UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

**Modulação do fenótipo dependente do HPV16, pela expressão de HAI-1, em células-
tronco epiteliais**

Bruno Belmonte Martinelli Gomes

RIBEIRÃO PRETO

2018

BRUNO BELMONTE MARTINELLI GOMES

Modulação do fenótipo dependente do HPV16, pela expressão de HAI-1, em células-tronco epiteliais

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração:

Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Katiuchia Uzzun Sales

Ribeirão Preto

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Gomes, Bruno Belmonte Martinelli

Modulação do fenótipo dependente do HPV16, pela expressão de HAI-1, em células-tronco epiteliais. Ribeirão Preto, 2018.

69p. :il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.
Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Sales, Katiuchia Uzzun.

1. Câncer. 2. HPV. 3. Proteases.

Aluno: **Gomes, Bruno Belmonte Martinelli**

Título: **Modulação do fenótipo dependente do HPV16, pela expressão de HAI-1, em células-tronco epiteliais**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de concentração: Biologia Celular e Molecular. Orientadora: Profa.
Dra. Katiuchia Uzzun Sales

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a).: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

*“Abram os olhos e vejam tudo o que conseguirem ver
antes que se fechem para sempre.” Anthony Doerr*

DEDICATÓRIA

**A meus pais, Freud e Solange, exemplos de retidão e honestidade.
À minha irmã, Camila, por acreditar em mim mais que eu mesmo.**

AGRADECIMENTOS

Nenhum caminho, seja ele qual for, deveria ser percorrido sozinho. Um viajante solitário talvez não consiga atravessar todas as pontes, evitar todas quedas, se livrar de todos os perigos. Tampouco conseguiria um viajante acompanhado, é verdade. Ouso dizer, no entanto, que quando se está só, somente o destino importa e nada mais! Mas é no compartilhar com o outro que aprendemos a apreciar cada passo que nos leva até lá. Por isso, não posso deixar de agradecer a cada um que se fez presente nessa pequena, porém intensa, caminhada até aqui.

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por não me desamparar nos momentos mais difíceis. Ao Senhor, começo e fim, toda honra e toda glória para sempre.

À minha família:

Agradeço a meus pais, **Solange Aparecida Belmonte Martinelli Gomes** e **Freud Antonio Martinelli Gomes**, por me proporcionarem, com seu sacrifício diário, todas as condições para que eu me tornasse quem sou, hoje. Obrigado por serem exemplo de vida cristã, por serem honestos e não tolerarem a injustiça em nenhuma de suas formas. Quem dera eu pudesse ser, a meus filhos que um dia virão, uma pequena porção do que vocês são para mim.

À minha irmã, **Camila**, por ser minha constante fonte de entusiasmo e inspiração. As palavras me faltam, não há definição na nossa língua (e nem na estrangeira!) para descrever o que você representa na minha vida. Obrigado por ter este coração de ouro e por cuidar sempre de mim.

Aos meus avós, **Nilza Martinelli Gomes** e **José Belmonte Relva**, por me ensinarem os valores fundamentais de dedicação e humildade.

À minha tia **Maria Nilce Martinelli Pontes**, nossa eterna Tiinha, por me abrir as portas do mundo. Prometo não as fechar jamais.

Aos meus amigos:

Agradeço ao meu grande amigo **Rodrigo Alberto Alves da Silva**, por sua companhia constante, pelas discussões científicas (ou não), pelo sorriso de sempre e pela prontidão. Não poderia eu ter um parceiro melhor para esta aventura. Obrigado pelas lições de humildade e resiliência. Este trabalho também é seu.

Ao meu grande amigo **Gabriel Viliod Vieira**, por me acolher em sua cidade e em sua vida. Obrigado por todo o conhecimento que você me ensinou e que não se cansa de compartilhar. Obrigado por me fazer amadurecer e sempre me lembrar daquilo que realmente importa.

Ao meu grande amigo **Márcio Hideki Kodama**, pelo seu senso de justiça e humildade, por me ensinar o valor do silêncio, da educação e da ponderação. Obrigado, acima de tudo, por não esconder o tamanho da bondade que carrega dentro de si.

Sem vocês do ‘Clube do Bolinha’, eu já teria me perdido.

Ao meu amigo **Douglas Reis Abdalla**, por ser presença constante no meu crescimento pessoal e profissional. Obrigado por confiar em mim e me lembrar do caminho a ser seguido.

Ao meu amigo **Leonardo Assis Moraes**, por me mostrar que um oceano não é o bastante! Obrigado por ser meus pés no chão e pelo olhar crítico que muitas vezes me falta.

Ao meu amigo **Luis Eduardo Reis**, por me ensinar que a alegria é o maior e melhor combustível que podemos ter.

Aos meus amigos **Ana Carolina Santana** e **Felipe ten Caten**, por terem sido minha família quando me mudei para cá. Obrigado por me passarem a segurança necessária para que eu buscasse meus próprios caminhos.

Ao meu amigo **Cauã Antunes Westmann**, por me ensinar que, apesar de raro, as melhores mentes vêm acompanhadas de um coração generoso e humilde. Obrigado por me inspirar.

Agradecimentos

À minha amiga, **Luísa Czamanski Nora**, pela imensidão do seu coração, da sua paciência e do seu sorriso. Obrigado por me recolocar no lugar quando precisei.

À minha companheira, **Clara Martins Milanezi**, por nunca deixar de me apoiar. Obrigado por ser exemplo e inspiração desde o momento em que nos conhecemos.

Aos meus inestimados colegas de trabalho:

Agradeço à minha orientadora, **Profa. Dra. Katiuchia Uzzun Sales**, por ter confiado em mim desde que cheguei. Obrigado pela dedicação e empenho em nos tornar melhores profissionais, sempre escolhendo o caminho da honestidade e perseverança.

