papilloma virus related squamous cell carcinomas of the head and neck: diagnosis, clinical implications and detection of HPV. *J R Coll Pathol Australas.* 2019;52(2):179–91.
 32. Dong H, Shu X, Xu Q, Zhu C, Kaufmann AM, Zheng Z–M, et al. Current Status of Human Papillomavirus–Related Head and Neck Cancer: From Viral Genome to Patient Care. *Virologica Sinica.* 2021;36:1284–1302.
 33. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershengwald JE, Brookland RK. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population–based to a more “personalized” approach to cancer staging. *Am Cancer Soc.* 2017;67(2):93–9.
 34. Glastonbury CM. Critical Changes in the Staging of Head and Neck Cancer. *Radiol Imaging Cancer.* 2020;2(1).
 35. Zhang P, Wu W, Chen Q, Chen M. Non–Coding RNAs and their Integrated Networks. *J Integr Bioinform.* 2019;1–12.
 36. Slack FJ, Chinnaiyan AM. The Role of Non–coding RNAs in Oncology. *Cell.* 2019;179(5):1033–55.
 37. He J, Huang B, Zhang K, Liu M, Xu T. Long non–coding RNA in cervical cancer: From biology to therapeutic opportunity. *Biomed Pharmacother.* 2020;127.
 38. Hombach S, Kretz M. Non–coding RNAs: Classification, Biology and Functioning. In: *Non–coding RNAs in Colorectal Cancer, Advances in Experimental Medicine and Biology.* 2016. p. 3–17.
 39. Gusic M, Prokisch H. ncRNAs: New Players in Mitochondrial Health and Disease? *Front Genet.* 2020;11(95):1–27.
 40. Uchida S, Adams JC. Physiological roles of non–coding RNAs. *Am J Physiol Physiol.* 2019;317.
 41. Park Y–B, Kim J–M. Identification of long non–coding RNA–mRNA interactions and genome–wide lncRNA annotation in animal transcriptome profiling. *J Anim Sci Technol.* 2023;65(2):293–310.

42. Wajahat M, Bracken CP, Orang A. Emerging Functions for snoRNAs and snoRNA-Derived Fragments. *Int J Mol Sci.* 2021;22(10193):1–19.
43. Lyons SM, Fay MM, Ivanov P. The role of RNA modifications in the regulation of tRNA cleavage. *FEBS Lett.* 2018;592(17):2828–44.
44. Kaliatsi EG, Giarimoglou N, Stathopoulos C, Stamatopoulou V. Non-Coding RNA-Driven Regulation of rRNA Biogenesis. *Int J Mol Sci.* 2020;21(9738):1–19.
45. Bohnsack MT, Sloan KE. Modifications in small nuclear RNAs and their roles in spliceosome assembly and function. *Biol Chem.* 2018;399(11):1265–76.
46. Huang Z, Du Y, Wen J, Lu B, Zhao Y. snoRNAs: functions and mechanisms in biological processes, and roles in tumor pathophysiology. *Cell Death Discov.* 2022;8(259):1–10.
47. Beermann J, Piccoli M-T, Viereck J, Thum T. Non-Coding RNAs In Development And Disease: Background, Mechanisms, And Therapeutic Approaches. *Physiol Rev.* 2016;96:1297–1325.
48. Lam JK, Chow MY, Zhang Y, Leung SW. siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Mol Ther Acids.* 2015;4:1–20.
49. Fabbri M, Girnita L, Varani G, Calin GA. Decrypting noncoding RNA interactions, structures, and functional networks. *Genome Res.* 2019;29:1377–88.
50. Alshaer W, Zureigat H, Karaki A Al, Al-Kadash A, Gharaibeh L. siRNA: Mechanism of action, challenges, and therapeutic approaches. *Eur J Pharmacol.* 2021;1–17.
51. Yu C-Y, Kuo H-C. The emerging roles and functions of circular RNAs and their generation. *J Biomed Sci.* 2019;26(29):1–12.
52. Agostino S Di, Vahabi M, Turco C, Fontemaggi G. Secreted Non-Coding RNAs: Functional Impact on the Tumor Microenvironment and Clinical Relevance in Triple-Negative Breast Cancer. *Non-coding RNA.* 2022;8(5):1–17.
53. Otmani K, Lewalle P. Tumor Suppressor miRNA in Cancer Cells and the Tumor Microenvironment: Mechanism of Deregulation and Clinical Implications. *Front Oncol.* 2021;11:1–15.
54. Detassis S, Grasso M, Vescovo V Del, Denti MA. MicroRNAs make the call in cancer personalized medicine. *Front Cell Dev Biol.* 2017;5(86).
55. Zeuschner P, Linxweiler J, Junker K. Non-coding RNAs as biomarkers in liquid biopsies with a special emphasis on extracellular vesicles in urological malignancies. *Expert Rev Mol Diagn.* 2019;20(2).

56. Salyakina D, Tsinoremas NF. Non-coding RNAs profiling in head and neck cancers. *Genomic Med.* 2016;2056–7944.
57. Casarotto M, Fanetti G, Guerrieri R, Palazzari E, Lupato V, Steffan A, et al. Beyond MicroRNAs: Emerging Role of Other Non-Coding RNAs in HPV-Driven Cancers. *Cancers (Basel).* 2020;12:1–28.
58. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al. The PRISMA 2020 statement: An updated guideline for reporting systematic reviews. *PLOS Med.* 2021 Mar 29;18(3).
59. Schiavo JH. PROSPERO: An International Register of Systematic Review Protocols. *Med Ref Serv Q.* 2019;38(2):171–80.
60. Ouzzani M, Hammady H, Fedorowicz Z, Elmagarmid A. Rayyan—a web and mobile app for systematic reviews. *Syst Rev.* 2016;5(210).
61. Leão R, Albersen M, Looijenga LHJ, Tandstad T, Kollmannsberger C, Murray MJ, et al. Circulating MicroRNAs, the Next-Generation Serum Biomarkers in Testicular Germ Cell Tumours: A Systematic Review. *Eur Urol.* 2021;80(4):456–66.
62. Bonde J, Floore A, Ejegod D, J.Vink F, Hesselink A. Methylation markers FAM19A4 and miR124–2 as triage strategy for primary human papillomavirus screen positive women: A large European multicenter study. *Int J Cancer.* 2021;148:396–405.
63. Xu J, Zou J, Wu L, Lu W. Transcriptome analysis uncovers the diagnostic value of miR-192-5p/HNF1A-AS1/VIL1 panel in cervical adenocarcinoma. *Sci Rep.* 2020;10(16584).
64. Cheng Y, Yang S, Shen Y, Ding B, Wu W, Zhang Y, et al. The Role of High-Risk Human Papillomavirus-Related Long Non-Coding RNAs in the Prognosis of Cervical Squamous Cell Carcinoma. *Mary Ann Liebert.* 2020;39(4):1–9.
65. Liu M, Wang W, Chen H, Lu Y, Yuan D, Deng Y, et al. miR-9, miR-21, miR-27b, and miR-34a Expression in HPV16/58/52-Infected Cervical Cancer. *Biomed Res Int.* 2020;2020.
66. Park S, Eom K, Kim J, Bang H, Wang H, Ahn S, et al. MiR-9, miR-21, and miR-155 as potential biomarkers for HPV positive and negative cervical cancer. *BMC Cancer.* 2017;17(658):1–8.
67. Sharma S, Hussain S, Soni K, Singhal P, Tripathi R, Ramachandran VG, et al. Novel MicroRNA signatures in HPV-mediated cervical carcinogenesis in Indian women. *Tumor Biol.* 2016;37:4585–4595.
68. Zamani S, Sohrabi A, Hosseini SM, Rahnamaye-Farzami M, Akbari A. Deregulation of miR-

- 21 and miR-29a in Cervical Cancer Related to HPV Infection. *MicroRNA*. 2019;8(2):110–5.
69. Zamani S, Hosseini SM, Sohrabi A. miR-21 and miR29-a: Potential Molecular Biomarkers for HPV Genotypes and Cervical Cancer Detection. *MicroRNA*. 2020;9(4):271–5.
70. Aftab M, Poojary SS, Seshan V, Kumar S, Agarwal P, Tandon S, et al. Urine miRNA signature as a potential non-invasive diagnostic and prognostic biomarker in cervical cancer. *Sci Rep*. 2021;11(1).
71. Gocze K, Gombos K, Kovacs K, Juhasz K, Gocze P, Kiss I. MicroRNA Expressions in HPV-induced Cervical Dysplasia and Cancer. *Anticancer Res*. 2015;35(1):523–30.
72. Ribeiro J, Marinho-Dias J, Monteiro P, Loureiro J, Baldaque I, Medeiros R, et al. miR-34a and miR-125b Expression in HPV Infection and Cervical Cancer Development. *Biomed Res Int*. 2015;1–6.
73. Ocadiz-Delgado R, Lizcano-Meneses S, Trejo-Vazquez J-A, Conde-Perezprina J-C, Garrido-Palmas F, Alvarez-Rios E, et al. Circulating miR-15b, miR-34a and miR-218 as promising novel early low-invasive biomarkers of cervical carcinogenesis. *J Pathol Microbiol Immunol*. 2021;129(2):70–9.
74. Babion I, Snoek BC, Novianti PW, Jaspers A, Trommel N van, Heideman DAM, et al. Triage of high-risk HPV-positive women in population-based screening by miRNA expression analysis in cervical scrapes; a feasibility study. *Clin Epigenetics*. 2018;10(76):1–10.
75. Jihad NA, Issa YW. Role of microRNA-155 as a Diagnostic Biomarker for Human Papillomavirus Associated Cervical Cancer. *Wiadomości Lek*. 2021;74(9):2301–4.
76. Wang F, Shan S, Huo Y, Xie Z, Fang Y, Qi Z, et al. MiR-155-5p inhibits PDK1 and promotes autophagy via the mTOR pathway in cervical cancer. *Int J Biochem Cell Biol*. 2018;99:91–9.
77. Farzanehpour M, Mozhgani S-H, Jahlyand S, Faghihloo E, Akhavan S, Salimi V, et al. Serum and tissue miRNAs: potential biomarkers for the diagnosis of cervical cancer. *Viol J*. 2019;16(1).
78. Liu SS, Chan KKL, Chu DKH, Wei TN, Lau LSK, Ngu SF, et al. Oncogenic microRNA signature for early diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia and cancer. *Mol Oncol*. 2018;12(12):2009–22.
79. Park S, Kim J, Eom K, Oh S, Kim S, Kim G, et al. microRNA-944 overexpression is a biomarker for poor prognosis of advanced cervical cancer. *BMC Cancer*. 2019;19.
80. Liu Z, Mao L, Wang L, Zhang H, Hu X. miR-218 functions as a tumor suppressor gene in

- cervical cancer. *Mol Med Rep.* 2020 Jan;21(1):209–19.
81. Chen Y, Ma C, Zhang W, Chen Z, Ma L. Down regulation of miR-143 is related with tumor size, lymph node metastasis and HPV16 infection in cervical squamous cancer. *Diagn Pathol.* 2014;9(88):1–11.
 82. Yu F, Liu J, Dong W, Xie J, Zhao X. The diagnostic value of miR-145 and miR-205 in patients with cervical cancer. *Am J Transl Res.* 2021;13(3):1825–32.
 83. Kawai S, Fujii T, Kukimoto I, Yamada H, Yamamoto N, Kuroda M, et al. Identification of miRNAs in cervical mucus as a novel diagnostic marker for cervical neoplasia. *Sci Rep.* 2018;8(7070).
 84. Zheng S, Li R, Liang J, Wen Z, Huang X, Du X, et al. Serum miR-638 Combined with Squamous Cell Carcinoma-Related Antigen as Potential Screening Biomarkers for Cervical Squamous Cell Carcinoma. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2020;24(4):188–94.
 85. Lv A, Tu Z, Huang Y, Lu W, Xie B. Circulating exosomal miR-125a-5p as a novel biomarker for cervical cancer. *Oncol Lett.* 2020;21(54).
 86. Ning R, Meng S, Wang L, Jia Y, Tang F, Sun H, et al. 6 Circulating miRNAs can be used as Non-invasive Biomarkers for the Detection of Cervical Lesions. *J Cancer.* 2021;12(17):5106–13.
 87. Zhang Y, Qiu S, Guo Y, Zhang J, Wu X, Hong G. Diagnostic Value of Vaginal Microecology, Serum miR-18a, and PD-L1 for Identifying HPV-Positive Cervical Cancer. *Technol Cancer Res Treat.* 2021;20:1–7.
 88. Ivanov MK, Titov SE, Glushkov SA, Dzyubenko V V, Malek A V, Arkhangelskaya PA, et al. Detection of high-grade neoplasia in air-dried cervical PAP smears by a microRNA-based classifier. *Oncol Rep.* 2018;39(3):1099–111.
 89. Yang Y, Xie YJ, Xu Q, Chen JX, Shan NC, Zhang Y. Down-regulation of miR-1246 in cervical cancer tissues and its clinical significance. *Gynecol Oncol.* 2015;138(3):683–8.
 90. Li J, Chu Z, Han H, Zhang Y, Tian F, Zhang J, et al. Suppression of miR-93-5p inhibits high-risk HPV-positive cervical cancer progression via targeting of BTG3. *Hum Cell.* 2019;32:160–71.
 91. Cui H, Zhang B, Ruan M, Fang C, Li N, Sun X, et al. Overexpression of miR-3653 is Associated with HPV Infection and Serves as a Biomarker in Patients with Cervical Cancer. *Int J Womens Heal.* 2022;14:1037–45.
 92. Yamanaka Z, Sasaki T, Yamanaka A, Kato K, Nishi H. Circulating and tissue miR-100 acts

- as a potential diagnostic biomarker for cervical cancer. *Cancer Biomarkers*. 2021;32(4):551–8.
93. Luo M, Shen D, Zhou X, Chen X, Wang W. MicroRNA-497 is a potential prognostic marker in human cervical cancer and functions as a tumor suppressor by targeting the insulin-like growth factor 1 receptor. *Surgery*. 2013;153(6):836–47.
 94. Cheng X, Shen C, Liao Z. High Expression of Circular RNA–Mitochondrial tRNA Translation Optimization 1 Assists the Diagnosis of High-Risk Human Papillomavirus Infection in Cervical Cancer. *J Low Genit Tract Dis*. 2022;26(3):212–8.
 95. Zhang H, Wang X, Li Y, Bai Y, Li Q, Wang S, et al. The hsa_circ_0000276–ceRNA regulatory network and immune infiltration in cervical cancer. *BMC Cancer*. 2023 Mar;23(1).
 96. Zhang W-Y, Liu Y-J, He Y, Chen P. Down-regulation of long non-codingRNA ANRIL inhibits the proliferation, migration and invasion of cervical cancer cells. *Cancer Biomarkers*. 2018;23(2):243–53.
 97. Ghanbari M, Aghazadeh A, Malekabbaslou E, Rajabi A, Sobhkhizy A, Maydanchi M, et al. Ectopic expression of lncRNA MVIH as a potential diagnostic biomarker in cervical cancer. *Genes Cancer*. 2022;13:52–9.
 98. Du P, Zhi Y, Wang R, Li Y, Li H, Zhang X, et al. Aberrant Methylation of the SOX21-AS1 Promoter Region Promotes Gene Expression and Its Clinical Value in Cervical Cancer. *Reprod Sci*. 2021;28(2):532–40.
 99. Dong A, Xu B, Wang Z, Miao X. Survival-related DLEU1 is associated with HPV infection status and serves as a biomarker in HPV-infected cervical cancer. *Mol Med Rep*. 2022 Mar;25(3).
 100. Xu H, Tang Y, He C, Tian Y, Ni R. Prognostic value of lncRNA HOXA-AS3 in cervical cancer by targeting miR-29a-3p and its regulatory effect on tumor progression. *J Obstet Gynaecol Res*. 2022;48(10):2594–602.
 101. Lv XJ, Tang Q, Tu Y-Q, Yan D-D, Wei Q-C. Long noncoding RNA PCAT6 regulates cell growth and metastasis via Wnt/beta-catenin pathway and is a prognosis marker in cervical cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2019 Mar;23(5):1947–56.
 102. Strooper LMA De, Berkhof J, Steenbergen RDM, Lissenberg-Witte BI, Snijders PJF, Meijer CJLM, et al. Cervical cancer risk in HPV positive women after a negative FAM19A4/mir124-2 methylation test: A post hoc analysis in the POBASCAM trial with 14 year follow-up. *Int J Cancer*. 2018;143:1541–1548.

103. Zhang J, Yao T, Lin Z, Gao Y. Aberrant Methylation of MEG3 Functions as a Potential Plasma Based Biomarker for Cervical Cancer. *Sci Rep.* 2017;7(6271).
104. Pinho JD, Silva GEB, Júnior AALT, Belfort MR de C, Macedo JM, Isabela, et al. MIR-107, MIR-223-3P and MIR-21-5P Reveals Potential Biomarkers in Penile Cancer. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2020;21(2):391-7.
105. Pinho JD, Silva GEB, Júnior AALT, Belfort MR de C, Mendes JMM, Calixto J de RR, et al. Downregulation of miR-145 is associated with perineural invasion in penile carcinoma. *Transl Androl Urol.* 2021;10(5):2019-26.
106. Kolitz E, Lucas E, Hosler GA, Kim J, Hammer S, Lewis C, et al. HPV-Positive and HPV-Negative Vulvar Squamous Cell Carcinoma Are Biologically, but Not Clinically, Distinct. *J Invest Dermatol.* 2022;142(5):1280-90.
107. Silva TCL da, Ximenes ÉGP, Santos YH da S, Jerônimo R, Araújo, Macedo EAB de, et al. Epidemiological study of penile cancer in a northeastern state - Brazil. *Rev Col Bras Cir.* 2023;50.
108. Guglas K, Kolenda T, Kozłowska-Masłon J, Severino P, Teresiak A, Blizniak R, et al. The Impact of YRNAs on HNSCC and HPV Infection. *Biomedicines.* 2023;11(3):1-29.
109. Emmett SE, Stark MS, Pandeya N, Panizza B, Whiteman DC. MicroRNA expression is associated with human papillomavirus status and prognosis in mucosal head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 2021;113(105136):1-8.
110. Simic I, Bozinovic K, Gasperov NM, Kordic M, Pesut E, Manojlovic L, et al. Head and Neck Cancer Patients' Survival According to HPV Status, miRNA Profiling, and Tumour Features-A Cohort Study. *Int J Mol Sci.* 2023;24(4).
111. Gao G, Gay HA, Chernock RD, Zhang TR, Luo J, Thorstad WL, et al. A microRNA expression signature for the prognosis of oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer.* 2013;119(1):72-80.
112. Bersani C, Mints M, Tertipis N, Haegglblom L, Näsman A, Romanitan M, et al. MicroRNA-155,-185 and-193b as biomarkers in human papillomavirus positive and negative tonsillar and base of tongue squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2018;82:8-16.
113. Mehterov N, Sacconi A, Pulito C, Vladimirov B, Haralanov G, Pazardjikliev D, et al. A novel panel of clinically relevant miRNAs signature accurately differentiates oral cancer from normal mucosa. *Front Oncol.* 2022;12:1-16.
114. Weeramange CE, Tang KD, Barrero RA, Hartel G, Liu Z, Ladwa R, et al. Salivary micro RNAs

- as biomarkers for oropharyngeal cancer. *Cancer Med.* 2023;12:15128–40.
115. Wan Y, Vagenas D, Salazar C, Kenny L, Perry C, Calvopiña D, et al. Salivary miRNA panel to detect HPV-positive and HPV-negative head and neck cancer patients. *Oncotarget.* 2017;8(59):99990–100001.
 116. Kopczynska M, Kolenda T, Guglas K, Sobocinska J, Teresiak A, Blizniak R, et al. PRINS lncRNA Is a New Biomarker Candidate for HPV Infection and Prognosis of Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Diagnostics.* 2020;10(762).
 117. Kolenda T, Kopczynska M, Guglas K, Teresiak A, Blizniak R, Lasinska I, et al. EGOT lncRNA in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Polish J Pathol.* 2018;69(4):356–65.
 118. Nagandla K, Lin KH, Chitra E, Jamli MFBM. Role of microRNAs as biomarkers of cervical carcinogenesis: a systematic review. *Obstet Gynecol Sci.* 2021;64(5).
 119. Rokos T, Kudela E, Pribulova T, Kozubik E, Holubekova V, Biringer K. miR-21 – A Novel Marker for Cervical Cancer? *Actual Gyn.* 2021;13:48–56.
 120. Kordic M, Martinovic D, Puizina E, Bozic J, Zubcic Z, Dediol E. Impact of Human Papillomavirus on microRNA-21 Expression in Oral and Oropharyngeal Cancer—A Systematic Review. *Int J Mol Sci.* 2024;25(15).
 121. Ribeiro J, Sousa H. MicroRNAs as biomarkers of cervical cancer development: a literature review on miR-125b and miR-34a. *Mol Biol Rep.* 2014;41(3):1525–31.
 122. Geng D, Song X, Ning F, Song Q, Yin H. MiR-34a Inhibits Viability and Invasion of Human Papillomavirus-Positive Cervical Cancer Cells by Targeting E2F3 and Regulating Survivin. *Int J Gynecol Cancer.* 2015;25:707–13.
 123. Singh G, Sharma SK, Singh SK. miR-34a negatively regulates cell cycle factor Cdt2/DTL in HPV infected cervical cancer cells. *BMC Cancer.* 2022;22(1).
 124. Ayoubian H, Heinzelmann J, Hölters S, Khalmurzaev O, Pryalukhin A, Loertzer P, et al. miRNA Expression Characterizes Histological Subtypes and Metastasis in Penile Squamous Cell Carcinoma. *Cancers (Basel).* 2021;13(6).
 125. Salazar C, Calvopina D, Punyadeera C. miRNAs in human papilloma virus associated oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Expert Rev Mol Diagn.* 2014;14(8):1033–40.
 126. Dias TR, Santos JMO, Costa RMG da, Medeiros R. Long non-coding RNAs regulate the hallmarks of cancer in HPV-induced malignancies. *Crit Rev Oncol / Hematol.* 2021;161.
 127. Dong J, Su M, Chang W, Zhang K, Wu S, Xu T. Long non-coding RNAs on the stage of

- cervical cancer (Review). *Oncol Rep.* 2017;38(4):1923–31.
128. Liu Y, Leng P, Liu Y, Guo J, Zhou H. Crosstalk between Methylation and ncRNAs in Breast Cancer: Therapeutic and Diagnostic Implications. *Int J Mol Sci.* 2022;23(24).
 129. Yu L, Xia K, Cen X, Huang X, Sun W, Zhao Z, et al. DNA methylation of noncoding RNAs: new insights into osteogenesis and common bone diseases. *Stem Cell Res Ther.* 2020;11(109).
 130. Vink F, Meijer C, Clifford G, Poljak M, Oštrbenk A, Petry KU, et al. FAM19A4/miR124-2 methylation in invasive cervical cancer: A retrospective cross-sectional worldwide study. *Int J Cancer.* 2020;147:1215–21.
 131. Guo D, Yang M, Li S, Zhu W, Chen M, Pan J, et al. Expression and molecular regulation of non-coding RNAs in HPV-positive head and neck squamous cell carcinoma. *Front Oncol.* 2023;13.
 132. Chen M, Ai G, Zhou J, Mao W, Li H, Guo J. circMTO1 promotes tumorigenesis and chemoresistance of cervical cancer via regulating miR-6893. *Biomed Pharmacother.* 2019;117.
 133. Matos AG de M, Silva GEB, Barbosa E da S, Andrade MS de, Lages JS, Corrêa R da GCF, et al. What is the role of circRNAs in the pathogenesis of cervical cancer? A systematic literature review. *Front Genet.* 2024;15.
 134. Bonelli P, Borrelli A, Tuccillo FM, Buonaguro FM, Tornesello ML. The Role of circRNAs in Human Papillomavirus (HPV)-Associated Cancers. *Cancers (Basel).* 2021;13:1–22.
 135. Heydarnia E, Dorostgou Z, Hedayati N, Mousavi V, Yahyazadeh S, Alimohammadi M. Circular RNAs and cervical cancer: friends or foes? A landscape on circRNA-mediated regulation of key signaling pathways involved in the onset and progression of HPV-related cervical neoplasms. *Cell Commun Signal.* 2024;22(107).
 136. Guglas K, Kołodziejczak I, Kolenda T, Kopczynska M, Teresiak A, Sobocinska J. YRNAs and YRNA-Derived Fragments as New Players in Cancer Research and Their Potential Role in Diagnostics. *Int J Mol Sci.* 2020;21(16).
 137. Wang Z, Liu T, Li G, Cao Z. The exploration of new therapeutic targets for HPV-negative head and neck squamous cell cancer through the construction of a ceRNA network and immune microenvironment analysis. *J Cell Biochem.* 2020;121(5):3426–37.
 138. Hasanzadeh M, Movahedi M, Rejali M, Maleki F, Moetamani-Ahmadi M, Seifi S. The potential prognostic and therapeutic application of tissue and circulating microRNAs in cervical cancer. *J Cell Physiol.* 2019;234(2):1289–94.

139. Hoelzle CR. MicroRNA Levels in Cervical Cancer Samples and Relationship with Lesion Grade and HPV Infection. *MicroRNA*. 2021;10(2):139–45.
140. Zhu Y, Han Y, Tian T, Su P, Jin G, Chen J, et al. MiR-21-5p, miR-34a, and human telomerase RNA component as surrogate markers for cervical cancer progression. *Pathol Res Pr*. 2018;214(3):374–9.
141. Geng D, Song X, Ning F, Song Q, Yin H. MiR-34a Inhibits Viability and Invasion of Human Papillomavirus-Positive Cervical Cancer Cells by Targeting E2F3 and Regulating Survivin. *Int J Gynecol Cancer*. 2015;25(4):707–13.
142. Zheng W, Liu Z, Zhang W, Hu X. miR-31 functions as an oncogene in cervical cancer. *Arch Gynecol Obs*. 2015;292(5):1083–9.
143. Maia B de M, Lavorato-Rocha AM, Rodrigues LS, Coutinho-Camillo CM, Baiocchi G, Stiepcich MM, et al. microRNA portraits in human vulvar carcinoma. *Cancer Prev Res*. 2013;6(11):1231–41.
144. Hu J, Ge W, Xu J. HPV 16 E7 inhibits OSCC cell proliferation, invasion, and metastasis by upregulating the expression of miR-20a. *Tumour Biol*. 2016;37(7):9433–40.
145. Gao D, Zhang Y, Zhu M, Liu S, Wang X. miRNA Expression Profiles of HPV-Infected Patients with Cervical Cancer in the Uyghur Population in China. *PLoS One*. 2016;11(10).
146. Liu X, Liu P, Chernock RD, Yang Z, Kuhs KAL, Lewis JS, et al. A MicroRNA Expression Signature as Prognostic Marker for Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 2021;113(6):752–9.
147. Firmino N, Martinez VD, Rowbotham DA, Enfield KSS, Bennewith KL, Lam WL. HPV status is associated with altered PIWI-interacting RNA expression pattern in head and neck cancer. *Oral Oncol*. 2016;55:43–8.
148. Chen S, Li K. HOXD-AS1 facilitates cell migration and invasion as an oncogenic lncRNA by competitively binding to miR-877-3p and upregulating FGF2 in human cervical cancer. *BMC Cancer*. 2020;20(924).
149. Hsu W, Liu L, Chen X, Zhang Y, Zhu W. LncRNA CASC11 promotes the cervical cancer progression by activating Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Biol Res*. 2019 Jun;52.
150. Pirhoushiaran M, Hesami S, Ehtesham N, Mehrabi S, Shirkoohi R, Yazdani N, et al. Gene Expression Profiling and Clinicopathological Importance of Fer1L4 and DANCR Long Non Coding RNAs in Patients with Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Diagnostic Res*. 2021;15(9):1–6.

151. Ou R, Lv M, Liu X, Lv J, Zhao J, Zhao Y, et al. HPV16 E6 oncoprotein-induced upregulation of lncRNA GABPB1-AS1 facilitates cervical cancer progression by regulating miR-519e-5p/Notch2 axis. *Faseb J.* 2020;34(10):13211–23.
152. Luo X, Zheng M, Cao M, Zhang W, Huang M, Dai L, et al. Distinguishable Prognostic miRNA Signatures of Head and Neck Squamous Cell Cancer With or Without HPV Infection. *Front Oncol.* 2021;10(614487).
153. Vojtechova Z, Sabol I, Salakova M, Smahelova J, Zavadil J, Turek L, et al. Comparison of the miRNA profiles in HPV-positive and HPV-negative tonsillar tumors and a model system of human keratinocyte clones. *BMC Cancer.* 2016;16(382).
154. Miller DL, Davis JW, Taylor KH, Johnson J, Shi Z, Williams R, et al. Identification of a human papillomavirus-associated oncogenic miRNA panel in human oropharyngeal squamous cell carcinoma validated by bioinformatics analysis of the Cancer Genome Atlas. *Am J Pathol.* 2015;185(3):679–92.
155. Han M-S, Lee JM, Kim S-N, Kim J-H, Kim H-S. Human Papillomavirus 16 Oncoproteins Downregulate the Expression of miR-148a-3p, miR-190a-5p, and miR-199b-5p in Cervical Cancer. *Biomed Res Int.* 2018;
156. Norouzi S, Farhadi A, Farzadfard E, Akbarzade-Jahromi M, Ahmadzadeh N, Nasiri M, et al. MicroRNAs expression changes coincide with low or high grade of squamous intraepithelial lesion infected by HPV-16. *Gene Reports.* 2021;23(101186).
157. Szekerczes T, Galamb A, Varga N, Benczik M, Kocsis A, Schlachter K, et al. Increased miR-20b Level in High Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Pathol & Oncol Res.* 2020;26(4):2633–40.
158. Han Y, Xu G-X, Lu H, Yu D-H, Ren Y, Wang L, et al. Dysregulation of miRNA-21 and their potential as biomarkers for the diagnosis of cervical cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(6):7131–9.
159. Okoye JO, Ngokere AA, Onyenekwe CC, Erinle CA. Comparable expression of miR-let-7b, miR-21, miR-182, miR-145, and p53 in serum and cervical cells: Diagnostic implications for early detection of cervical lesions. *Int J Heal Sci.* 2019;13(4):29–38.
160. Liu J, Sun H, Wang X, Yu Q, Li S, Yu X, et al. Increased Exosomal MicroRNA-21 and MicroRNA-146a Levels in the Cervicovaginal Lavage Specimens of Patients with Cervical Cancer. *Int J Mol Sci.* 2014 Jan;15(1):758–73.
161. Yang M, Zhai X, Xia B, Wang Y, Lou G. Long noncoding RNA CCHE1 promotes cervical