À minha amiga e mentora, **Elaine Zayas Marcelino da Silva**, pelo socorro imediato em minhas incontáveis dúvidas e desesperos. Obrigado por tornar mais suave meu caminho no aprendizado da ciência.

Às minhas companheiras de bancada, **Márcia Gaião Alves** e **Marina Ferreira Cândido**, por não me deixarem desistir frente aos desafios que, para mim, eram gigantescos.

A **Manuella Cazelato Pires** e **Naira Lopes Bibó**, por me ensinarem lições de humildade e por deixar claro o valor de um sorriso.

A **Carol Kobori** e **Mara Costa**, pelo incalculável suporte acadêmico e científico. Obrigado por nos guiarem na melhor maneira de sermos cientistas.

À Universidade de São Paulo:

Agradeço aos docentes que se disponibilizaram a fazer parte da Banca Examinadora da defesa deste trabalho. Muito obrigado pela atenção.

Aos professores do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, por compartilharem conosco sua caminhada.

Aos demais professores que são fonte de admiração e incentivo nestes tempos tão difíceis.

Agradecimentos

Agradeço imensamente a todos os funcionários de portaria, manutenção e limpeza do Prédio Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Obrigado por nos proporcionarem as melhores condições possíveis.

Às secretárias **Gabriela Bunhotto Zamoner**, **Lúcia Helena Picinato Raphael** e **Camila Fabris**, muito obrigado pelo ótimo serviço prestado e pela atenção dispensada a nós, alunos.

Aos demais funcionários que, de forma direta ou indireta, contribuem para que se mantenha o nível de excelência de nossa instituição.

Agradeço, ainda, à **Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)**, pela minha formação profissional.

À **CAPES**, **FAEPA** e **FAPESP**, pelo apoio financeiro à realização deste trabalho.

Agradeço, por fim, mas de maneira não menos importante, ao meu pequeno companheiro, o **Pudim** que, na falta de outras maneiras para se expressar, escolheu a forma mais pura: o amor.

Índice

RESUMO	ii
ABSTRACT	iv
INTRODUÇÃO	2
CÂNCER	2
– Epidemiologia do Câncer	4
– Etiologias do Câncer	5
– Causas não-genéticas:	5
– Causas genéticas	6
– Metástase:	8
CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO	10
PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)	12
– A infecção por HPV como questão de saúde pública	12
– Oncogênese mediada por HPV	13
– E6 e p53	15
– E7 e pRb	17
PROTEASES E CÂNCER	18
– Matriptase	19
– Matriptase na ativação de uPA	21
– Matriptase na ativação de HGF/SF	22
– A ativação de PAR-2 pela Matriptase	24
– Desregulações de matriptase e o câncer	25
– Os inibidores HAI-1 e HAI-2	26
MODELOS ANIMAIS PARA O ESTUDO DO HPV	28
OBJETIVOS	32
– Objetivo Geral	32
– Objetivos Específicos	32

MATERIAL E MÉTODOS	34
– 1. Animais transgênicos	34
– 2. Identificação e extração de DNA	34
– 3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	36
– 4. Extração de Epiderme	37
– 5. Extração de RNA e Síntese de cDNA	37
– 6. Análise Fenotípica e SCORAD	40
– 7. Análise Estatística	41
RESULTADOS	43
– 1. A presença de ambos os transgenes acontece concomitantemente na mesma camada epitelial	43
– 2. ...A presença concomitante de ambos os transgenes é compatível com o nascimento, desenvolvimento e sobrevida dos animais	45
– 3.A expressão concomitante do transgene de HAI-1 não resgata o fenótipo presente nos camundongos K14-HPV	47
– 4.Os níveis de RNAm de matriptase e HAI-1 parecem estar semi-quantitativamente inalterados nos camundongos K14-HPV	50
DISCUSSÃO	52
CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 The Hallmarks of Cancer	3
Figura 2 Ativação da via de Ras –	7
Figura 3 Efeitos da ação de E6 e E7 no comportamento celular –	18
Figura 4 Estrutura proteica da matriptase –	20
Figura 5 Efeitos da ativação de HGF/SF –	23
Figura 6 Estrutura de HAI-1 e HAI-2 –	27
Figura 7 Expressão diferencial de proteases e seus inibidores em camundongos K14-HPVE6 30	
Figura 8 Construtos transgênicos utilizados neste trabalho -	34
Figura 9 Padrão de documentação fotográfica dos animais em coorte.....	41
Figura 10 A expressão dos transgenes é concomitante na camada basal do epitélio	44
Figura 11 A presença dos transgenes não influencia no desenvolvimento dos camundongos	46
Figura 12 Pontuação das lesões observadas –	47
Figura 13 A presença de K5-HAI-1 não recupera o fenótipo de lesões causadas por K14- HPV –.....	48
Figura 14 O desenvolvimento das lesões não é influenciado pelo sexo dos animais –.....	49
Figura 15 Os níveis de mRNA de matriptase e HAI-1 parecem estar semi-quantitativamente inalterados nos camundongos K14-HPV –	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Padrão de clipagem para identificação dos animais.....	35
Tabela 2 Primers desenhados no presente trabalho..	39

LISTA DE SIGLAS

87MG – Células de glioblastoma

ADA3 – *Alteration/Deficiency in Activation 3*

AKT – *Protein Kinase B*

BAK – *Bcl-2 Homologous Antagonist/Killer*

BAX – *Bcl-2-like Protein 4*

CBP – *CREB-binding Protein*

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*

CDK – *Cyclin-dependent kinase*

CDKN2A – *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A*

c-Met – *Tyrosine-protein kinase Met*

CNA – *Copy Number Alterations*

CUB – *Complement C1r/s, urchin embryonic growth factor and bone morphogenetic protein 1*