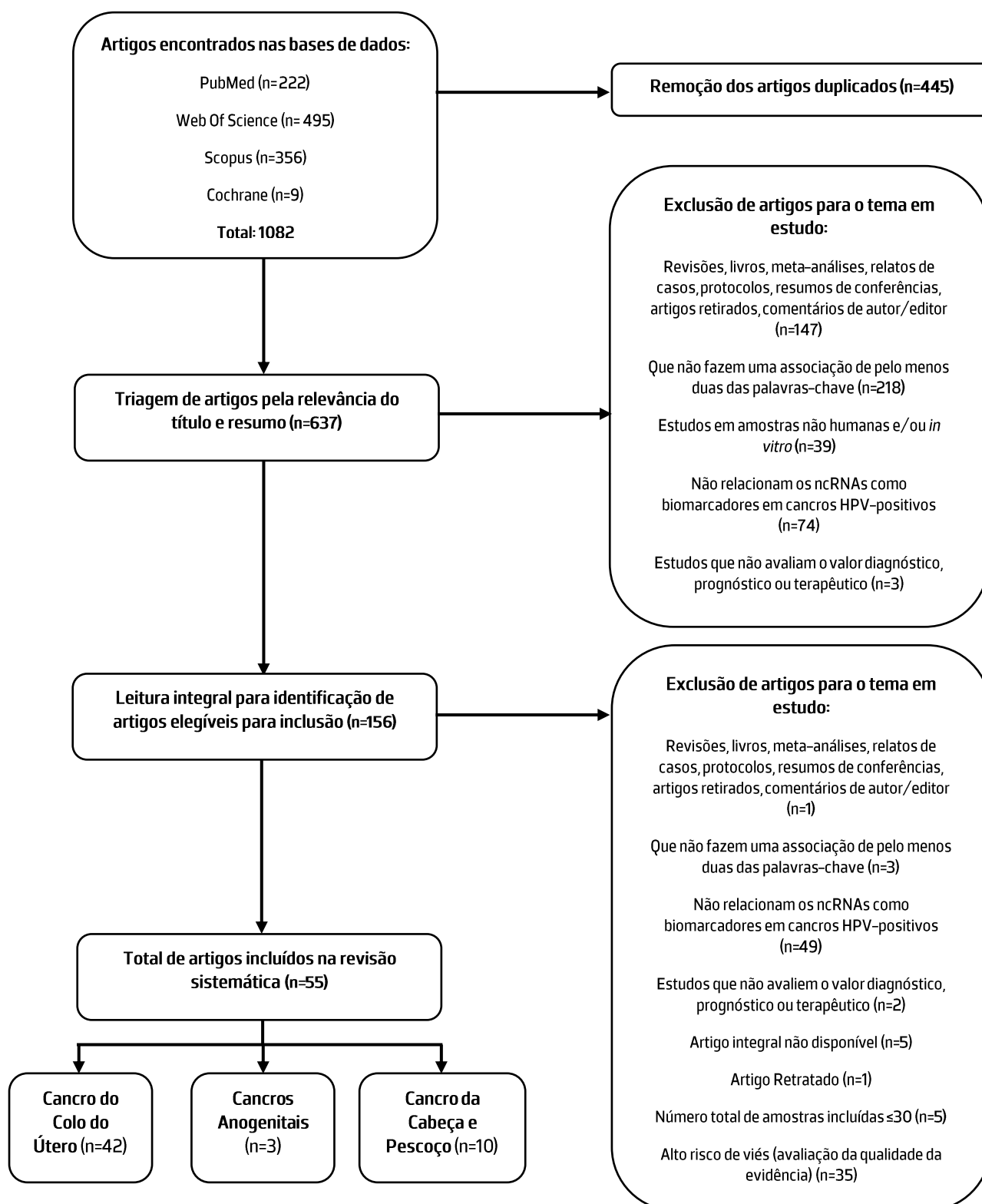
- cancer cell proliferation via upregulating PCNA. *Tumor Biol.* 2015;36(10):7615–22.
162. Jihad NA, Naif HM. Evaluation of microRNA-20, -21 and-143 expression in human papilloma virus induced premalignant and malignant cervical lesions. *Gene Reports.* 2020;20.
 163. Mayne GC, Woods CM, Dharmawardana N, Wang T, Krishnan S, Hodge JC, et al. Cross validated serum small extracellular vesicle microRNAs for the detection of oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Transl Med.* 2020 Jul;18(1).
 164. Salazar-Ruales C, Arguello J-V, Lopez-Cortes A, Cabrera-Andrade A, García-Cárdenas J, Guevara-Ramírez P, et al. Salivary MicroRNAs for Early Detection of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Case-Control Study in the High Altitude Mestizo Ecuadorian Population. *Biomed Res Int.* 2018;2018(1).
 165. Dudea-Simon M, Mihiu D, Pop LA, Ciortea R, Malutan AM, Diculescu D, et al. Alteration of Gene and miRNA Expression in Cervical Intraepithelial Neoplasia and Cervical Cancer. *Int J Mol Sci.* 2022;23(11).
 166. An F, Zhang Z, Xia M, Xing L. Subpath analysis of each subtype of head and neck cancer based on the regulatory relationship between miRNAs and biological pathways. *Oncol Rep.* 2015;34(4):1745–54.
 167. Pulati N, Zhang Z, Gulimilamu A, Qi X, Yang J. HPV16+ -miRNAs in cervical cancer and the anti-tumor role played by miR-5701. *J Gene Med.* 2019;21(11).
 168. Song L, Liu S, Yao H, Zhang L, Li Y, Xu D, et al. MiR-362-3p is downregulated by promoter methylation and independently predicts shorter OS of cervical squamous cell carcinoma. *Biomed Pharmacother.* 2019;115.
 169. Guan X, Sturgis EM, Song X, Liu Z, El-Naggar AK, Wei Q, et al. Pre-microRNA variants predict HPV16-positive tumors and survival in patients with squamous cell carcinoma of the oropharynx. *Cancer Lett.* 2013;330(2):233–40.
 170. Coimbra EC, Gomes Leitao MDC, Barros Junior MR, Araujo De Oliveira TH, Silva Neto JDC, De Freitas AC. Expression Profile of MicroRNA-203 and its Delta Np63 Target in Cervical Carcinogenesis: Prospects for Cervical Cancer Screening. *Anticancer Res.* 2016;36(8):3839–46.
 171. Zhu H, Zhu C, Feng X, Luo Y. Long noncoding RNA SNHG3 promotes malignant phenotypes in cervical cancer cells via association with YAP1. *Hum Cell.* 2022;35(1):320–32.
 172. Xu Z, Zhou Y, Shi F, Cao Y, Dinh TLA, Wan J, et al. Investigation of differentially-expressed

microRNAs and genes in cervical cancer using an integrated bioinformatics analysis. *Oncol Lett.* 2017;13(4):2784–90.

ANEXOS

ANEXO 1 – Representação Esquemática da Metodologia de Pesquisa (baseada no método PRISMA)

Figura 6 – Representação Esquemática da Metodologia de Pesquisa (baseada no método PRISMA)



ANEXO 2 – Domínios e Questões

Domínio 1: População (pacientes com neoplasias malignas induzidas pelo HPV)

- Questão 1: Os critérios de inclusão/exclusão dos pacientes estão descritos? (Sim-Baixo; Intermédio: pelo menos um dos dois; Não-Alto)
- Questão 2: Grupos em estudo estão bem definidos? (Sim-Baixo; Não-Alto)
- Questão 3: Número por grupo; $n \leq 30$ (alto risco de viés) ($n \leq 30$ -Alto; $31 < n \leq 50$ -Intermédio; $50 < n$ -Baixo)
- Questão 4: Recrutamento dos pacientes é realizada de forma prospetiva ou retrospectiva? (Prospetiva-Baixo-; Retrospectiva-Intermédio)

Domínio 2: Avaliação do Objetivo de Estudo

- Questão 1: O objetivo do estudo foi especificado? (procura por biomarcadores de diagnóstico, prognóstico ou preditivos de resposta?) (Sim-Baixo; Não-Alto)
- Questão 2: O biomarcador foi avaliado no momento adequado de acordo com o objetivo de estudo? (Sim-Baixo; Não/Não Descrito-Alto)

Domínio 3: Metodologia de deteção (HPV/Biomarcador)

- Questão 1: A metodologia foi corretamente explicada? (Sim-Baixo; Não-Alto)
- Questão 2: A normalização dos resultados foi avaliada/especificada? (Sim-Baixo; Não/Não Descrito-Alto)
- Questão 3: Métodos diretos para a deteção do HPV? (métodos indiretos como a avaliação de p16 associado a alto risco de viés) (Diretos-Baixo; Ambos-Intermédio; Indireto/Não Descrito-Alto)

Domínio 4: Análise Estatística e Demonstração de Resultados

- Questão 1: Os testes estatísticos foram corretamente efetuados? (Muito Bem-Baixo; Intermédio-Relativamente Bem; Mal efetuados-Alto)
- Questão 2: A análise estatística efetuada permite responder à questão colocada? (Sim-Baixo; Não-Alto)
- Questão 3: A sensibilidade e especificidade do biomarcador em questão, nos casos em que é relevante, são referidas? (Sim-Baixo; Não-Alto)
- Questão 4: As limitações/viéses são mencionadas? (Sim-Baixo; Não-Alto)

ANEXO 3 – *Outputs* resultantes da revisão sistemática

A presente revisão sistemática foi realizada no âmbito da conclusão do mestrado em Análises Clínicas e Saúde Pública – ramo de Microbiologia e Saúde Pública.

Parte dos resultados desta revisão foram apresentados, sob a forma de poster, no 6º Encontro Nacional de Jovens Investigadores em Oncologia (ENJIO): Alves, L. E., Amorim, M. M., Santos, J. M. O.*, Rodrigues, C. A.*, "MiRs como biomarcadores em cancros da cabeça e pescoço HPV-positivos: uma revisão sistemática", Porto, Portugal, 2024 (ANEXO 6, Figura 7, Figura 8)

*últimos autores conjuntos

Encontra-se em preparação um artigo científico para submissão em revista internacional, focando em miRs como biomarcadores de diagnóstico nos cancros relacionados com o HPV.

ANEXO 4 – Resultados da Avaliação da Qualidade da Evidência

Tabela 6 – Resultados da Avaliação da Qualidade da Evidência

Referência	Ano	Domínio 1					Domínio 2			Domínio 3				Domínio 4					CF	
		Q1	Q2	Q3	Q4	D1	Q1	Q2	D2	Q1	Q2	Q3	D3	Q1	Q2	Q3	Q4	D4		
(70)	2021	I	B	I	B	I	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
(65)	2020	I	B	I	B	I	B	B	B	A	B	B	I	B	B	A	A	I	I	I
(104)	2020	I	B	I	I	I	B	B	B	A	B	B	I	B	B	A	A	I	I	I
(106)	2022	B	B	A	I	A	B	B	B	B	B	B	B	I	A	A	B	A	A	I
(71)	2015	I	B	I	I	I	B	A	I	B	B	B	B	I	B	A	A	A	A	I
(79)	2019	I	B	B	I	I	B	A	I	B	B	B	B	B	B	A	B	I	I	I
(139)	2021	I	B	A	I	A	B	A	I	B	B	B	B	I	B	A	B	A	A	A
(72)	2015	I	B	A	B	A	B	A	I	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	I
(75)	2021	I	B	I	I	I	B	A	I	A	B	B	I	I	B	A	A	A	A	I
(140)	2018	I	B	A	I	A	B	B	B	A	B	B	I	I	B	A	A	A	A	A
(76)	2018	B	B	A	I	A	B	B	B	B	B	B	B	I	B	A	A	A	A	I
(66)	2017	I	B	B	I	I	B	A	I	B	B	B	B	B	B	B	A	I	I	I
(78)	2018	I	B	B	I	I	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
(109)	2021	I	B	B	I	I	B	A	I	A	B	A	A	B	B	A	B	I	I	I
(80)	2020	I	B	I	I	I	B	B	B	A	B	B	I	I	B	A	A	A	A	I
(67)	2016	I	B	B	I	I	B	B	B	B	B	B	B	I	B	A	A	A	A	I
(141)	2015	I	B	A	I	A	B	B	B	A	B	B	I	I	B	A	A	A	A	A
(142)	2015	I	B	I	I	I	B	B	B	A	B	A	A	I	B	A	A	A	A	A
(143)	2013	I	B	A	I	A	B	A	I	B	B	B	B	I	B	A	B	A	A	A
(112)	2018	I	B	B	I	I	B	A	I	B	B	B	B	B	B	A	B	I	I	I
(144)	2016	I	B	A	I	A	B	B	B	B	B	A	I	I	B	A	A	A	A	A
(62)	2021	B	B	B	I	I	B	A	I	B	B	B	B	I	B	B	B	I	I	I
(103)	2017	I	B	B	I	I	B	B	B	B	A	A	A	B	B	B	B	B	B	I
(145)	2016	I	B	A	I	A	B	B	B	A	B	B	I	I	B	A	B	A	A	A
(81)	2014	B	B	I	I	I	B	B	B	B	B	B	B	I	B	B	B	I	I	I
(111)	2013	I	B	B	B	I	B	B	B	B	B	B	B	I	B	A	A	A	A	I
(74)	2018	I	B	I	I	I	B	A	I	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	I
(146)	2021	I	B	B	B	I	B	B	B	A	B	I	A	I	B	A	B	A	A	A
(147)	2016	I	B	B	I	I	B	A	I	A	A	A	A	I	B	A	A	A	A	A
(64)	2020	B	B	B	I	I	B	A	I	A	B	A	A	B	B	A	B	I	I	I
(148)	2020	I	B	I	I	I	B	A	I	A	B	A	A	I	B	A	A	A	A	A
(149)	2019	I	B	I	I	I	B	B	B	A	B	A	A	I	B	A	A	A	A	A
(99)	2022	B	B	B	I	I	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
(94)	2022	B	B	B	I	I	B	B	B	B	B	A	I	B	B	B	B	B	B	I
(96)	2018	I	B	B	I	I	B	B	B	B	B	A	I	I	B	A	B	A	A	I
(150)	2021	B	B	A	I	A	B	B	B	A	A	B	A	B	B	A	B	I	A	A
(114)	2023	B	B	A	I	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	I
(151)	2020	I	B	A	I	A	B	A	I	B	B	A	I	I	B	A	A	A	A	A
(77)	2019	B	B	A	I	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	I
(105)	2021	I	B	B	I	I	B	B	B	B	B	B	B	I	B	A	B	A	A	I

Tabela 6 (continuação)

Referência	Ano	Domínio 1					Domínio 2			Domínio 3				Domínio 4					CF
		Q1	Q2	Q3	Q4	D1	Q1	Q2	D2	Q1	Q2	Q3	D3	Q1	Q2	Q3	Q4	D4	
(152)	2021	I	B	B	I	I	B	A	I	A	B	A	A	I	B	A	B	A	A
(110)	2023	B	B	I	I	I	B	B	B	B	B	B	B	B	B	A	B	I	I
(153)	2016	I	B	A	B	A	B	A	I	B	B	B	B	I	B	A	A	A	A
(82)	2021	B	B	B	I	I	B	A	I	B	B	B	B	B	B	B	B	B	I
(91)	2022	B	B	B	I	I	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
(100)	2022	B	B	B	I	I	B	B	B	B	B	B	B	I	B	A	A	A	I
(113)	2022	I	B	I	B	I	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	I
(124)	2021	I	B	A	I	A	B	A	I	A	B	B	I	I	B	A	B	A	A
(154)	2015	I	B	I	I	I	B	A	I	A	B	A	A	I	B	A	A	A	A
(155)	2018	I	B	A	I	A	B	A	I	A	B	B	I	I	B	A	A	A	A
(115)	2017	I	B	B	I	I	B	A	I	B	B	B	B	B	B	B	B	B	I
(92)	2021	B	B	I	I	I	B	B	B	B	B	A	I	B	B	B	B	B	I
(156)	2021	I	B	A	I	A	B	A	I	A	B	A	A	I	B	A	B	A	A
(83)	2018	B	B	I	I	I	B	B	B	B	B	B	B	I	B	B	B	I	I
(157)	2020	I	B	A	I	A	B	A	I	A	B	B	I	I	B	A	A	A	A
(84)	2020	I	B	I	I	I	B	A	I	B	B	A	I	I	B	B	B	I	I
(158)	2015	I	B	A	I	A	B	B	B	A	B	B	I	I	B	A	A	A	A
(159)	2019	I	B	I	I	I	B	A	I	A	B	A	A	I	B	A	B	A	A
(160)	2014	I	B	A	I	A	B	B	B	A	B	A	A	I	B	A	A	A	A
(161)	2015	I	B	B	I	I	B	A	I	A	B	A	A	I	B	A	A	A	A
(73)	2021	I	B	A	I	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	A	A	I	I
(162)	2020	B	A	A	I	A	B	B	B	A	B	A	A	I	B	A	A	A	A
(163)	2020	B	B	I	I	I	B	B	B	A	B	A	A	I	A	B	B	A	A
(164)	2018	B	B	B	I	I	B	A	I	A	B	A	A	I	B	A	A	A	A
(97)	2022	I	B	B	I	I	B	A	I	A	B	A	A	B	B	B	A	I	I
(165)	2022	I	B	I	B	I	B	A	I	A	B	A	A	I	B	A	A	A	A
(85)	2020	B	B	I	I	I	B	A	I	B	B	A	I	I	B	B	B	I	I
(86)	2021	B	B	I	I	I	B	B	B	B	B	A	I	I	B	B	B	I	I
(117)	2018	I	B	I	I	I	B	A	I	B	A	A	A	B	B	A	A	I	I
(166)	2015	B	B	I	I	I	B	B	B	A	A	A	A	I	B	A	A	A	A
(167)	2019	I	B	A	I	A	B	B	B	A	A	A	A	I	B	A	B	A	A
(87)	2021	B	B	B	I	I	B	B	B	B	A	B	I	B	B	B	B	B	I
(168)	2019	I	B	A	I	A	B	A	I	A	A	B	A	B	B	A	A	I	A
(88)	2018	I	B	I	I	I	B	A	I	B	B	B	B	B	B	A	B	I	I
(169)	2013	I	B	B	I	I	B	A	I	A	A	B	A	I	B	A	B	A	A
(170)	2016	B	B	A	I	A	B	A	I	B	B	B	B	I	B	A	B	A	A
(102)	2018	I	B	I	I	I	B	A	I	B	B	A	I	I	B	A	A	A	I
(101)	2019	I	B	B	I	I	B	B	B	B	B	A	I	I	B	A	A	A	I
(68)	2019	I	B	I	I	I	B	A	I	B	B	A	I	I	B	A	A	A	I
(69)	2020	I	B	I	I	I	B	A	I	B	B	A	I	I	B	B	A	A	I
(63)	2020	I	B	I	I	I	B	B	B	B	B	A	I	B	B	A	B	I	I
(98)	2021	B	B	A	B	I	B	B	B	B	B	A	I	B	B	B	B	B	I
(171)	2022	I	B	B	I	I	B	A	I	A	B	A	A	I	B	A	A	A	A

Tabela 6 (continuação)

Referência	Ano	Domínio 1					Domínio 2			Domínio 3				Domínio 4					CF
		Q1	Q2	Q3	Q4	D1	Q1	Q2	D2	Q1	Q2	Q3	D3	Q1	Q2	Q3	Q4	D4	
(108)	2023	I	B	B	I	I	B	A	I	B	B	A	I	B	B	A	A	I	I
(93)	2013	I	B	B	I	I	B	B	B	B	B	A	I	B	B	A	A	I	I
(116)	2020	I	B	I	I	I	B	A	I	B	A	A	A	B	B	A	A	I	I
(172)	2017	I	B	A	I	A	B	A	I	A	B	A	A	I	B	A	A	A	A
(90)	2019	B	B	I	I	I	B	B	B	B	B	B	B	B	B	A	B	I	I
(95)	2023	B	B	A	I	A	B	B	B	B	B	A	I	B	B	A	A	I	I
(89)	2015	I	B	I	I	I	B	B	B	B	B	B	B	I	B	A	A	A	I

Legenda: Q1 = Questão 1, Q2 = Questão 2, Q3 = Questão 3, Q4 = Questão 4; D1 = Domínio 1, D2 = Domínio 2, D3 = Domínio 3, D4 = Domínio 4; A = Alto risco de viés, B = Baixo risco de viés, I = Risco intermédio de viés; CF = Classificação Final

ANEXO 5 – Informação Resumo/Chave dos Artigos Seleccionados para Inclusão

Tabela 7 – Cancro do Colo do Útero – Diagnóstico

Autor/ Ano (Referência)	País(es) de origem	Grupo(s) Controlo	Tipo de amostra	Biomarcador(es) estudado(s)	Expressão	Método de análise / controlo endógeno	Significância estatística (valor de p)	AUC (IC 95%) / valor de p	Sensibilidade / Especificidade (%) (IC 95%)	Medidas de associação (IC 95%)	Valor clínico do biomarcador
Liu <i>et al.</i> / 2020 (65)	China	CS, LPC	CE cervicais de doentes com CCU	miR-21	↑	qRT-PCR / U6 snRNA	0.018	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ amostras cancerígenas vs. LPC)
				miR-34a	↑		0.021 (1) 0.004 (2)	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ amostras cancerígenas vs. CS (1) e vs. LPC (2))
Gocze <i>et al.</i> / 2015 (71)	Hungria	LPC (CIN 2-3)	Tecido tumoral FFPE	miR-27a	↓	qRT-PCR / 5S rRNA	0.033	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ amostras cancerígenas vs. LPC)
				miR-34a	↓		0.025	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ amostras cancerígenas vs. LPC)
				miR-196a	↓		0.016	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ amostras cancerígenas vs. LPC)
				miR-203	↓		0.032	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ amostras cancerígenas vs. LPC)
Ribeiro <i>et al.</i> / 2015 (72)	Portugal	Controlos com citologias normais HPV-positivas	CE cervicais HPV-positivas	miR-34a	↑	qRT-PCR / miR-23a	0.042	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ amostras cancerígenas vs. controlos)
				miR-125b	↓		0.004	0.802 (ND)	88% (ND) / 69% (ND)	ND	Diagnóstico (↓ amostras cancerígenas vs. controlos)
Jihad <i>et al.</i> / 2021 (75)	Iraque	Tecido cervical de CS	Tecido tumoral cervical FFPE	miR-155	↑	qRT-PCR / U6 snRNA	0.002	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ amostras cancerígenas vs. CS)
Wang <i>et al.</i> / 2018 (76)	China	CS + LPC (CIN 1-2)	CIN 3 + Tecido tumoral cervical	miR-155-5p	↓	qRT-PCR / U6 snRNA	<0.05	ND	ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ CIN 3 + amostras cancerígenas vs. CS + LPC CIN 1-2)

Tabela 7 (continuação)

Autor/ Ano (Referência)	País(es) de origem	Grupo(s) Controlo	Tipo de amostra	Biomarcador(es) estudado(s)	Expressão	Método de análise / controlo endógeno	Significância estatística (valor de p)	AUC (IC 95%) / valor de p	Sensibilidade / Especificidade (%) (IC 95%)	Medidas de associação (IC 95%)	Valor clínico do biomarcador
Park <i>et al.</i> / 2017 (66)	Coreia do Sul	Tecido cervical de CS	Tecido tumoral cervical FFPE	miR-9	↑	qRT-PCR / RNU6B	<0.0001	0.7565 (0.6624-0.8507)	67.3% (52.9-79.7)	ND	Diagnóstico (↑ amostras cancerígenas vs. CS)
				miR-21	↑		<0.0001	0.8325 (0.7530-0.9120)	82.7% (69.7-91.8)	ND	Diagnóstico (↑ amostras cancerígenas vs. CS)
				miR-155	↑		<0.0001	0.8492 (0.7736-0.9249)	65.4% (50.9-78.0)	ND	Diagnóstico (↑ amostras cancerígenas vs. CS)
Liu <i>et al.</i> / 2018 (78)	China	Tecido cervical de CS	Tecido tumoral cervical	miR-20a	↑	qRT-PCR / RNU6B	<0.0001	0.822 (0.760-0.885)	70.7% (57.3-81.9)	ND	Diagnóstico (↑ amostras cancerígenas vs. CS)
				miR-92a	↑		0.0003	0.659 (0.582-0.737)	56.9% (43.2-69.8)	ND	Diagnóstico (↑ amostras cancerígenas vs. CS)
				miR-141	↑		<0.0001	0.942 (0.912-0.973)	82.8% (70.6-91.4)	ND	Diagnóstico (↑ amostras cancerígenas vs. CS)

Tabela 7 (continuação)

Autor/ Ano (Referência)	País(es) de origem	Grupo(s) Controlo	Tipo de amostra	Biomarcador(es) estudado(s)	Expressão	Método de análise / controlo endógeno	Significância estatística (valor de p)	AUC (IC 95%) / valor de p	Sensibilidade / Especificidade (%) (IC 95%)	Medidas de associação (IC 95%)	Valor clínico do biomarcador
Liu <i>et al.</i> / 2018 (continuação) (78)	China	Tecido cervical de CS	Tecido tumoral cervical	miR-183*	↑		<0.0001	0.785 (0.717-0.852)	65.5% (51.9-77.5) 79.3% (71.8-85.6)	ND	Diagnóstico (↑ amostras cancerígenas vs. CS)
				miR-210	↑		<0.0001	0.751 (0.679-0.822)	81.0% (68.6-90.1) 60.7% (52.2-68.7)	ND	Diagnóstico (↑ amostras cancerígenas vs. CS)
				miR-944	↑		<0.0001	0.677 (0.586-0.769)	62.0% (48.4-74.5) 74.5% (66.6-81.4)	ND	Diagnóstico (↑ amostras cancerígenas vs. CS)
				Combinação miR-20a, miR-92a, miR-141, miR-183*, miR-210, miR-944	↑		ND	0.959 (0.932-0.987)	91.4% (81.0-97.1) 87.6% (81.1-92.5)	ND	Diagnóstico (↑ amostras cancerígenas vs. CS)
Liu <i>et al.</i> / 2020 (80)	China	Tecido cervical de CS	Tecido tumoral cervical	miR-218	↓	qRT-PCR / GAPDH, U6 snRNA	<0.001	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ amostras cancerígenas vs. CS)
		Plasma de CS	Plasma de doentes com CCU		↓		<0.01	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ plasma de doentes com CCU vs. CS)
		Tecido tumoral cervical HPV-negativo	Tecido tumoral cervical HPV-positivo		↓		<0.01	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ amostras tumorais HPV-positivas vs. amostras tumorais HPV-negativas)

Tabela 7 (continuação)

Autor/ Ano (Referência)	País(es) de origem	Grupo(s) Controlo	Tipo de amostra	Biomarcador(es) estudado(s)	Expressão	Método de análise / controlo endógeno	Significância estatística (valor de p)	AUC (IC 95%) / valor de p	Sensibilidade / Especificidade (%) (IC 95%)	Medidas de associação (IC 95%)	Valor clínico do biomarcador
Sharma <i>et al.</i> / 2016 (67)	Índia	CE cervicais e tecido cervical de CS	Tecido tumoral cervical (Estádios I-II e III-IV)	let-7a	↓	qRT-PCR / U6 snRNA, RNU43 snoRNA, Hm/Ms/Rt U1 snRNA	<0.001	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ amostras cancerígenas vs. CS)
				miR-146a	↑		<0.001	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ amostras cancerígenas vs. CS)
				miR-95	↑		<0.001	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ amostras cancerígenas vs. CS)
				miR-200b	↑		<0.001	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ amostras cancerígenas vs. CS)
				miR-21	↑		<0.001	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ amostras cancerígenas vs. CS)
				miR-34a	↓		<0.001	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ amostras cancerígenas vs. CS)
				miR-1	↓		<0.001	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ amostras cancerígenas vs. CS)
				miR-3130-5p	↑		<0.001	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ amostras cancerígenas vs. CS)
				miR-576-3p	↑		<0.001	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ amostras cancerígenas vs. CS)
				miR-29a	↓		<0.001	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ amostras cancerígenas vs. CS)
				miR-449b	↑		<0.001	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ amostras cancerígenas vs. CS)
				miR-23b	↓		<0.001	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ amostras cancerígenas vs. CS)
				miR-136	↑		<0.001	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ amostras cancerígenas vs. CS)
				miR-19a	↓		<0.001	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ amostras cancerígenas vs. CS)
miR-222	↓	<0.001	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ amostras cancerígenas vs. CS)					

Tabela 7 (continuação)

Autor/ Ano (Referência)	País(es) de origem	Grupo(s) Controlo	Tipo de amostra	Biomarcador(es) estudado(s)	Expressão	Método de análise / controlo endógeno	Significância estatística (valor de p)	AUC (IC 95%) / valor de p	Sensibilidade / Especificidade (%) (IC 95%)	Medidas de associação (IC 95%)	Valor clínico do biomarcador
Sharma <i>et al.</i> / 2016 (continuação) (67)	Índia	CE cervicais e tecido cervical de CS	Tecido tumoral cervical (Estádios I-II e III-IV)	miR-184	↑	qRT-PCR / U6 snRNA, RNU43 snoRNA, Hm/Ms/Rt U1 snRNA	<0.001	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ amostras cancerígenas vs. CS)
				miR-17	↑		<0.001	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ amostras cancerígenas vs. CS)
Bonde <i>et al.</i> / 2021(62)	Escócia, Dinamarca, Eslovénia, Países Baixos	LPC	CE cervicais de doentes com CCU	Metilação de FAM19A4/miR124-2	↑	RT-PCR multiplex / β-actina	ND	ND	95.0% (71.0-99.0) / ND	ND	Diagnóstico (presença da metilação em amostras de doentes com CCU vs. CS)
Babion <i>et al.</i> / 2018 (74)	Países Baixos	Amostras cervicais de CS	CE cervicais de doentes com CCE do útero	miR-9-5p		qRT-PCR / RNU24, miR-423-5p	<0.005	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ amostras de CCE vs. CS)
				miR-15b-5p	↑		<0.005	ND	100% (ND) / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ amostras de CCE vs. CS)
				miR-125b-5p	↓		<0.05	ND	69.0% (ND) / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ amostras de CCE vs. CS)
				miR-149-5p	↓		<0.05	ND	93.1% (ND) / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ amostras de CCE vs. CS)
				miR-375	↓		<0.005	ND	96.6% (ND) / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ amostras de CCE vs. CS)
				Combinação miR-15b-5p, miR-375	ND		ND	ND	100% (ND) / ND	ND	Sem referência concreta ao valor clínico da combinação
			CE cervicais de doentes com AD do útero	miR-9-5p	↑		<0.005	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ amostras de AD vs. CS)
				miR-15b-5p	↑		<0.005	ND	100% (ND) / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ amostras de AD vs. CS)
				miR-125b-5p	↓		<0.005	ND	100% (ND) / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ amostras de AD vs. CS)
				miR-149-5p	↓		<0.005	ND	100% (ND) / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ amostras de AD vs. CS)
				Combinação miR-15b-5p, miR-375	ND		ND	ND	100% (ND) / ND	ND	Sem referência concreta ao valor clínico da combinação
			Tecido cervical de doentes com CCE do útero	miR-9-5p	↑		<0.05	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ amostras de tecido de CCE vs. CS)
				miR-15b-5p	↑		<0.005	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ amostras de tecido de CCE vs. CS)

Tabela 7 (continuação)

Autor/ Ano (Referência)	País(es) de origem	Grupo(s) Controlo	Tipo de amostra	Biomarcador(es) estudado(s)	Expressão	Método de análise / controlo endógeno	Significância estatística (valor de p)	AUC (IC 95%) / valor de p	Sensibilidade / Especificidade (%) (IC 95%)	Medidas de associação (IC 95%)	Valor clínico do biomarcador
Babion <i>et al.</i> / 2018 (continuação) (74)	Países Baixos	Amostras cervicais de CS	Tecido cervical de doentes com CCE do útero	miR-125b-5p	↓	qRT-PCR / RNU24, miR-423-5p	<0.05	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ amostras de tecido de CCE vs. CS)
				miR-149-5p	↓		<0.005	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ amostras de tecido de CCE vs. CS)
				miR-203a-3p	↓		<0.005	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ amostras de tecido de CCE vs. CS)
				miR-375	↓		<0.005	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ amostras de tecido de CCE vs. CS)
Cheng <i>et al.</i> / 2022 (94)	China	Plasma de CS	Plasma de doentes com CCU	circMT01	↑	qRT-PCR / β-actina, U6 snRNA	<0.001	0.9340 (ND)	92.8% (ND) / 86.84% (ND)	Análise multivariada: OR: 2.587 (1.168-5.733) (p = 0.019)	Diagnóstico (↑ plasma de doentes com CCU vs. CS; ↑ da expressão confere risco de infeção por HPV de alto risco)
		Plasma de doentes com CCU HPV-negativos	Plasma de doentes com CCU HPV-positivos		↑		<0.001	0.8511 (ND)	56.41% (ND) / 100% (ND)	ND	Diagnóstico (↑ plasma de doentes HPV-positivos vs. doentes HPV-negativos)
Zhang <i>et al.</i> / 2018 (96)	ND (GEO: GSE26511 + TCGA)	ND	ND	lncRNA ANRIL	↑	Affymetrix Human Genome 61 U133 Plus 2.0 Array / Affy package in R software	0.0062	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ amostras de lesões tumorais)
	China	Tecido adjacente não tumoral	Tecido tumoral de doentes com CCU		↑	qRT-PCR / GAPDH	<0.05	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ amostras de lesões tumorais vs. tecido adjacente não tumoral)

Tabela 7 (continuação)

Autor/ Ano (Referência)	País(es) de origem	Grupo(s) de Controle	Tipo de amostra	Biomarcador(es) estudado(s)	Expressão	Método de análise / controle endógeno	Significância estatística (valor de p)	AUC (IC 95%) / valor de p	Sensibilidade / Especificidade (%) (IC 95%)	Medidas de associação (IC 95%)	Valor clínico do biomarcador
Farzanehpour <i>et al.</i> / 2019 (77)	Irão	Amostras não tumorais	Soro de pacientes com CCU	miR-9	↑	qRT-PCR / U6 snRNA	<0.0001	0.99 (0.99-1.00)	100% (ND) / 94.4% (ND)	ND	Diagnóstico (↑ soro de doentes vs. amostras não tumorais)
				miR-192	↑		<0.0001	1.00 (1.00-1.00)	100% (ND) / 94.4% (ND)	ND	Diagnóstico (↑ soro de doentes vs. amostras não tumorais)
				miR-205	↑		<0.0001	0.96 (0.86-1.00)	88.2% (ND) / 88.9% (ND)	ND	Diagnóstico (↑ soro de doentes vs. amostras não tumorais)
			Tecido tumoral de pacientes com CCU	miR-9	↑		0.0008	0.80 (0.66-0.95)	58.8% (ND) / 94.1% (ND)	ND	Diagnóstico (↑ tecido tumoral vs. amostras não tumorais)
				miR-192	↑		<0.0001	0.81 (0.73-1.00)	75.0% (ND) / 94.1% (ND)	ND	Diagnóstico (↑ tecido tumoral vs. amostras não tumorais)
				miR-205	↑		0.0005	0.79 (0.64-0.95)	56.2% (ND) / 94.1% (ND)	ND	Diagnóstico (↑ tecido tumoral vs. amostras não tumorais)
Yu <i>et al.</i> / 2021 (82)	China	Tecido adjacente normal de pacientes com LPC ou cervicite	Tecido tumoral de pacientes com CCU	miR-145	↓	qRT-PCR / U6 snRNA	<0.001	0.878 (0.724-0.933) (p<0.001)	90.5% (ND) / 82.2% (ND)	ND	Diagnóstico (↓ tecido tumoral vs. amostras não tumorais)
				miR-205	↑		<0.001	0.881 (0.825-0.938) (p<0.001)	86.9% (ND) / 88.9% (ND)	ND	Diagnóstico (↑ tecido tumoral vs. amostras não tumorais)
Kawai <i>et al.</i> / 2018 (83)	Japão	CS	Muco do colo do útero de pacientes com CCE	miR-126-3p	↑	qRT-PCR / RNU48	ND	0.91 (0.84-0.99)	86.0% (ND) / 91.0% (ND)	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ amostras de muco de CCE do colo do útero vs. controles normais); Valor de significância não reportado
				miR-20b-5p	↑		ND	0.94 (0.89-0.98)	83.0% (ND) / 93.0% (ND)	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ amostras de muco de CCE do colo do útero vs. controles normais); Valor de significância não reportado
				miR-451a	↑		ND	0.96 (0.92-1.00)	91.0% (ND) / 95.0% (ND)	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ amostras de muco de CCE do colo do útero vs. controles normais); Valor de significância não reportado