Dlg – *Drosophila discs large*

DNA – *Ácido Desoxirribonucleico*

E1-E7 – *Early Genes*

E2F – *Genes Codificadores de Fatores de Transcrição*

E6AP – *E6-associated protein*

ERK – *Extracellular signal-regulated kinases*

GAP – *GTPase-activating protein*

GDP – *Guanosine Diphosphate*

GRB2 – *Growth Factor Receptor-Bound Protein 2*

GTP – *Guanosine Triphosphate*

HAI – *Hepatocyte Growth Factor Activator Inhibitor*

HGF/SF – *Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor*

HGFA – *Hepatocyte Growth Factor Activator*

HNSCC – *Head and Neck Squamous Cells Carcinoma*

HPV – *Human papillomavirus*

IDH – *Índice de Desenvolvimento Humano*

INCA – *Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva*

K14 – *Queratina 14*

KO – *knock-out*

L1-L2 – *Late Genes*

LDL – *Low density lipoprotein*

LINC – *Linker of the Nucleoskeleton and Cytoskeleton*

MANEC – *Motif at N-terminus with eight-cysteines*

MDM2 – *Murine Double Minute 2*

MEK – *Mitogen-activated protein kinase*

MKN45 – *Linhagem Celular de Adenocarcinoma Gástrico*

MMPs – *Metaloproteases*

NK4 – *HGF-antagonist/angiogenesis inhibitor*

OMS – *Organização Mundial de Saúde*

p107 – *Retinoblastoma-like protein 1*

p130 – *Retinoblastoma-like protein 2*

p14^{ARF} – *ARF tumor suppressor*

p16^{ink4a} – *Inibidor de CDK*

p27 – *Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B*

p300 – *Acetiltransferases de histonas*

p53 – *Tumor protein p53*

PAR – *Protease-activated Receptors*

PAR-2 – *Protease-activated receptor 2*

PC-3 – Células de câncer prostático

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PDZ – Domínio estrutural no qual a sigla deriva de um acrônimo de 3 proteínas: PSD-95, Dlg1 e ZO-1

PI3K – Fosfatidilinositol trifosfato

PIK3CA – *Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha*

PKB – Proteína cinase B

PKD – *Polycystic Kidney Disease*

pRb – *Retinoblastoma Protein*

RAF – *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*

Ras – *Rat Sarcoma genes*

RT-PCR – *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*

SCORAD – *Scoring for Atopic Dermatitis*

SEA – *Sea urchin sperm protein, enterokinase and agrin*

ST14 – *Suppressor of Tumorigenicity 14*

SUS – Sistema Único de Saúde

TERT – *Telomerase reverse transcriptase*

T_m – *Melting Temperature*

uPA – *urokinase plasminogen activator*

uPAR – *urokinase plasminogen activator receptor*

UV – Radiação Ultravioleta

WT – *Wild-type*

RESUMO

RESUMO

GOMES, Bruno Belmonte Martinelli. Modulação do fenótipo dependente do HPV16, pela expressão de HAI-1, em células-tronco epiteliais. [dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2018.

Os carcinomas de cabeça e pescoço, causados principalmente pelo tabaco e pela infecção por HPV, além da predisposição genética, figuram como a sexta maior causa de câncer no mundo. Este tipo de neoplasia maligna acomete cerca de 600 mil novas pessoas por ano e é caracterizada por apresentar baixas taxas de sobrevida. Essas baixas taxas se devem, principalmente, a (i) ausência de biomarcadores; (ii) diagnóstico tardio; e (iii) inespecificidade de tratamento. Não somente as altas taxas de mortalidade acompanham a doença, mas também de morbidade, devido ao fato de áreas nobres do organismo serem danificadas em consequência do tratamento cirúrgico agressivo utilizado e que, em combinação com a radioterapia, interferem em processos fisiológicos de grande importância como a fala e a deglutição. Ainda, o comportamento tumoral, mais ou menos agressivo, é resultado do desequilíbrio na expressão de diversos genes e proteínas. Neste cenário, muitas serino proteases, em conjunto com seus inibidores e substratos, estão alteradas durante o processo de carcinogênese. Destacamos a via da matriptase, uma serino protease transmembrana que ativa vias relacionadas à proliferação e sobrevivência celulares, e que se encontra superexpressa em diferentes casos de câncer. A interação entre a protease e seu inibidor cognato HAI-1 tem grande importância no prognóstico e evolução de diferentes carcinomas. Além disso, sabe-se que a superexpressão de HAI-1 tem efeito protetivo sobre lesões causadas pelo aumento nos níveis de matriptase, além de estar imunohistologicamente aumentado em carcinomas cervicais, cuja etiologia envolve a infecção por HPV em mais de 90% dos casos. Neste contexto, e considerando o potencial tumorigênico do HPV para os carcinomas de cabeça e pescoço, utilizamos, neste trabalho, camundongos transgênicos que expressam HAI-1 sob o promotor da queratina 5 (K5-HAI-1) e camundongos que expressam as oncoproteínas E6 e E7 do HPV16 sob o promotor da queratina 14 (K14-HPV), para avaliar o possível efeito modulador de HAI-1 sobre o fenótipo causado pelos oncogenes do HPV16. Para tanto, observamos os efeitos da co-expressão dos transgenes no desenvolvimento dos animais e analisamos quantitativamente a evolução das lesões espontâneas causadas pelos oncogenes virais, na presença ou ausência do transgene de HAI-1. Os resultados indicam que os diferentes animais transgênicos se desenvolvem de maneira semelhante, e que a expressão de HAI-1 em células tronco epiteliais parece não interferir no surgimento e na progressão de lesões epiteliais, características da expressão de E6 e E7 nas mesmas células precursoras do epitélio. **Palavras-chave:** 1. Câncer. 2. HPV. 3. Proteases.