Tabela 7 (continuação)

Autor/ Ano (Referência)	País(es) de origem	Grupo(s) Controlo	Tipo de amostra	Biomarcador(es) estudado(s)	Expressão	Método de análise / controlo endógeno	Significância estatística (valor de p)	AUC (IC 95%) / valor de p	Sensibilidade / Especificidade (%) (IC 95%)	Medidas de associação (IC 95%)	Valor clínico do biomarcador
Kawai <i>et al.</i> / 2018 (continuação) (83)	Japão	CS	Muco do colo do útero de pacientes com CCE	miR-144-3p	↑	qRT-PCR / RNU48	ND	0.95 (0.90-1.00)	89.0% (ND) / 93.0% (ND)	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ amostras de muco de CCE do colo do útero vs. controlos normais); Valor de significância não reportado
			Muco do colo do útero de pacientes com AD	miR-126-3p	↑		ND	ND	ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ amostras de muco de AD do colo do útero vs. controlos normais); Valor de significância não reportado
				miR-20b-5p	↑		ND	ND	ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ amostras de muco de AD do colo do útero vs. controlos normais); Valor de significância não reportado
				miR-451a	↑		ND	ND	ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ amostras de muco de AD do colo do útero vs. controlos normais); Valor de significância não reportado
				miR-144-3p	↑		ND	ND	ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ amostras de muco de AD do colo do útero vs. controlos normais); Valor de significância não reportado
			Muco do colo do útero de ambos os pacientes com AD e CCE	miR-126-3p	ND		ND	0.89 (0.82-0.96)	81.0% (ND) / 91.0% (ND)	ND	Potencialmente diagnóstico Valor de expressão e significância não reportados
				miR-20b-5p	ND		ND	0.90 (0.85-0.96)	74.0% (ND) / 93.0% (ND)	ND	Potencialmente diagnóstico (Valor de expressão e significância não reportados)
				miR-451a	ND		ND	0.94 (0.90-0.99)	83.0% (ND) / 91.0% (ND)	ND	Potencialmente diagnóstico (Valor de expressão e significância não reportados)
				miR-144-3p	ND		ND	0.93 (0.89-0.98)	87.0% (ND) / 89.0% (ND)	ND	Potencialmente diagnóstico (Valor de expressão e significância não reportados)

Tabela 7 (continuação)

Autor/ Ano (Referência)	País(es) de origem	Grupo(s) Controle	Tipo de amostra	Biomarcador(es) estudado(s)	Expressão	Método de análise / controle endógeno	Significância estatística (valor de p)	AUC (IC 95%) / valor de p	Sensibilidade / Especificidade (%) (IC 95%)	Medidas de associação (IC 95%)	Valor clínico do biomarcador
Zheng <i>et al.</i> / 2020 (84)	China	Soro de CS	Soro de doentes com CCU	miR-638	↓	qRT-PCR / miR-39-3p	<0.001	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ soro de doentes vs. soro de CS)
				miR-521	↓		<0.001	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ soro de doentes vs. soro de CS)
				miR-203a-3p	↓		<0.05	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ soro de doentes vs. soro de CS)
		Soro de doentes com LPC	Soro de doentes com CCU	miR-638	↓		<0.05	0.681 (ND) (p=0.005)	85.0% (ND) / 86.1% (ND)	ND	Diagnóstico (↓ soro de doentes vs. soro de LPC)
				miR-521	↓		<0.01	0.716 (ND) (p=0.001)	62.5% (ND) / 76.92% (ND)	ND	Diagnóstico (↓ soro de doentes vs. soro de LPC)
				miR-203a-3p	↓		<0.05	0.651 (ND) (p=0.025)	42.5% (ND) / 82.05% (ND)	ND	Diagnóstico (↓ soro de doentes vs. soro de LPC)
				miR-1914-5p	↓		0.01	0.717 (ND) (p<0.001)	82.5% (ND) / 61.54% (ND)	ND	Diagnóstico (↓ soro de doentes vs. soro de LPC)
Ghanbari <i>et al.</i> / 2022 (97)	Irão	Tecido adjacente não tumoral	Tecido tumoral de doentes com CCU	lncRNA MVIH	↑	qRT-PCR / β-actina	<0.0001	0.8114 (0.7569– 0.8660) (p<0.0001)	67.83% (ND) / 80.0% (ND)	ND	Diagnóstico (↑ tecido tumoral de doentes vs. tecido não tumoral adjacente das mesmas doentes)
Ocadiz-Delgado <i>et al.</i> / 2021 (73)	México	CS	Tecido tumoral de doentes com CCU	miR-15b	↑	qRT-PCR / β2-microglobulina (β2-M) mRNA	<0.001	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ tecido tumoral de doentes vs. CS)
				miR-34a	↓		<0.001	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ tecido tumoral de doentes vs. CS)
				miR-218	↓		<0.01	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ tecido tumoral de doentes vs. CS)
			Soro de doentes com CCU	miR-15b	↑		<0.001	0.8173 (ND)	ND / ND	ND	Diagnóstico (↑ soro de doentes vs. CS)
				miR-34a	↓		<0.01	0.9505 (ND)	ND / ND	ND	Diagnóstico (↓ soro de doentes vs. CS)
				miR-218	↓		<0.01	0.8421 (ND)	ND / ND	ND	Diagnóstico (↓ soro de doentes vs. CS)

Tabela 7 (continuação)

Autor/ Ano (Referência)	País(es) de origem	Grupo(s) Controlo	Tipo de amostra	Biomarcador(es) estudado(s)	Expressão	Método de análise / controlo endógeno	Significância estatística (valor de p)	AUC (IC 95%) / valor de p	Sensibilidade / Especificidade (%) (IC 95%)	Medidas de associação (IC 95%)	Valor clínico do biomarcador
Lv <i>et al.</i> / 2020 (85)	China	Plasma de CS	EVs de plasma de doentes com CCU	miR-125a-5p	↓	qRT-PCR / miR-16-5p	<0.001	0.7129 (0.561–0.865)	59.1% (ND) / 84.2% (ND)	ND	Diagnóstico (↓ no cargo de EVs plasmáticas de doentes vs. CS)
		EVs de plasma de doentes com CCU HPV-negativos	EVs de plasma de doentes com CCU HPV-positivos		↓		0.0418	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ no cargo de EVs plasmáticas de doentes HPV-positivos vs. doentes HPV-negativos)
Ning <i>et al.</i> / 2021(86)	China	CS	Plasma de doentes com LPC (CIN 2–3) e com CCE	miR-26b-5p	↑	qRT-PCR / Ath-miR-159a, miR-1228, miR-16	0.00003793	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ plasma de doentes com LPC e CCE vs. CS)
				miR-146b-5p	↑		0.0002988	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ plasma de doentes com LPC e CCE vs. CS)
				miR-191-5p	↑		0.00003008	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ plasma de doentes com LPC e CCE vs. CS)
				miR-484	↑		0.003040	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ plasma de doentes com LPC e CCE vs. CS)
				miR-574-3p	↑		0.02331	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ plasma de doentes com LPC e CCE vs. CS)
				miR-625-3p	↑		0.004893	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ plasma de doentes com LPC e CCE vs. CS)
				Combinação miR-26b-5p, miR-146b-5p, miR-191-5p, miR-484, miR-574-3p, miR-625-3p	↑		ND	0.6896 (ND)	80.77% (ND) / 57.14% (ND)	ND	Diagnóstico (↑ plasma de doentes com LPC e CCE vs. CS)

Tabela 7 (continuação)

Autor/ Ano (Referência)	País(es) de origem	Grupo(s) Controlo	Tipo de amostra	Biomarcador(es) estudado(s)	Expressão	Método de análise / controlo endógeno	Significância estatística (valor de p)	AUC (IC 95%) / valor de p	Sensibilidade / Especificidade (%) (IC 95%)	Medidas de associação (IC 95%)	Valor clínico do biomarcador
Zhang <i>et al.</i> / 2021 (87)	China	Soro de CS	Soro de pacientes com CCU HPV-positivos	miR-18a	↑	qRT-PCR / GAPDH	<0.05	0.856 (0.800-0.912) (p <0.001)	95.2% (ND) / 75.7% (ND)	ND	Diagnóstico (↑ soro de doentes com CCU HPV-positivos vs. CS)
		Soro de pacientes HPV-positivos sem CCU	Soro de pacientes com CCU HPV-positivos		↑		<0.05	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ soro de doentes com CCU HPV-positivos vs. pacientes HPV-positivos sem CCU)
Ivanov <i>et al.</i> / 2018 (88)	Rússia	CE cervicais NILM	CE cervicais tumorais HPV-positivas	miR-21/miR-375	ND	qRT-PCR / U6 snRNA	ND	0.978 (ND) (p =1.42 x 10 ⁻⁸)	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (Par de miRs capazes de diferenciar lesões tumorais de controlos. Valor de expressão não reportado)
				miR-145/miR-196b	ND		ND	0.954 (ND) (p =7.08 x 10 ⁻⁸)	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (Par de miRs capazes de diferenciar lesões tumorais de controlos. Valor de expressão não reportado)
				miR-20a/miR-375	ND		ND	0.951 (ND) (p =1.14 x 10 ⁻⁷)	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (Par de miRs capazes de diferenciar lesões tumorais de controlos. Valor de expressão não reportado)
Strooper <i>et al.</i> / 2018 (102)	Países Baixos	CE cervicais de pacientes HPV-positivos sem CCU	CE cervicais de pacientes HPV-positivos com CCU	Metilação de FAM19A4/miR124-2	↑	PCR / β-actina	ND	ND	ND / ND	ND	Diagnóstico (presença da metilação em amostras de doentes HPV-positivas aumenta o risco de CCU)
Zamani <i>et al.</i> / 2019 (68)	Irão	CS	Amostras de citologia de base líquida CIN+CCU	miR-21	↑	qRT-PCR / 5S-rRNA	<0.0001	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ em lesões CIN e CCU vs. CS)
				miR-29a	↓		<0.0001	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ em lesões CIN e CCU vs. CS)
Zamani <i>et al.</i> / 2020 (69)	Irão	CS	Amostras de citologia de base líquida CIN+CCU	miR-21	↑	qRT-PCR / 5S-rRNA	<0.005	0.856 (0.774-0.938)	84.0% (ND) / 84.4% (ND)	ND	Diagnóstico (↑ em lesões CIN e CCU vs. CS)
				miR-29a	↓		<0.005	0.858 (0.779-0.937)	78.0% (ND) / 77.0% (ND)	ND	Diagnóstico (↓ em lesões CIN e CCU vs. CS)

Tabela 7 (continuação)

Autor/ Ano (Referência)	País(es) de origem	Grupo(s) Controlo	Tipo de amostra	Biomarcador(es) estudado(s)	Expressão	Método de análise / controlo endógeno	Significância estatística (valor de p)	AUC (IC 95%) / valor de p	Sensibilidade / Especificidade (%) (IC 95%)	Medidas de associação (IC 95%)	Valor clínico do biomarcador
Xu et al. / 2020 (63)	China	Tecido cervical normal	Amostras de tecido de AD	Combinação miR-192-5p, lncRNA HNF1A-AS1, mRNA VIL1	↑	qRT-PCR / GAPDH, U6 snRNA	ND	0.911 (0.872-0.950) ($p=1.37 \times 10^{-19}$)	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ em amostras de tecido de AD vs. tecido cervical normal)
				miR-192-5p	↑		<0.05	0.862 (0.811-0.90) ($p=1.66 \times 10^{-15}$)	ND / ND	ND	Diagnóstico (↑ em amostras de tecido de AD vs. tecido cervical normal)
				lncRNA HNF1A-AS1	↑		<0.05	0.774 (0.711-0.837) ($p=1.58 \times 10^{-9}$)	ND / ND	ND	Diagnóstico (↑ em amostras de tecido de AD vs. tecido cervical normal)
Du et al. / 2021 (98)	China	Amostras normais HPV-negativas, com inflamação leve	Amostras de citologia de base líquida de CCU HPV-positivas	Metilação do lncRNA SOX21-AS1	↓	qRT-PCR / GAPDH	<0.01	0.846 (0.699-0.994) ($p < 0.001$)	100% (ND) / 69.2% (ND)	ND	Diagnóstico (↓ em amostras CCU vs. controlos)
				lncRNA SOX21-AS1	↑		<0.001	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ em amostras CCU vs. controlos)
Zhang et al. / 2023 (95)	China	Amostras de tecido HPV-positivo com cervicite crónica	Amostras de tecido tumoral HPV-positivo	circ_0000276	↑	qRT-PCR / ND	0.002	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ em amostras tumorais vs. cervicite crónica)
Yang et al. / 2015 (89)	China	Tecido adjacente não tumoral	Tecido tumoral de pacientes com CCU	miR-1246	↓	qRT-PCR / U6 snRNA	0.0225	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ em tecido tumoral vs. tecido normal adjacente)
		Tecido de controlos saudáveis			↓		0.0012	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ em tecido tumoral vs. tecido normal)
		Tecido tumoral HPV-negativo	Tecido tumoral HPV-positivo		↓		0.047	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ em tecido tumoral HPV-positivo vs. tecido tumoral HPV-negativo)
Li et al. / 2019 (90)	China	Tecido tumoral HPV-negativo	Tecido tumoral HPV-positivo	miR-93-5p	↑	qRT-PCR / U6 snRNA, GAPDH	<0.001	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ em amostras de tecido tumoral HPV-positivo vs. tecido tumoral HPV-negativo)

Legenda: AUC – Área sob a curva; IC – Intervalo de confiança; CS – Controlos saudáveis; LPC – Lesões Pré-cancerígenas; CE – Células esfoliadas; qRT-PCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real; snRNA – RNA nuclear pequeno; ND – Não definido; CIN – Neoplasia intraepitelial cervical; FFPE – Fixados em formalina e embebidos em parafina; HPV – Papiloma Vírus Humano; CCU – cancro do colo do útero; CCE – carcinoma das células escamosas; AD – adenocarcinoma; EVs – Vesículas Extracelulares; mRNA – RNA mensageiro; NILM – negativo para lesões intraepiteliais ou malignidade

Tabela 8 – Cancro do Colo do Útero – Diagnóstico e Prognóstico

Autor/ Ano (Referência)	País(es) de origem	Grupo(s) Controlo	Tipo de amostra	Biomarcador(es) estudado(s)	Expressão	Método de análise / controlo endógeno	Significância estatística (valor de p)	AUC (IC 95%) / valor de p	Sensibilidade / Especificidade (%) (IC 95%)	Medidas de associação (IC 95%)	Valor de p (Prog.)	Valor clínico do biomarcador
Chen <i>et al.</i> / 2014 (81)	China	Tecido cervical de CS	Tecido tumoral cervical FFPE	miR-143	↓	qRT-PCR / U6 snRNA	0.029	ND	ND / ND	ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ amostras cancerígenas vs. CS); Prognóstico (↓ também associada ao tamanho do tumor e a metástases ganglionares)
Aftab <i>et al.</i> / 2021(70)	Índia	Urina de CS	Urina de doentes com CCU	miR-21-5p	↑	qRT-PCR / U6 snRNA	≤0.001	0.971 (0.957–0.985) (p <0.001)	88.0% (ND) / 98.0% (ND)	ND	ND	Diagnóstico (↑ amostras de urina de doentes com CCU vs. CS)
				miR-155-5p	↑		≤0.001	0.719 (0.816–0.907) (p <0.001)	86.7% (ND) / 91.7% (ND)	ND	ND	Diagnóstico (↑ amostras de urina de doentes com CCU vs. CS)
				miR-199-5p	↑		≤0.001	0.831 (0.869–0.945) (p <0.001)	93.8% (ND) / 88.3% (ND)	ND	ND	Diagnóstico (↑ amostras de urina de doentes com CCU vs. CS)
				miR-145-5p	↓		≤0.01	0.575 (0.743–0.407) (p <0.001)	89.1% (ND) / 91.7% (ND)	ND	ND	Diagnóstico (↓ amostras de urina de doentes com CCU vs. CS)
				miR-218-5p	↓		≤0.01	0.609 (0.729–0.482) (p <0.001)	67.7% (ND) / 60.0% (ND)	Análise multivariada: 0.218 (0.068–0.702)	0.011	Diagnóstico (↓ amostras de urina de doentes com CCU vs. CS); Prognóstico (↑ da expressão em doentes com CCU associada a melhor SG)
				miR-34a-5p	↓		≤0.01	0.888 (0.781–1.00) (p <0.001)	83.3% (ND) / 72.7% (ND)	Análise multivariada: 5.721 (1.786–18.325)	0.003	Diagnóstico (↓ amostras de urina de doentes com CCU vs. CS); Prognóstico (↑ da expressão em doentes com CCU associada a melhor SG)
				Combinação miR-21-5p, miR-155-5p, miR-199-5p	↑		ND	0.942 (0.868–1.00) (p <0.001)	100% (ND) / 78.9% (ND)	ND	ND	Diagnóstico (↑ amostras de urina de doentes com CCU vs. CS)