ABSTRACT

ABSTRACT

GOMES, Bruno Belmonte Martinelli. Modulation of HPV-dependent phenotype by HAI-1 expression in epithelial stem cells. [dissertation]. Ribeirão Preto: University of São Paulo, Ribeirão Preto Medical School; 2018.

Head and neck carcinomas, which are mainly caused by tobacco use and HPV infection are also favoured by the individual genetic predisposition, and are considered the sixth leading cause of cancer worldwide. This type of malignant neoplasm affects about 600,000 new people per year and is also characterised by presenting low survival rates. These low rates are mostly due to (i) the absence of biomarkers; (ii) late diagnosis; and (iii) inespecificity of treatment. High mortality and morbidity rates go along with the disease due to the fact that noble areas of the organism are damaged as a consequence of the aggressive surgical treatment used which, in combination with the radiotherapy, interferes in physiological processes of great importance such as speech and swallowing. Moreover, the more or less aggressive tumour behaviour is a result of the imbalance in the expression of several genes and proteins. In this scenario, many serine proteases, their inhibitors and substrates are altered during the process of carcinogenesis. Matriptase, a transmembrane serine protease that activates pathways related to cell proliferation and survival, has gathered attention for being overexpressed in different cases of cancer. The interaction between this protease and its cognate inhibitor, HAI-1, is of great importance in the prognosis and evolution of different carcinomas. In addition, it is known that HAI-1 overexpression is closely related to a protective effect on lesions caused by increased levels of matriptase. In addition, the same inhibitor is immunohistologically enhanced in cervical carcinomas, a type of cancer caused by HPV infection in more than 90% of cases. In this context and considering the tumorigenic potential of HPV for head and neck carcinomas, transgenic mice that express HAI-1 under the keratin 5 promoter (K5-HAI-1), and mice expressing the E6 oncoproteins and E7 from HPV16 under the keratin 14 promoter (K14-HPV) were used in order to evaluate the possible HAI-1 modulating effect on the phenotype caused by the HPV16 oncogenes. In order to do so, the effects of co-expression of both transgenes on the development of animals were properly observed and the evolution of spontaneous lesions caused by viral oncogenes were quantitatively analysed in the presence or absence of the HAI-1 transgene. The results indicate that different transgenic animals have a similar development, and finally that HAI-1 expression in epithelial stem cells does not appear to interfere with the appearance and progression of epithelial lesions, which is a characteristic of E6 and E7 expression in the same precursor epithelial cells. **Key words:** 1. Cancer. 2. HPV. 3. Proteases.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

CÂNCER

O corpo humano, do momento da sua concepção à morte, se apresenta como uma estrutura extremamente dinâmica; e eventos como proliferação, diferenciação, migração e morte celular são necessários para que todas etapas do seu desenvolvimento e manutenção ocorram da maneira correta (Weinberg, 1995; Soteriou e Fuchs, 2018). Não surpreendentemente, o desequilíbrio entre estes eventos é altamente nocivo à harmonia do organismo (Parr, Sanders e Jiang, 2010; Ramqvist e Dalianis, 2011; Friedl, Wolf e Lammerding, 2011).

Exemplo clássico é o balanço entre o aumento no número de células, gerado pela divisão celular, e sua diminuição ocasionada pela morte celular, seja ela programada ou não. Câncer é a denominação dada a um conjunto de doenças cujo cerne é o descontrole sobre eventos essenciais da célula, como a proliferação e a morte celular supracitadas (Lever e Sheer, 2010).

Dada a complexidade de eventos envolvidos no surgimento e progressão do câncer, e o seu impacto em nível individual, familiar, social e global, a compreensão dos eventos moleculares envolvidos em todas suas etapas é primordial para que se alcancem diagnósticos mais precisos e tratamentos mais eficazes.

Em um artigo seminal, publicado em 2000 e atualizado em 2011, Hanahan e Weinberg propuseram uma série de características apresentadas pelas células durante ou após seu processo de malignização (Figura 1). Características como instabilidades genômicas e a resistência a supressores tumorais têm papel importante no surgimento do câncer, enquanto a indução de angiogênese, invasão e metástase favorecem o estabelecimento e progressão de tumores (Baeriswyl e Christofori, 2008; Talmadge e Fidler, 2010).

Dentre os diferentes aspectos apresentados, nas próximas páginas, destacamos a sinalização proliferativa continuada e a resistência à morte celular, visto que são componentes cruciais à homeostase tecidual (Baeriswyl e Christofori, 2008).

O controle fino da proliferação é necessário para que haja uma gestão correta dos recursos celulares, bem como para manutenção da homeostasia dos órgãos (Soteriou e Fuchs, 2018).

Figura 1 The Hallmarks of Cancer – Esta representação gráfica apresenta as principais características apresentadas pelas células em seu processo de malignização (Adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011)

Por outro lado, a morte celular excessiva pode comprometer a função de órgãos como um todo, e ocorre em doenças autoimunes e neurodegenerativas (Duyckaerts, Delatour e Potier, 2009; Favaloro *et al.*, 2012). Controversamente, o deslocamento do balanço para um aumento no número de células, seja por proliferação exacerbada ou morte deficiente, está intimamente associado ao surgimento do câncer (Hanahan e Weinberg, R. A., 2011)

O aumento anormal no número de células pode ter efeito tanto local, no comprometimento da estrutura dos órgãos afetados, como sistêmico, no organismo como um todo, o que pode levar o indivíduo à morte (Talmadge e Fidler, 2010).