Tabela 8 (continuação)

Autor/ Ano (Referência)	País(es) de origem	Grupo(s) de Controlo	Tipo de amostra	Biomarcador(es) estudado(s)	Expressão	Método de análise / controlo endógeno	Significância estatística (valor de p)	AUC (IC 95%) / valor de p	Sensibilidade / Especificidade (%) (IC 95%)	Medidas de associação (IC 95%)	Valor de p (Prog.)	Valor clínico do biomarcador
Aftab <i>et al.</i> / 2021 (continuação) (70)	Índia	Urina de CS	Urina de doentes com CCU	Combinação miR-145-5p, miR-218-5p, miR-34a-5p	↓	qRT-PCR / U6 snRNA	ND	0.969 (0.912–1.000) (p < 0.001)	100% (ND) / 92.8% (ND)	ND	ND	Diagnóstico (↓ amostras de urina de doentes com CCU vs. CS)
				miR-21-5p	↑		≤ 0.001	0.993 (0.975–1.000) (p < 0.0001)	98.0% (ND) / 85.0% (ND)	ND	ND	Diagnóstico (↑ amostras de tecido de doentes com CCU vs. tecido adjacente não tumoral)
				miR-155-5p	↑		≤ 0.001	0.976 (0.935–1.000) (p < 0.0001)	95.0% (ND) / 72.9% (ND)	ND	ND	Diagnóstico (↑ amostras de tecido de doentes com CCU vs. tecido adjacente não tumoral)
		Tecido adjacente não tumoral	Biópsia de tumor de doentes com CCU	miR-199-5p	↑		≤ 0.001	0.978 (0.964–1.000) (p < 0.0001)	96.5% (ND) / 92.7% (ND)	ND	ND	Diagnóstico (↑ amostras de tecido de doentes com CCU vs. tecido adjacente não tumoral)
				miR-145-5p	↓		≤ 0.001	0.946 (0.881–1.000) (p < 0.0001)	90.0% (ND) / 75.0% (ND)	ND	ND	Diagnóstico (↓ amostras de tecido de doentes com CCU vs. tecido adjacente não tumoral)
				miR-218-5p	↓		≤ 0.001	0.995 (0.983–1.000) (p < 0.0001)	85.0% (ND) / 92.7% (ND)	ND	ND	Diagnóstico (↓ amostras de tecido de doentes com CCU vs. tecido adjacente não tumoral)
				miR-34a-5p	↓		≤ 0.001	0.826 (0.713–0.940) (p < 0.0001)	73.2% (ND) / 91.0% (ND)	ND	ND	Diagnóstico (↓ amostras de tecido de doentes com CCU vs. tecido adjacente não tumoral)
				Combinação miR-21-5p, miR-155-5p, miR-199-5p	↑		ND	1.000 (1.000–1.000) (p < 0.0001)	100.0% (ND) / 100.0% (ND)	ND	ND	Diagnóstico (↑ amostras de tecido de doentes com CCU vs. tecido adjacente não tumoral)
				Combinação miR-145-5p, miR-218-5p, miR-34a-5p	↓		ND	0.932 (0.839–1.000) (p < 0.0001)	100.0% (ND) / 88.9% (ND)	ND	ND	Diagnóstico (↓ amostras de tecido de doentes com CCU vs. tecido adjacente não tumoral)

Tabela 8 (continuação)

Autor/ Ano (Referência)	País(es) de origem	Grupo(s) de Controlo	Tipo de amostra	Biomarcador (es) estudado(s)	Expressão	Método de análise / controlo endógeno	Significância estatística (valor de p)	AUC (IC 95%) / valor de p	Sensibilidade / Especificidade (%) (IC 95%)	Medidas de associação (IC 95%)	Valor de p (Prog.)	Valor clínico do biomarcador
Aftab <i>et al.</i> / 2021 (continuação) (70)	Índia	Soro de CS	Soro de doentes com CCU	miR-21-5p	↑	qRT-PCR / U6 snRNA	≤ 0.001	ND	ND / ND	ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ soro de doentes com CCU vs. soro de CS)
				miR-155-5p	↑		≤ 0.01	ND	ND / ND	ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ soro de doentes com CCU vs. soro de CS)
				miR-199-5p	↑		≤ 0.001	ND	ND / ND	ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ soro de doentes com CCU vs. soro de CS)
				miR-145-5p	↓		≤ 0.01	ND	ND / ND	ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ soro de doentes com CCU vs. soro de CS)
				miR-218-5p	↓		≤ 0.001	ND	ND / ND	ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ soro de doentes com CCU vs. soro de CS)
				miR-34a-5p	↓		≤ 0.001	ND	ND / ND	ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ soro de doentes com CCU vs. soro de CS)
Park <i>et al.</i> / 2019 (79)	Coreia do Sul	CS; Tecido adjacente não tumoral	Tecido tumoral cervical FFPE	miR-944	↑	qRT-PCR / RNU6B	≤ 0.0001	0.79 (0.71-0.86) (p < 0.001)	ND / ND	Análise Multivariada: HR: 3.5 (1.1-11.2)	Sobrevivência global: log-rank: 0.003 Análise Multivariada: 0.034	Diagnóstico (↑ amostras FFPE tecido cervical vs. CS); Prognóstico (↑ da expressão em doentes com CCU associada a pior SG)

Tabela 8 (continuação)

Autor/ Ano (Referência)	País(es) de origem	Grupo(s) de Controle	Tipo de amostra	Biomarcador(es) estudado(s)	Expressão	Método de análise / controle endógeno	Significância estatística (valor de p)	AUC (IC 95%) / valor de p	Sensibilidade / Especificidade (%) (IC 95%)	Medidas de associação (IC 95%)	Valor de p (Prog.)	Valor clínico do biomarcador
Zhang <i>et al.</i> / 2017 (103)	China	Plasma de CS	Plasma de doentes com CCU	Metilação do lncRNA MEG3	↑	MSP / ND	<0.01	0.867 (ND) (p<0.001)	83.3% (ND) / 79.8% (ND)	HR:2.619 (0.979–7.005)	SLD: 0.0004 (Kaplan–Meier) Análise Multivariada: 0.045	Diagnóstico (↑ plasma de doentes com CCU vs. CS); Prognóstico (↑ da expressão em doentes com CCU associada a pior SLD)
		Tecido adjacente não tumoral	Tecido tumoral cervical		↑		<0.01	ND	ND / ND	ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ tecido tumoral de doentes com CCU vs. tecido adjacente)
		Plasma de doentes com CCU HPV-negativo	Plasma de doentes com CCU HPV-positivo		↑		<0.001	0.730 (ND) (p=0.030)	63.1% (ND) / 84.2% (ND)	OR: 6.406 (2.718–15.099) (p<0.001)	ND	Diagnóstico (↑ plasma de doentes com CCU HPV-positivos vs. CCU HPV-negativos); Prognóstico (↑ da metilação é um fator de risco para CCU associado a infecção por HPV)
Donget <i>et al.</i> / 2022 (99)	China	Tecido cervical de CS	Tecido tumoral cervical	lncRNA DLEU1	↑	qRT-PCR / GAPDH	<0.001	0.951 (ND)	90.6% (ND) / 91.9% (ND)	SG: HR: 2.437 (1.612–3.329)	Análise Multivariada: 0.004 Log-rank: 0.0004	Diagnóstico (↑ tecido tumoral vs. tecido de CS); Prognóstico (↑ da expressão associada a pior SG)
		Tecido tumoral HPV-negativo	Tecido tumoral HPV-positivo		↑		<0.01	0.867 (ND)	87.8% (ND) / 81.6% (ND)	ND	SG: Log-rank: 0.0026	Diagnóstico (↑ tecido tumoral HPV-positivo vs. tecido tumoral HPV-negativo); Prognóstico (↑ da expressão no tecido tumoral HPV-positivo associada a pior SG)

Tabela 8 (continuação)

Autor/ Ano (Referência)	País(es) de origem	Grupo(s) Controlo	Tipo de amostra	Biomarcador(es) estudado(s)	Expressão	Método de análise / controlo endógeno	Significância estatística (valor de p)	AUC (IC 95%) / valor de p	Sensibilidade / Especificidade (%) (IC 95%)	Medidas de associação (IC 95%)	Valor de p (Prog.)	Valor clínico do biomarcador
Cui <i>et al.</i> / 2022 (91)	China	Tecido cervical adjacente não tumoral	Tecido tumoral cervical	miR-3653	↑	qRT-PCR / U6 snRNA	<0.05	0.915 (ND)	80.9% (ND) / 91.1% (ND)	HR: 2.447 (1.293–4.629)	SG: Análise multivariada : 0.006 Kaplan-Meier: <0.001	Diagnóstico (↑ tecido tumoral vs. tecido adjacente); Prognóstico (↑ da expressão no tecido associada a pior SG)
		Tecido tumoral HPV-negativo	Tecido tumoral HPV-positivo		↑		<0.05	0.902 (ND)	67.0% (ND) / 94.9% (ND)	ND	ND	Diagnóstico (↑ tecido tumoral HPV-positivo vs. tecido tumoral HPV-negativo)
Xu <i>et al.</i> / 2022 (100)	China	Tecido cervical adjacente não tumoral	Tecido tumoral cervical	lncRNA HOXA-AS3	↑	qRT-PCR / U6 snRNA, GAPDH	<0.001	ND	ND / ND	HR: 3.224 (1.399–7.431)	Análise multivariada : 0.006 Kaplan-Meier: <0.001	Potencialmente diagnóstico (↑ tecido tumoral vs. tecido cervical adjacente); Prognóstico (↑ da expressão no tecido associada a pior SG)
Yamanaka <i>et al.</i> / 2022 (92)	Japão	Soro de CS	Soro de doentes com CCU	miR-100	↓	qRT-PCR / miR-16	<0.001	0.879 (0.7976–0.9609)	91.2% (ND) / 80.4% (ND)	ND	SLD: 0.0396	Diagnóstico (↓ soro de doentes com CCU vs. soro de CS); Prognóstico (↓ da expressão no soro associada a pior SLD)
		Tecido cervical de CS	Tecido tumoral cervical		↓		<0.01	ND	ND / ND	ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ tecido tumoral vs. tecido de CS)

Tabela 8 (continuação)

Autor/ Ano (Referência)	País(es) de origem	Grupo(s) Controlo	Tipo de amostra	Biomarcador(es) estudado(s)	Expressão	Método de análise / controlo endógeno	Significância estatística (valor de p)	AUC (IC 95%) / valor de p	Sensibilidade / Especificidade (%) (IC 95%)	Medidas de associação (IC 95%)	Valor de p (Prog.)	Valor clínico do biomarcador
Lv <i>et al.</i> / 2019 (101)	China	Tecido cervical adjacente não tumoral	Tecido tumoral cervical	lncRNA PCAT6	↑	qRT-PCR / GAPDH	<0.01	ND	ND / ND	SG: HR: 3.018 (1.287-4.238) SLD: HR: 3.221 (1.345-4556)	SG: log-rank: 0.0024; Análise Multivariada: 0.012 SLD: log-rank: 0.0042; Análise Multivariada: 0.009	Potencialmente diagnóstico (↑ tecido tumoral vs. tecido cervical adjacente); Prognóstico (↑ da expressão no tecido associada a pior SG e SLD)
Luo <i>et al.</i> / 2013 (93)	China	Tecido cervical adjacente não tumoral	Tecido tumoral cervical	miR-497	↓	qRT-PCR / U6 snRNA	<0.01	ND	ND / ND	ND	SG: log-rank: 0.0036	Potencialmente diagnóstico (↓ tecido tumoral vs. tecido cervical adjacente); Prognóstico (↓ da expressão no tecido associada a pior SG)

Legenda: AUC – Área sob a curva; IC – Intervalo de confiança; CS – Controlos saudáveis; LPC – Lesões Pré-cancerígenas; CE – Células esfoliadas; qRT-PCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real; snRNA – RNA nuclear pequeno; ND – Não definido; CIN – Neoplasia intraepitelial cervical; FFPE – Fixados em formalina e embebidos em parafina; HPV – Papiloma Vírus Humano; CCU – cancro do cólo do útero; CCE – carcinoma das células escamosas; AD – adenocarcinoma; EVs – Vesículas Extracelulares; mRNA – RNA mensageiro; NILM – negativo para lesões intraepiteliais ou malignidade; SG – sobrevivência global; SLD – Sobrevivência livre de doença; OR – Odds Ratio; HR – Hazard Ratio

Tabela 9 – Cancro do Colo do Útero – Prognóstico

Autor/ Ano (Referência)	País(es) de origem	Grupo(s) Controlo	Tipo de amostra	Biomarcador(es) estudado(s)	Expressão	Método de análise / controlo endógeno	Significância estatística (valor de p)	AUC (IC 95%) / valor de p	Sensibilidade / Especificidade (%) (IC 95%)	Medidas de associação (IC 95%)	Valor de p (Prog.)	Valor clínico do biomarcador
Cheng <i>et al.</i> / 2020 (64)	ND (TCGA)	Tecido cervical adjacente não tumoral	Tecido tumoral cervical	lncRNA LINC00619	ND	ND	ND	ND	ND / ND	Análise multivariada: HR:41.868	0.000	Potencialmente prognóstico quando em associação com os restantes lncRNAs
				lncRNA FGF13-AS1	ND		ND	ND	ND / ND	Análise multivariada: HR:10.906	0.0015	Potencialmente prognóstico quando em associação com os restantes lncRNAs
				lncRNA EMX205	ND		ND	ND	ND / ND	Análise multivariada: HR:1.194	0.000	Potencialmente prognóstico quando em associação com os restantes lncRNAs
				lncRNA WT1-AS	ND		ND	ND	ND / ND	Análise multivariada: HR:1.220	0.032	Potencialmente prognóstico quando em associação com os restantes lncRNAs
				lncRNA C9orf147	ND		ND	ND	ND / ND	Análise multivariada: HR:0.052	0.055	Potencialmente prognóstico quando em associação com os restantes lncRNAs
				lncRNA LINC00908	ND		ND	ND	ND / ND	Análise multivariada: HR:0.187	0.009	Potencialmente prognóstico quando em associação com os restantes lncRNAs
				Combinação LINC00619, FGF13-AS1, EMX205, WT1-AS, C9orf147, LINC00908	ND		ND	ND	ND / ND	ND	SG: Log-rank: 0.00191	Potencialmente prognóstico (modelo prognóstico baseado na combinação está associado a pior SG no grupo de doentes de alto risco vs. baixo risco)

Legenda: AUC – Área sob a curva; IC – Intervalo de confiança; CS – Controlos saudáveis; LPC – Lesões Pré-cancerígenas; CE – Células esfoliadas; qRT-PCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real; snRNA – RNA nuclear pequeno; ND – Não definido; CIN – Neoplasia intraepitelial cervical; FFPE – Fixados em formalina e embebidos em parafina; HPV – Papiloma Vírus Humano; CCU – cancro do cólo do útero; CCE – carcinoma das células escamosas; AD – adenocarcinoma; EVs – Vesículas Extracelulares; mRNA – RNA mensageiro; NILM – negativo para lesões intraepiteliais ou malignidade; SG – sobrevivência global; SLD – Sobrevivência livre de doença; OR – Odds Ratio; HR – Hazard Ratio; TCGA – Atlas do genoma do cancro