Uma vez caracterizada a doença em suas diferentes nuances e possibilidades, seguimos a questionamentos de fundamental importância: qual o impacto causado pelo câncer a nível global e quais suas origens em relação à sociedade contemporânea?

Epidemiologia do Câncer

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer é a segunda maior causa de morte da atualidade. Este grupo de doenças acometeu, em 2012, mais de 14 milhões de pessoas em todo o mundo (Bray *et al.*, 2013). Em 2015, cerca de uma em cada seis pessoas morreram pelo câncer, aproximadamente 8,8 milhões de mortes associadas a esta doença no mundo (OMS, 2017).

A prevalência de diferentes tipos de câncer está também relacionada às condições econômicas de cada país. Em países com alto Índice de Desenvolvimento Humano (IDH), os principais casos de câncer são os de mama, pulmão e colorretais, enquanto em países com baixo IDH há maior prevalência de cânceres relacionados a infecções, como o câncer de colo de útero ocasionado pela infecção por HPV e câncer hepático, relacionado ao vírus da Hepatite B (Bray *et al.*, 2012; Plummer *et al.*, 2016). Além disso, as taxas de mortalidade relativas à doença também são inversamente proporcionais ao desenvolvimento econômico do país (Jemal *et al.*, 2011).

Ainda segundo a OMS, e analisando-se dados publicados na literatura, cerca de 60 a 70% de todas mortes relacionadas ao câncer ocorrem em países pouco desenvolvidos (Jemal *et al.*, 2011). Estes dados estão fortemente relacionados à precariedade dos programas de prevenção e diagnóstico de câncer oferecidos em países em desenvolvimento (Bray *et al.*, 2013).

No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva (INCA), estima um número de 600 mil novos casos de câncer no país em 2018. Por se tratar de um país com proporções continentais, observa-se alta heterogeneidade entre as diferentes regiões do Brasil. Capitais das regiões Sudeste e Sul tendem a apresentar taxas de incidência similares a países desenvolvidos, com maiores números de casos de câncer de mama e próstata. Por outro lado, nas regiões Norte e Nordeste também são impactantes os casos de câncer de colo de útero e estômago, situação similar àquela encontrada em regiões pouco desenvolvidas do mundo (Cancer in Brazil, INCA, 2013; Estimativa 2018 – Incidência de Câncer no Brasil, INCA, 2018).

A vigilância sobre as taxas de incidência e mortalidade tem grande importância no contexto de saúde pública do país, visto que serve como base para novas políticas de educação, prevenção e tratamento da população (Estimativa 2018 – Incidência de Câncer no Brasil, INCA, 2018). Campanhas de conscientização e prevenção, com alta veiculação midiática,

como o Outubro Rosa (mês de prevenção do câncer de mama) e Novembro Azul (prevenção do câncer de próstata) são iniciativas que têm tomado força no país. Além disso, a inclusão de vacinas contra o HPV no calendário obrigatório de imunização é também uma medida de combate ao câncer no Brasil (Ministério da Saúde, 2018). No entanto, é necessário que estes programas sejam ampliados, a fim de se gerar diagnósticos mais precoces para essas doenças.

Etiologias do Câncer

Com os avanços alcançados nas últimas décadas, evidenciou-se uma quebra de paradigma no que tange à nossa concepção das origens do câncer. Deixou-se de abordar o câncer como resultado de eventos isolados e passou-se a entender que o desenvolvimento da doença depende de uma série de etapas (Hanahan e Weinberg, 2000; Alexandrov *et al.*, 2013; Ortmann *et al.*, 2015).

Por se tratar de um grupo heterogêneo e complexo de doenças, não é possível apontar um único agente que cause o câncer. De fato, há uma miríade de eventos e substâncias, além da predisposição genética, que podem desencadear as mutações necessárias para o surgimento e progressão de tumores (Alexandrov *et al.*, 2013; Bray *et al.*, 2013).

Causas não-genéticas:

Dentre as principais causas ambientais, ou não-genéticas, do câncer, destacam-se o tabagismo, etilismo e exposição a agentes mutagênicos, tais como radiação Ultravioleta (UV), além da ação de agentes infecciosos, como o HPV e o vírus causador da Hepatite B (Jemal *et al.*, 2011).

Estudos apontam que o tabagismo induz um aumento de mais de 20 vezes na chance de se desenvolver câncer de pulmão (Jha *et al.*, 2013; Pirie *et al.*, 2013). Dados adicionais na literatura indicam ainda que o cigarro está envolvido em outros tipos de câncer, como o câncer de cavidade oral (Motgi *et al.*, 2014; Mahapatra *et al.*, 2015). A presença de substâncias cancerígenas no cigarro, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, causa instabilidades genômicas que, por sua vez, levam a variadas mutações que comprometem o equilíbrio celular, propiciando maiores taxas de proliferação celular (Ramqvist e Dalianis, 2011).

Não somente fatores externos induzem o surgimento do câncer. Por se tratar de um grupo de doenças cuja origem passa por instabilidades na sequência de DNA, o componente genético também tem grande importância na susceptibilidade de indivíduos ao

desenvolvimento de tumores (Hung *et al.*, 2008; Brennan, Hainaut e Boffetta, 2011; Sharma *et al.*, 2018).

Causas genéticas

No contexto do câncer, genes cujos produtos possuem ação protetiva, geralmente regulando a progressão do ciclo celular e apoptose, são denominados genes supressores de tumor. Exemplos importantes são os genes que codificam as proteínas p53 e a proteína do Retinoblastoma, *pRb*.

Conforme será explicitado posteriormente, p53 responde a diversos sinais nocivos às células, desencadeando diferentes respostas que culminam, geralmente, numa parada do ciclo celular ou em morte celular programada (Jeffers *et al.*, 2003). Não surpreendentemente, o gene que codifica p53 é o supressor tumoral com maior número de mutações existentes já catalogadas (Vousden e Lane, 2007).

Já pRb, de maneira geral, inibe a função do fator transcricional E2F, o que bloqueia a passagem da fase G1 para a fase S do ciclo celular (Figura 3) (Weinberg, 1995; Dick e Rubin, 2013).

A importância de pRb no câncer não advém somente da diminuição de suas funções protetivas relacionada à progressão tumoral, mas também da contribuição desta proteína ao entendimento da etiologia de tumores. Mutações nos dois alelos do gene que codifica pRb foram relacionadas ao surgimento do retinoblastoma, o principal tipo de câncer intraocular infantil (Khetan, Gupta e Gopal, 2011). Tais mutações podem se apresentar de duas maneiras distintas: (i) podem ser adquiridas de maneira espontânea por diferentes causas; ou (ii) podem ser herdadas, quando um indivíduo carrega a mutação em um dos alelos e a transmite para seus descendentes (Pandey, 2014). A presença de uma mutação herdada é uma predisposição genética ao desenvolvimento do câncer. Apesar de não necessariamente levar ao aparecimento de tumores, esta predisposição aumenta consideravelmente tais riscos, visto que é necessária apenas uma mutação no outro alelo para o desenvolvimento da doença (Dimaras et al, 2015). O padrão de surgimento do retinoblastoma, portanto, constitui um dos mais clássicos exemplos da etiologia genética do câncer. Mutações deletérias em genes supressores de tumor constituem passos importantes na progressão tumoral. Células em que Rb é ausente ou disfuncional são deficientes em sua capacidade de regular a progressão do ciclo celular, tornando-se sérias candidatas a uma proliferação descontrolada (Burkhart e Sage, 2008).

Por outro lado, há uma série de genes normais que, após sofrerem mutações, impactam negativamente sobre o equilíbrio celular, sendo denominados oncogenes (Croce, 2008). Exemplificaremos a seguir algumas vias de sinalização que são orquestradas por oncogenes.

A família das proteínas *Ras* é um importante componente das vias de sinalização celular e indispensável à sobrevivência da célula. Entretanto, quando mutadas em certas regiões, tornam-se proteínas constitutivamente ativadas e resultam na exacerbação da proliferação celular (Pylayeva-Gupta, Grabocka e Bar-Sagi, 2011). As proteínas Ras são pequenas GTPases que atuam como sinalizadores intracelulares da via Ras/Raf/MEK/ERK, mediando a comunicação entre receptores de membrana e efetores *downstream* (Figura 2) (Buhrman *et al.*, 2010; Pylayeva-Gupta, Grabocka e Bar-Sagi, 2011). A ação das Ras é dependente de GTP, e a sua hidrólise em GDP faz com que a proteína fique em sua configuração inativa. Tal hidrólise é mediada por proteínas denominadas *GTPase-activating proteins* (GAPs) (Scheffzek *et al.*, 2010). Mutações nos sítios que regulam a interação entre Ras e as GAPs resultam em uma proteína constitutivamente ativa, gerando uma sinalização ininterrupta de Ras, o que pode favorecer o descontrole da progressão celular (Buhrman *et al.*, 2010; Pylayeva-Gupta, Grabocka e Bar-Sagi, 2011).

Figura 2 Ativação da via de Ras – Representação esquemática mostrando apenas duas das diversas vias ativadas por RAS-GTP. A interação entre Ras e as vias de Raf/MEK/ERK e Akt resulta em maior proliferação e resistência à morte celular. Tais processos, que são fisiológicos, podem desencadear o surgimento de tumores na desregulação de RAS.

Outra proteína que age como nó de comunicação entre vias de sinalização e que, consequentemente, deve ser finamente regulada para que se mantenha o equilíbrio celular, é AKT (Engelman, Luo e Cantley, 2006; Manning e Toker, 2017). A proteína AKT, também conhecida como proteína cinase B (PKB), é uma serina/treonina cinase ativada pela via do fosfatidilinositol trifosfato (PI3K), e com uma série de alvos envolvidos em diversos processos celulares relacionados ao câncer, como apoptose, proliferação celular e angiogênese (Manning e Cantley, 2007). Como um importante transdutor de sinal, AKT responde a diferentes fatores *upstream*, tais como fatores de crescimento e citocinas (Manning e Cantley, 2007; Manning e Toker, 2017).

Por se localizar como um ponto comum entre diferentes vias de sinalização, e por agir sobre aspectos importantes ao equilíbrio celular, desregulações na atividade de AKT estão intimamente relacionadas a doenças, como diabetes tipo 2 e o câncer (Engelman, Luo e Cantley, 2006). De maneira geral, a ativação da via PI3K/AKT induz a proliferação celular por ativar, entre outros alvos, MDM2, ubiquitina-ligase que atua na degradação de p53, importante regulador do ciclo celular, e também por inibir a proteína regulatória p27 (Møller, 2000; Mayo e Donner, 2001). A translocação de MDM2 mediada por AKT, demonstrada por Mayo e Donner em 2001, implica em menores níveis de p53 que não somente age no controle do ciclo celular, mas também promove apoptose. Desta forma, a ativação da via PI3K/AKT também pode implicar em menores taxas de morte celular programada. Além disso, AKT inibe a ação da Caspase 9, e da proteína Bad, ambas com funções pró-apoptóticas (Datta *et al.*, 1997; Manning e Cantley, 2007). Considerando as informações acima expostas sobre a ação da via PI3K/AKT, pode-se inferir que mutações ou desregulações na expressão de componentes *upstream*, isto é, proteínas ou vias que ativem AKT, constituem fatores predisponentes à malignização celular.