Tabela 10 – Cancros Anogenitais – Diagnóstico

Autor/ Ano (Referência)	País(es) de origem	Grupo(s) Controlo	Tipo de amostra	Biomarcador(es) estudado(s)	Expressão	Método de análise / controlo endógeno	Significância estatística (valor de p)	AUC (IC 95%) / valor de p	Sensibilidade / Especificidade (%) (IC 95%)	Medidas de associação (IC 95%)	Valor clínico do biomarcador
Kolitz <i>et al.</i> / 2022 (64)	Estados Unidos da América	Tecido de CV HPV-negativos	Tecido tumoral da vulva FFPE HPV-positivos	circRNA ARHGAP5, CORO1C, ZKSCAN1	↑	RNAseq / ND	ND	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ tecido tumoral HPV-positivo vs. tecido tumoral HPV-negativo)
Pinho <i>et al.</i> / 2021 (105)	Brasil	Tecido adjacente não tumoral do pênis	Tecido tumoral do pênis FFPE	miR-145	↓	qRT-PCR / RNU6B	0.004	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ tecido tumoral do pênis vs. tecido adjacente não tumoral)

Legenda: AUC – Área sob a curva; IC – Intervalo de confiança; CV – Cancro da vulva; RNA-seq – sequenciamento de RNA; ND – não definido; HPV – vírus do papiloma humano; FFPE – Fixados em formalina e embebidos em parafina; qRT-PCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

Tabela 11 – Cancros Anogenitais – Diagnóstico e Prognóstico

Autor/ Ano (Referência)	País(es) de origem	Grupo(s) Controlo	Tipo de amostra	Biomarcador(es) estudado(s)	Expressão	Método de análise / controlo endógeno	Significância estatística (valor de p)	AUC (IC 95%) / valor de p	Sensibilidade / Especificidade (%) (IC 95%)	Medidas de associação (IC 95%)	Valor de p (Prog.)	Valor clínico do biomarcador
Pinho <i>et al.</i> / 2020 (104)	Brasil	Tecido adjacente não tumoral do pênis	Tecido tumoral do pênis FFPE	miR-223-3p	↑	qRT-PCR / RNU6B	<0.001	0.80 (ND)	ND / ND	ND	ND	Diagnóstico (↑ tecido tumoral do pênis vs. tecido adjacente não tumoral)
				miR-107	↑		<0.001	0.77 (ND) (p<0.001)	ND / ND	ND	SLD: log-rank: 0.042	Diagnóstico (↑ tecido tumoral do pênis vs. tecido adjacente não tumoral); Prognóstico (↑ da expressão no tecido associada a pior SLD)
				miR-21-5p	↑		<0.001	0.80 (ND) (p<0.001)	ND / ND	ND	ND	Diagnóstico (↑ tecido tumoral do pênis vs. tecido adjacente não tumoral)

Legenda: AUC – Área sob a curva; IC – Intervalo de confiança; CV – Cancro da vulva; RNA-seq – sequenciamento de RNA; ND – não definido; HPV – vírus do papiloma humano; FFPE – Fixados em formalina e embebidos em parafina; qRT-PCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real; SLD – Sobrevivência livre de doença

Tabela 12 – Cancro da Cabeça e Pescoço – Diagnóstico

Autor/ Ano (Referência)	País(es) de origem	Grupo(s) Controlo	Tipo de amostra	Biomarcador(es) estudado(s)	Expressão	Método de análise / controlo endógeno	Significância estatística (valor de p)	AUC (IC 95%) / valor de p	Sensibilidade / Especificidade (%) (IC 95%)	Medidas de associação (IC 95%)	Valor clínico do biomarcador
Emmett <i>et al.</i> / 2021(109)	Reino Unido	Tecidos HPV-negativos de cancro OF, CO, HF e laringe	Tecidos FFPE HPV-positivos de cancro OF, CO, HF e laringe	miR-16	↓	qRT-PCR / RNU-48	0.011	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ tecido tumoral HPV-positivo vs. tecido tumoral HPV-negativo)
				miR-29a	↑		<0.0001	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ tecido tumoral HPV-positivo vs. tecido tumoral HPV-negativo)
				miR-29c	↑		0.0001	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ tecido tumoral HPV-positivo vs. tecido tumoral HPV-negativo)
				miR-150	↓		0.001	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ tecido tumoral HPV-positivo vs. tecido tumoral HPV-negativo)
				miR-205	↑		0.011	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ tecido tumoral HPV-positivo vs. tecido tumoral HPV-negativo)
				miR-363	↓		0.004	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ tecido tumoral HPV-positivo vs. tecido tumoral HPV-negativo)
		Tecidos HPV-negativos de cancro OF	Tecidos FFPE HPV-positivos de cancro OF	miR-16	↓	0.009	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ tecido de tumores OF HPV-positivo vs. tumores OF HPV-negativos)	
				miR-20b	↓	0.009	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ tecido de tumores OF HPV-positivo vs. tumores OF HPV-negativos)	
				miR-142	↓	0.033	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ tecido de tumores OF HPV-positivo vs. tumores OF HPV-negativos)	
				miR-150	↓	0.033	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ tecido de tumores OF HPV-positivo vs. tumores OF HPV-negativos)	
				miR-363	↑	<0.001	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ tecido de tumores OF HPV-positivo vs. tumores OF HPV-negativos)	

Tabela 12 (continuação)

Autor/ Ano (Referência)	País(es) de origem	Grupo(s) Controlo	Tipo de amostra	Biomarcador(es) estudado(s)	Expressão	Método de análise / controlo endógeno	Significância estatística (valor de p)	AUC (IC 95%) / valor de p	Sensibilidade / Especificidade (%) (IC 95%)	Medidas de associação (IC 95%)	Valor clínico do biomarcador
Weeramange <i>et al.</i> / 2023 (114)	Austrália	Saliva de CS HPV-positivos	Saliva de tumores OF HPV-positivos	Painel miR-194-5p, miR-449a, miR-3614-5p, miR-07-5p, miR-3529-3p, miR-99A-3p, miR-501-3p, miR-1290, miR-548K	ND	qRT-PCR / SNORD-96A	ND	primer PCR: 0.948 (0.896-1) miRCURY™ LNA miRNA PCR: 0.98 (0.943-1)	miScript™ primer PCR: 91.3 % (79.7-96.6) / 86.7% (62.1-96.3) miRCURY™ LNA miRNA PCR: 93.5% (79.3-98.2) / 93.8% (71.7-98.9)	ND	Potencialmente diagnóstico (a combinação, na saliva, tem capacidade de diferenciar tumores OF HPV-positivos vs. saliva de CS HPV-positivos)
Šimic <i>et al.</i> / 2023 (110)	Croácia	Tecidos HPV-negativos de cancro da CO	Tecidos HPV-positivos de cancro da CO	miR-9	↑	qRT-PCR / miR-16-5p, miR-181-5p, miR-191-5p	ND	ND / ND	ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ tecido de tumores CO HPV-positivo vs. tumores CO HPV-negativos)
				miR-21	↓		ND	ND / ND	ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ tecido de tumores CO HPV-positivo vs. tumores CO HPV-negativos)
				miR-100	↓		ND	ND / ND	ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ tecido de tumores CO HPV-positivo vs. tumores CO HPV-negativos)
		Tecidos HPV-negativos de cancro da OF	Tecidos HPV-positivos de cancro da OF	miR-9	↑		ND	ND / ND	ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ tecido de tumores OF HPV-positivo vs. tumores OF HPV-negativos)
				miR-21	↓		ND	ND / ND	ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ tecido de tumores OF HPV-positivo vs. tumores OF HPV-negativos)
				miR-29a	↑		ND	ND / ND	ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ tecido de tumores OF HPV-positivo vs. tumores OF HPV-negativos)
				miR-100	↓		ND	ND / ND	ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ tecido de tumores OF HPV-positivo vs. tumores OF HPV-negativos)

Tabela 12 (continuação)

Autor/ Ano (Referência)	País(es) de origem	Grupo(s) Controlo	Tipo de amostra	Biomarcador(es) estudado(s)	Expressão	Método de análise / controlo endógeno	Significância estatística (valor de p)	AUC (IC 95%) / valor de p	Sensibilidade / Especificidade (%) (IC 95%)	Medidas de associação (IC 95%)	Valor clínico do biomarcador
Wan et al. / 2017 (115)	Austrália	Saliva de doentes com CCP HPV-negativos	Saliva de doentes com CCP HPV-positivos	miR-210	↓	qRT-PCR / SNORD-96A	<0.01	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ saliva de doentes com CCP HPV-positivos vs. saliva de CCP HPV-negativos)
				Combinação miR-191, miR-196b, miR-210, miR-222	ND		ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (Na saliva, combinação tem capacidade de diferenciar doentes com CCP HPV-positivos vs. CCP HPV-negativos)	
		Saliva CS	Saliva de doentes com CCP HPV-positivos	miR-9	↑		<0.001	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ saliva de doentes com CCP HPV-positivos vs. saliva de CS)
				miR-134	↓		<0.05	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ saliva de doentes com CCP HPV-positivos vs. saliva de CS)
				miR-196a	↑		<0.001	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ saliva de doentes com CCP HPV-positivos vs. saliva de CS)
				miR-196b	↑		<0.001	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ saliva de doentes com CCP HPV-positivos vs. saliva de CS)
				miR-455	↑		<0.0001	ND	ND / ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ saliva de doentes com CCP HPV-positivos vs. saliva de CS)
				Combinação miR-9, miR-134, miR-210, miR-455; miR-196b	ND		ND	0.80 (ND)	65.0% (ND) / 95.0% (ND)	ND	Diagnóstico (Na saliva, combinação tem capacidade de diferenciar doentes com CCP HPV-positivos vs. CS)

Legenda: AUC – Área sob a curva; IC – Intervalo de confiança; HPV – vírus do papiloma humano; OF – orofaríngeo; HF – Hipofaríngeo; CO – cavidade oral; FFPE – Fixados em formalina e embebidos em parafina; CS – controlos saudáveis; CCP – cancro de cabeça e pescoço; ND – Não definido; qRT-PCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real

Tabela 13 – Cancro da Cabeça e Pescoço – Diagnóstico e Prognóstico

Autor/ Ano (Referência)	País(es) de origem	Grupo(s) Controlo	Tipo de amostra	Biomarcador(es) estudado(s)	Expressão	Método de análise / controlo endógeno	Significância estatística (valor de p)	AUC (IC 95%) / valor de p	Sensibilidade / Especificidade (%) (IC 95%)	Medidas de associação (IC 95%)	Valor de p (Prog.)	Valor clínico do biomarcador
Bersani <i>et al.</i> / 2018 (112)	Suécia	Tecido não tumoral das amígdalas	Tecido tumoral FFPE das amígdalas/base da língua HPV-positivos	miR-155	↓	qRT-PCR / miR-191-5p, miR-361-5p, miR-451a	0.00054	ND	ND / ND	ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ tecido de tumores HPV-positivos vs. tecido normal)
				miR-193b	↑		0.00000062	ND	ND / ND	ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ tecido de tumores HPV-positivos vs. tecido normal)
		Tecido tumoral das amígdalas/base da língua HPV-negativos	Tecido tumoral das amígdalas/base da língua HPV-positivos	miR-155	↑		0.00006	0.66 (ND)	ND / ND	ND	SLD: Wilcoxon-Mann-Whitney: 0.021 Log-rank: 0.01	Diagnóstico (↑ tecido de tumores HPV-positivos vs. HPV-negativos); Prognóstico (↑ da expressão no tecido HPV-positivo associada a pior SLD)
				miR-185	↓		0.016	0.63 (ND)	ND / ND	ND	Log-rank: 0.04	Diagnóstico (↓ tecido de tumores HPV-positivos vs. HPV-negativos) Prognóstico (↓ da expressão no tecido HPV-positivo associada a pior SLD)
		Combinção miR-155, miR-185	↑ (miR-155) ↓ (miR-185)	ND	0.71 (ND)	ND / ND	ND	ND	Potencialmente diagnóstico (A combinação permite diferenciar o <i>status</i> de HPV)			

Tabela 13 (continuação)

Autor/ Ano (Referência)	País(es) de origem	Grupo(s) Controle	Tipo de amostra	Biomarcador(es) estudado(s)	Expressão	Método de análise / controle endógeno	Significância estatística (valor de p)	AUC (IC 95%) / valor de p	Sensibilidade / Especificidade (%) (IC 95%)	Medidas de associação (IC 95%)	Valor de p (Prog.)	Valor clínico do biomarcador
Mehterov et al./ 2022 (113)	Estados Unidos da América (TCGA)	Tecido adjacente não tumoral da mucosa oral	Tecido tumoral da mucosa oral	miR-21-5p	↑	ND	6.5x10 ⁻²²	ND	ND / ND	ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ tecido tumoral da mucosa oral vs. tecido adjacente)
				miR-93-5p	↑		3.45x10 ⁻¹⁴	ND	ND / ND	ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ tecido tumoral da mucosa oral vs. tecido adjacente)
				miR-146b-5p	↑		5.54 x10 ⁻⁷	ND	ND / ND	ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ tecido tumoral da mucosa oral vs. tecido adjacente)
				miR-155-5p	↑		0.0016	ND	ND / ND	ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ tecido tumoral da mucosa oral vs. tecido adjacente)
				miR-182-5p	↑		3.6 x10 ⁻⁹	ND	ND / ND	ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ tecido tumoral da mucosa oral vs. tecido adjacente)
				miR-133b	↓		2.33 x10 ⁻⁶	ND	ND / ND	ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ tecido tumoral da mucosa oral vs. tecido adjacente)
		Combinção miR-21-5p, miR-93-5p, miR-146b-5p, miR-155-5p, miR-182-5p, miR-133b	ND	ND	0.91 (ND)	98.0% (ND) / 60.0% (ND)	HR: 1.3 (1.1-1.6)	SLD: análise multivariada: 0.015 Kaplan-Meier: 0.01	Diagnóstico (combinação tem a capacidade de diferenciar lesões tumorais de tecido não tumoral); Prognóstico (aumento da expressão associado a pior SLD)			
		Tecido tumoral da mucosa oral HPV-negativo	Tecido tumoral da mucosa oral HPV-positivo	miR-93-5p	↑	0.00025	ND	ND / ND	ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ tecido de tumores HPV-positivos vs. HPV-negativos)	
				miR-155-5p	↑	0.00044	ND	ND / ND	ND	ND	Diagnóstico (↑ tecido de tumores HPV-positivos vs. HPV-negativos)	
				miR-133b	↓	0.00172	ND	ND / ND	ND	ND	Diagnóstico (↓ tecido de tumores HPV-positivos vs. HPV-negativos)	

Tabela 13 (continuação)

Autor/ Ano (Referência)	País(es) de origem	Grupo(s) Controlo	Tipo de amostragem	Biomarcador(es) estudado(s)	Expressão	Método de análise / controlo endógeno	Significância estatística (valor de p)	AUC (IC 95%) / valor de p	Sensibilidade / Especificidade (%) (IC 95%)	Medidas de associação (IC 95%)	Valor de p (Prog.)	Valor clínico do biomarcador
Kopczynska <i>et al.</i> / 2020 (116)	ND (TCGA + UALCAN)	Tecido tumoral de CCP HPV-negativo	Tecido tumoral de CCP HPV-positivo	lncRNA CDKN2B-AS1	↑	ND	<0.0001	0.9202 (0.8719–0.9685) <i>p</i> <0.001	ND / ND	ND	ND	Diagnóstico (↑ tecido de tumores HPV-positivos vs. HPV-negativos)
				lncRNA TTTY14	↑		<0.0001	0.7767 (0.6808–0.8727) <i>p</i> <0.001	ND / ND	ND	ND	Diagnóstico (↑ tecido de tumores HPV-positivos vs. HPV-negativos)
				lncRNA TTTY15	↑		0.0042	0.6649 (0.5579–0.7718) <i>p</i> =0.0042	ND / ND	ND	ND	Diagnóstico (↑ tecido de tumores HPV-positivos vs. HPV-negativos)
				lncRNA PRINS	↑		0.029	0.6255 (0.5163–0.7348) <i>p</i> =0.0296	ND / ND	ND	SG: log-rank (Mantel-Cox):0.0073 SLD: log-rank (Mantel-Cox):0.0343	Diagnóstico (↑ tecido de tumores HPV-positivos vs. HPV-negativos); Prognóstico (↑ associado a melhor SG e SLD)
				lncRNA MEG3	↓		0.0004	0.703 (0.5955–0.8104) <i>p</i> =0.0004	ND / ND	ND	ND	Diagnóstico (↓ tecido de tumores HPV-positivos vs. HPV-negativos)
				lncRNA H19	↓		0.0084	0.6521 (0.5476–0.7565) <i>p</i> =0.0083	ND / ND	ND	ND	Diagnóstico (↓ tecido de tumores HPV-positivos vs. HPV-negativos)

Tabela 13 (continuação)

Autor/ Ano (Referência)	País(es) de origem	Grupo(s) Controlo	Tipo de amostra	Biomarcador(es) estudado(s)	Expressão	Método de análise / controlo endógeno	Significância estatística (valor de <i>p</i>)	AUC (IC 95%) / valor de <i>p</i>	Sensibilidade / Especificidade (%) (IC 95%)	Medidas de associação (IC 95%)	Valor de <i>p</i> (Prog.)	Valor clínico do biomarcador
Kopczynska <i>et al.</i> / 2020 (continuação) (116)	ND (TCGA + UALCAN)	Tecido adjacente não tumoral	Tecido tumoral de CCP	lncRNA CDKN2B-AS1	↑	ND	1.11x10 ⁻¹⁶	ND	ND / ND	ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ tecido tumoral de CCP vs. tecido adjacente)
				lncRNA TTTY14	↓		5.59x10 ⁻⁷	ND	ND / ND	ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ tecido tumoral de CCP vs. tecido adjacente)
				lncRNA H19	↓		3.90x10 ⁻²	ND	ND / ND	ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↓ tecido tumoral de CCP vs. tecido adjacente)
				lncRNA MALAT1	↑		1.64x10 ⁻¹²	ND	ND / ND	ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ tecido tumoral de CCP vs. tecido adjacente);
				lncRNA CYTOR	↑		1.63x10 ⁻¹²	ND	ND / ND	ND	ND	Potencialmente diagnóstico (↑ tecido tumoral de CCP vs. tecido adjacente)

Legenda: AUC – Área sob a curva; IC – Intervalo de confiança; HPV – vírus do papiloma humano; OF – orofaríngeo; HF – Hipofaríngeo; CO – cavidade oral; FFPE – Fixados em formalina e embebidos em parafina; CS – controlos saudáveis; CCP – cancro de cabeça e pescoço; SLD – Sobrevivência livre de doença; SG – Sobrevivência global

Tabela 14 – Cancro da Cabeça e Pescoço – Prognóstico

Autor/ Ano (Referência)	País(es) de origem	Grupo(s) Controlo	Tipo de amostra	Biomarcador(es) estudado(s)	Expressão	Método de análise / controlo endógeno	Significância estatística (valor de p)	AUC (IC 95%) / valor de p	Sensibilidade / Especificidade (%) (IC 95%)	Medidas de associação (IC 95%)	Valor de p (Prog.)	Valor clínico do biomarcador
Guglas <i>et al.</i> / 2023 (108)	Alemanha (GEO: GSE65858)	Tecidos HPV-positivos de CCP com estadiamento I ou II	Tecidos HPV-positivos de CCP com estadiamento III ou IV	sncRNA YRNA3	↑	ND	0.0449	ND	ND / ND	ND	ND	Potencialmente prognóstico (↑ em tecidos CCP HPV-positivos com estadiamento III ou IV vs. estadiamento I ou II)
		Tecidos HPV-positivos de CCP com estadiamento I+II	Tecidos HPV-positivos de CCP com estadiamento III+IV		↑		0.0330	ND	ND / ND	ND	ND	Potencialmente prognóstico (↑ em tecidos CCP HPV-positivos com estadiamento III+IV vs. estadiamento I+II)
Gao <i>et al.</i> / 2013 (111)	Estados Unidos da América	Tecidos HPV-positivos de baixo risco de cancro da OF	Tecidos HPV-positivos de alto risco de cancro da OF	Combinação miR-142-3p, miR-31, miR-146a, miR-26b, miR-24, miR-193b	ND	qRT-PCR / ND	ND	ND	ND / ND	ND	Kaplan-Meier: 0.0063	Potencialmente prognóstico (Modelo de prognóstico baseado na combinação dos miRs associado a pior SG no grupo de alto risco)
Kolenda <i>et al.</i> / 2018 (117)	ND (TCGA + UALCAN)	Tecido de CS	Tecido de doentes com CCP	lncRNA EGOT	ND	ND	ND	ND	ND / ND	SLD: HR: 0.7128 (0.5117-0.9931) SG: HR: 0.7008 (0.5352-0.9175)	SLD: 0.0452 SG: 0.0096	Prognóstico (↓ tecidos doentes com CCP associado a pior SLD e SG)

Legenda: AUC – Área sob a curva; IC – Intervalo de confiança; HPV – vírus do papiloma humano; OF – orofaríngeo; HF – Hipofaríngeo; CO – cavidade oral; FFPE – Fixados em formalina e embebidos em parafina; CS – controlos saudáveis; CCP – cancro de cabeça e pescoço; SLD – Sobrevivência livre de doença; SG – Sobrevivência global



ANEXO 6 – Poster apresentado no 6º Encontro Nacional de Jovens Investigadores em Oncologia

Figura 7 – Poster Científico 6º ENJIO

MiRs como biomarcadores em câncros da cabeça e pescoço HPV-positivos: uma revisão sistemática

Liliana F. Alves¹, M. Manuela Amorim¹, Joana M.O. Santos^{1*}, Catarina A. Rodrigues^{2,3*}

¹Escola Superior de Saúde (E2S) – Instituto Politécnico do Porto, Portugal
²Grupo de Patologia e Terapêutica Experimental, Centro de Investigação do IPO-Porto, Portugal
³IS – Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, Universidade do Porto, Porto, Portugal
*Últimos Autores Conjuntos

E-POSTER 52

Introdução

O **Vírus do Papiloma Humano (HPV)** é o agente infeccioso responsável por mais infeções sexualmente transmissíveis, e está associado ao desenvolvimento de **câncer da cabeça e pescoço (CCP)**, com predominância nas regiões da **orofaringe e da cavidade oral**. Um dos mecanismos de carcinogénese do HPV é a **desregulação de microRNAs (miRs)** através das oncoproteínas virais. Assim, estudos têm demonstrado que os miRs podem ser uma **ferramenta clínica útil**, tendo potencial para serem utilizados como **biomarcadores para o diagnóstico, prognóstico e preditivos de resposta terapêutica dos CCP**. O **objetivo deste trabalho** é realizar uma **revisão sistemática** sobre o potencial dos **miRs como biomarcadores de CCP HPV-positivos**.

Resultados (2)

Tabela 1: Revisão dos estudos incluídos, avaliando o potencial dos miRs como biomarcadores de CCP HPV-positivos

Autor	Tipo de Amostra	Local anatómico	microRNA(s) estudado(s)	Valor Clínico
Emmett et al. / 2021	Tecido FFPE	OF, CO, HF e laringe	miR-16	Potencialmente diagnóstico
			miR-29a	Potencialmente diagnóstico
			miR-29c	Potencialmente diagnóstico
			miR-150	Potencialmente diagnóstico
			miR-205	Potencialmente diagnóstico
			miR-363	Potencialmente diagnóstico
			miR-20b	Potencialmente diagnóstico
miR-142	Potencialmente diagnóstico			
Weeramange et al. / 2023	Saliva	OF	Painel miR-194-5p, miR-449a, miR-3614-5p, miR-07-5p, miR-3529-3p, miR-99A-3p, miR-S01-3p, miR-1290, miR-S48K	Potencialmente diagnóstico
Šimic et al. / 2023	Tecido Fresco	CO e OF	miR-9	Potencialmente diagnóstico
			miR-21	Potencialmente diagnóstico
			miR-100	Potencialmente diagnóstico
			miR-29a	Potencialmente diagnóstico
			miR-210	Potencialmente diagnóstico
Wan et al. / 2017	Saliva	ND	Combinação miR-191, miR-196b, miR-210, miR-222	Potencialmente diagnóstico
			miR-9	Potencialmente diagnóstico
			miR-134	Potencialmente diagnóstico
			miR-196a	Potencialmente diagnóstico
			miR-196b	Potencialmente diagnóstico
			miR-455	Potencialmente diagnóstico
			Combinação miR-9, miR-134, miR-210, miR-455, miR-196b	Diagnóstico
			miR-153	Potencialmente diagnóstico
Bersani et al. / 2018	Tecido FFPE	OF	miR-193b	Potencialmente diagnóstico
	Tecido Fresco		miR-155	Diagnóstico; Prognóstico
			miR-185	Diagnóstico; Prognóstico
			Combinação miR-155, miR-185	Potencialmente diagnóstico
Mehterov et al. / 2022	Tecido Fresco	CO	miR-21	Potencialmente diagnóstico
			miR-93	Potencialmente diagnóstico
			miR-146b	Potencialmente diagnóstico
			miR-155	Potencialmente diagnóstico
			miR-182	Potencialmente diagnóstico
			miR-133b	Potencialmente diagnóstico
			Combinação miR-21, miR-93, miR-146b, miR-155, miR-182, miR-133b	Diagnóstico; Prognóstico
			miR-93	Potencialmente diagnóstico
			miR-155	Diagnóstico
			miR-133b	Diagnóstico
Gao et al. / 2013	Tecido Fresco	OF	Combinação miR-142-3p, miR-31, miR-146a, miR-26b, miR-24, miR-193b	Potencialmente prognóstico

Legenda: FFPE – amostra fixada em formalina e embaldada em parafina; OF – orofaringe; CO – cavidade oral; HF – hipofaringe; ND – não definido

Materiais e Métodos

Foram utilizadas as bases de dados PubMed, Web of Science, Scopus e Cochrane e as palavras-chave **“Non-Coding RNA”**; **“Human Papillomavirus”**; **“Cancer”**; **“Tumor Biomarkers”** e **“Human”** definindo diferentes variações e conjugações destas palavras para a pesquisa de artigos. Foram considerados artigos publicados desde 2013, redigidos em inglês ou português, cujo objeto de estudo fosse o ser humano e relacionavam **miRs como biomarcadores em CCP HPV-positivos**. Este trabalho inseriu-se numa revisão sistemática original em curso (PROSPERO CRD42023397761) considerando todos os câncros etiológicamente relacionados com a **infeção por HPV** (colo do útero, CCP, anogenitais).

Resultados (1)

Para o presente trabalho, obteve-se 7 artigos, relacionando miRs e CCP. Todos os artigos obtidos focaram na **desregulação dos miRs em amostras de tecido (5) ou de saliva (2)** de pacientes com CCP HPV-positivos, comparativamente com indivíduos saudáveis ou câncros HPV negativos. O **local anatómico mais estudado foi a orofaringe (5/7)**. Foram estudados **38 miRs**, quer em combinação (painel), quer isoladamente. O **miR mais estudado foi o miR-155**. A maioria dos artigos (5/7) estudou **painéis de miRs como biomarcadores**. A expressão de alguns miRs é variável mediante a localização anatómica ou a comparação com a coorte controlo. O **valor clínico mais estudado foi como biomarcadores de diagnóstico (6/7)**, seguido de prognóstico (3/7), não tendo havido nenhum artigo a explorar o valor preditivo de resposta terapêutica. Os resultados estão sintetizados sob a forma de tabela (Resultados 2, tabela 1).

Discussão/Conclusão

É possível concluir que os miRs, particularmente de tecido tumoral ou saliva, **constituem biomarcadores promissores** tanto para diagnóstico, como prognóstico do CCP HPV positivos. Contudo, é fundamental **padronizar os protocolos de colheita e métodos de análise a fim de haver maior homogeneidade entre os estudos e assim obter conclusões mais robustas**. De igual modo, os estudos reportados neste trabalho carecem de **validação em coortes maiores e multicêntricas**. Adicionalmente, é necessário a condução de investigações adicionais, particularmente em **amostras menos invasivas (biópsias líquidas)**.

Referências: 1. Emmett SE, Stark MS, Pandey N, Pariza B, Whitman DC. MicroRNA expression is associated with human papillomavirus status and prognosis in mucosal head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*. 2021;118:105130. 1-8. 2. Weeramange CE, Tong KO, Barreto RA, Hastel G, Liu Z, Leelwa R, et al. Salivary micro RNAs as biomarkers for oropharyngeal cancer. *Cancer Med*. 2022;12:15128-37. 3. Simic I, Bozhinov K, Gusevov NA, Kordic M, Plesic E, Manojkovic L, et al. Head and Neck Cancer Patients' Survival According to HPV Status, miRNA Profiling, and Tumor Features-A Cohort Study. *Int J Mol Sci*. 2023;24(6): 4. Wan Y, Vignani D, Salazar C, Kenny L, Perry C, Cakoyiannis D, et al. Salivary miRNA panel to detect HPV-positive and HPV-negative head and neck cancer patients. *Oncotarget*. 2017;8(9):9990-10000. 5. Bersani C, Minis M, Tertipis N, Haeggblom L, Näsman A, Romantini M, et al. MicroRNA-155, -185 and -193b as biomarkers in human papillomavirus positive and negative tonsillar and base of tongue squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2018;82:8-16. 6. Mehterov N, Sacconi A, Pulto C, Vladimirov B, Haralalov G, Pazardjikliev D, et al. A novel panel of clinically relevant miRNAs signature accurately differentiates oral cancer from normal mucosa. *Front Oncol*. 2022;12:1-16. 7. Gao G, Gay HA, Chernock RD, Zhang TR, Luo J, Thorstad WL, et al. A microRNA expression signature for the prognosis of oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2013;119(1):72-80.

Figura 8 – Abstract do poster do 6º ENJIO



LIVRO DE ABSTRACTS | ENCONTRO NACIONAL DE JOVENS INVESTIGADORES EM ONCOLOGIA 2024

PS2

MiRS COMO BIOMARCADORES EM CANCROS DA CABEÇA E PESCOÇO HPV POSITIVOS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

Liliana F. Alves¹, Manuela Amorim⁴, Joana M.O. Santos^{1*}, Catarina A. Rodrigues^{2,3*}

1- Escola Superior de Saúde (E2S) – Instituto Politécnico do Porto, Portugal

2- Grupo de Patologia e Terapêutica Experimental, Centro de Investigação do IPO-Porto, Portugal

3- i3S – Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, Universidade do Porto, Porto, Portugal

*Últimos Autores Conjuntas

O vírus do Papiloma Humano (HPV) é o agente infeccioso responsável por mais infeções sexualmente transmissíveis, e está associado ao cancro da cabeça e pescoço (CCP), com predominância na orofaringe e cavidade oral. Um dos mecanismos de carcinogénese do HPV é a desregulação de miRs através das oncoproteínas virais. Assim, estudos têm demonstrado que os miRs podem ser uma ferramenta clínica útil, tendo potencial para ser utilizados como biomarcadores para o diagnóstico, prognóstico e preditivos de resposta terapêutica dos CCP.

Realizar uma revisão sistemática sobre o potencial dos miRs como biomarcadores de CCP HPV positivos.

Foram utilizadas as bases de dados PubMed, Web of Science, Scopus e Cochrane e as palavras-chave: "Non-Coding RNA"; "Human Papillomavirus"; "Cancers"; "Tumor Biomarkers" e "Human" definindo diferentes variações e conjugações destas palavras para a pesquisa de artigos. Foram consideradas artigos redigidos em inglês ou português, cujo objeto de estudo fosse o ser humano e relacionavam miRs como biomarcadores em CCP HPV positivos.

Este trabalho inseriu-se numa revisão sistemática considerando todos os cancros etiologicamente relacionados com a infeção por HPV. Nesta revisão, foram encontrados 1082 artigos, e após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, mantiveram-se 90. O número de artigos obtidos no final do processo de avaliação da qualidade da evidência foi de 55. Para o presente trabalho, obteve-se 7 artigos, relacionando miRs e CCP. Todos os artigos eram direccionados na desregulação dos miRs em amostras de tecido (6) ou de saliva (1) de pacientes com CCP HPV positivos comparativamente com indivíduos saudáveis ou cancros HPV negativos. O local anatómico mais estudado foi a orofaringe (6/7). Foram estudados 38 miRs, quer em combinação (painel), quer isoladamente. A maioria dos artigos (5/7) estudou painéis de miRs como biomarcadores. A expressão de alguns miRs era variável mediante a localização anatómica ou a comparação com a coorte controlo. O valor clínico mais estudado foi como biomarcadores de diagnóstico (6/7), seguido de prognóstico (3/7), não tendo havido nenhum artigo a explorar o valor preditivo de resposta terapêutica. Os resultados estão organizados sob a forma de tabela.

125

LIVRO DE ABSTRACTS | ENCONTRO NACIONAL DE JOVENS INVESTIGADORES EM ONCOLOGIA 2024

É possível concluir que os miRs, particularmente de tecido tumoral ou saliva, constituem biomarcadores promissores tanto para diagnóstico, como prognóstico do CCP HPV positivos. Contudo, é fundamental padronizar os protocolos de colheita e métodos de análise a fim de haver maior homogeneidade entre os estudos e assim obter conclusões mais robustas. De igual modo, os estudos reportados neste trabalho carecem de validação em coortes maiores e multicêntricas. Adicionalmente, é necessário a condução de investigações adicionais, particularmente em amostras menos invasivas (biópsias líquidas).

126