Metástase:

Outro fator crucial para a progressão do câncer é a invasão de tecidos saudáveis pelas células malignas e a colonização de áreas secundárias pelo organismo, denominada metástase (Steeg, 2016). O processo de metástase não ocorre de maneira imediata, mas são necessárias etapas para que um grupo de células deixe sua localização inicial e colonize sítios distantes. A estes diferentes passos deu-se a denominação ‘cascata metastática’ (Talmadge e Fidler, 2010; Ebelt, Cantrell e Berg, 2013).

Vários aspectos morfológicos e moleculares têm influência na capacidade invasiva de uma célula ou grupo de células. Dentre as características morfológicas, podemos destacar as capacidades mecânicas do núcleo, que podem permitir ou dificultar o trânsito celular por ambientes confinados (Friedl, Wolf e Lammerding, 2011; Zwerger, Ho e Lammerding, 2011).. Já nos aspectos moleculares, destacamos mudanças nos padrões de expressão de genes e proteínas, e as informações que podem ser obtidas a partir destas observações.

A relação entre a mecânica nuclear e migração envolve propriedades físicas das células e sua capacidade de locomoção em situações de confinamento (Friedl, Wolf e Lammerding, 2011). Para determinados tipos celulares, a maleabilidade nuclear é o ponto crucial para o sucesso ou fracasso de eventos migratórios (Olins *et al.*, 2009). A malha de microtúbulos e filamentos internos ao núcleo está conectada ao citoesqueleto por um grupo de proteínas denominado complexo LINC (*Linker of the Nucleoskeleton and Cytoskeleton*) (Isermann e Lammerding, 2013). Estudos indicam que mutações e variações na expressão de Nesprinas, proteínas componentes do complexo LINC, estão relacionadas a diferentes tipos de câncer (Cartwright e Karakesisoglou, 2014). Como ocorre em diferentes outros casos, pouco ainda se sabe se tais mudanças são causa ou consequência da progressão tumoral.

Com o advento das análises de dados em larga escala de pacientes acometidos por diferentes tipos de câncer, pesquisadores têm observado que certos padrões de mutações ou variações de expressão gênica podem ser agrupados em ‘Assinaturas Moleculares’ (Behjati *et al.*, 2016; Davies *et al.*, 2017; Drost *et al.*, 2017). Os dados gerados acerca da evolução destes grupos frente a determinados tipos de tratamento proporcionam novos *insights* a respeito do comportamento dos tumores (Alexandrov *et al.*, 2016; Davies *et al.*, 2017). Desta forma, acredita-se que, ao se refinarem as técnicas de análise, será possível indicar a abordagem mais indicada para cada paciente de acordo com a assinatura molecular que seu câncer apresenta.

A detecção de genes e/ou proteínas cuja expressão está alterada (seja positiva ou negativamente) nos diferentes casos de câncer constitui ferramenta de grande importância na busca de novos marcadores prognósticos ou alvos terapêuticos. Neste contexto, e levando em consideração o tipo de câncer abordado no presente estudo, destacamos uma protease, a Matriptase, e um de seus inibidores, HAI-1. É descrito, em diferentes estudos, que uma ou ambas proteínas apresentam expressão alterada em casos de câncer cervical, oral, hepático, entre outros (Nagata *et al.*, 2001; Nakamura *et al.*, 2009; Cheng *et al.*, 2014). A relação destas

proteínas entre si em contextos fisiológicos e patológicos será aprofundada no decorrer deste estudo.

CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO

O câncer de cabeça e pescoço é um grupo heterogêneo de tumores formado por cânceres de orofaringe, cavidade oral, cavidade nasal, lábio, faringe e laringe (Pearson, Jackson e Nör, 2016). Levantamentos apontam cerca de 550.000 novos casos anuais em todo o mundo, com cerca de 300.000 mortes (Jemal *et al.*, 2011). No Brasil, o câncer de cavidade oral é o quinto mais incidente em homens (11.140 novos casos a cada 100 mil habitantes), enquanto é o 11º em mulheres (4.350 novos casos/100 mil hab.) (INCA, 2016).

Análises epidemiológicas apontam que 90% dos casos de câncer nesta região anatômica surgem de células epiteliais, sendo denominados carcinomas de células escamosas da cabeça e pescoço, ou *Head and Neck Squamous Cells Carcinoma* (HNSCC) (Vigneswaran e Williams, 2014).

O consumo de tabaco, geralmente associado ao etilismo, configura o principal agente causador do HNSCC (Chaturvedi *et al.*, 2013; Cancer Genome Atlas Network, 2015). Conforme mencionado anteriormente, as mutações genéticas causadas pelo tabagismo induzem a proliferação anormal de células, etapa primordial para o surgimento do câncer (Motgi *et al.*, 2014; Mahapatra *et al.*, 2015).

Estudos apontam que, apesar do sucesso em políticas para a diminuição no consumo de tabaco nos EUA, as taxas de incidência de HNSCC não acompanharam esta tendência, apontando outro importante agente etiológico dessa doença, a infecção pelo Papilomavírus Humano, o HPV (Sturgis e Cinciripini, 2007). De fato, um grande corpo de evidências tem associado a infecção por tipos de HPV de alto risco ao surgimento do HNSCC nas últimas décadas (Kreimer *et al.*, 2005; Ramqvist e Dalianis, 2010, 2011; Chaturvedi *et al.*, 2013; Cancer Genome Atlas Network, 2015; Berman e Schiller, 2017).

Maiores detalhes sobre o potencial carcinogênico do HPV serão apresentados na próxima seção, mas, de maneira geral, as proteínas E6 e E7 do HPV têm capacidade de desregular o controle do ciclo celular, ao inativarem, respectivamente, p53 e pRb (Berman e

Schiller, 2017). Desta forma, células infectadas pelo HPV podem sofrer processos de imortalização e divisão infinita, características básicas de células cancerosas.

Uma análise sobre as principais alterações moleculares presentes em pacientes com HNSCC demonstrou uma relação entre a etiologia e as mutações apresentadas (The Cancer Genome Atlas Network, 2015). A maioria dos tumores, independente do principal agente causador, apresentou alta instabilidade genômica, com alterações no número cópias gênicas (CNAs), incluindo perdas e ganhos de regiões cromossômicas específicas.

Outros estudos trazem evidências que apontam a ação de modificações epigenéticas na progressão do HNSCC (Glazer *et al.*, 2009; Ha *et al.*, 2009; Molinolo *et al.*, 2009). Exemplo disso é o *locus* gênico 9p21, onde se localiza, entre outros, o gene CDKN2A (responsável por codificar p16^{ink4a} e p14^{ARF}, que atuam na complexa regulação de p53) (Rivandi *et al.*, 2018). Este *locus* geralmente se apresenta pouco expresso em HNSCCs apesar de não haverem indícios de alterações genéticas ou mutações, o que indica que modificações epigenéticas, como silenciamento de promotores por hipermetilação, possam ser os responsáveis por este silenciamento (Ha *et al.*, 2009; Molinolo *et al.*, 2009).

A importância do estudo sobre HNSCCs se dá não só por suas altas taxas de incidência, mas também pelo fato de pacientes acometidos com este tipo de câncer possuírem taxas de sobrevida relativamente baixas: cerca de metade dos pacientes com a doença não sobrevive nos 5 anos que se seguem após o diagnóstico (Parkin *et al.*, 2005). Além disso, o tratamento para este tipo de câncer inclui cirurgias de ressecção agressivas e radioterapia. Desta forma, por acometer áreas nobres do organismo, esta é uma doença com altas taxas de morbidade associada; já que muitas das funções essenciais para o dia-a-dia, como olfato e deglutição, ficam comprometidas (Forastiere *et al.*, 2001).

Alguns fatores, como: (i) a ausência de marcadores de prognóstico; (ii) o diagnóstico tardio (em consequência da escassez de programas públicos de prevenção para este tipo de câncer); e (iii) a resposta ineficaz aos tratamentos em vigor, contribuem para estas altas taxas de mortalidade (Molinolo *et al.*, 2009). Desta forma, salienta-se a importância da busca por alvos que possam atuar como novos biomarcadores e/ou alvos terapêuticos, proporcionando um diagnóstico precoce e tratamentos mais eficazes.

PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

O *Human Papillomavirus* (HPV) é um vírus da família Papillomaviridae, com DNA circular de dupla fita e genoma com tamanho próximo a 8kb (Villiers, De *et al.*, 2004). Segundo o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*, EUA), este é o tipo de infecção sexualmente transmissível mais comum nos Estados Unidos (Satterwhite *et al.*, 2013). Existem cerca de 100 tipos de HPV listados, dentre os quais 15 são considerados de alto risco, devido à sua íntima relação com o surgimento de neoplasias (Muñoz *et al.*, 2003).

A infecção por HPV constitui uma questão de saúde pública, visto que é responsável por mais de 90% dos casos de câncer cervical, a segunda maior causa de morte feminina relacionada ao câncer, e por cerca de 40% dos casos de HNSCC. Desta forma, vacinas contra os principais tipos de HPV de alto risco têm sido desenvolvidas e integradas aos calendários obrigatórios de vacinação em diversos países. Os tipos HPV 16 e 18 são considerados os mais perigosos, por serem responsáveis por mais de 70% dos casos de câncer de colo uterino registrados atualmente, além de figurarem entre as causas de HNSCCs (Muñoz *et al.*, 2003; Molinolo *et al.*, 2009).

A infecção por HPV como questão de saúde pública

Conforme discutido anteriormente, a distribuição dos diferentes casos de câncer está intimamente relacionada às condições econômicas e sociais dos países. Ainda, dados epidemiológicos indicam uma maior prevalência do câncer cervical em regiões com baixo Índice de Desenvolvimento Humano. Como a grande maioria dos cânceres cervicais é relacionada à infecção pelo HPV, esta doença adquire também um caráter socioeconômico, refletindo os investimentos em políticas públicas de conscientização e promoção de saúde (Sturgis e Cinciripini, 2007; Bray *et al.*, 2012).

O desenvolvimento de vacinas altamente eficazes contra os principais tipos de HPV de alto risco (Gardasil®, tetravalente para os tipos 6, 11, 16 e 18; e Cervarix™, bivalente para 16 e 18) configura um avanço com grande potencial para impactar positivamente o combate às doenças relacionadas ao HPV (Audisio *et al.*, 2016; Valentino e Poronsky, 2016). A vacinação contra o HPV constitui proteção primária contra a infecção pelo vírus.

Diversos países têm adotado programas de vacinação contra o HPV, ao incluir estas vacinas no calendário obrigatório. No Brasil, a imunização com vacina recombinante tetravalente (para os tipos 6, 11, 16 e 18) foi introduzida no calendário nacional de vacinação e distribuída gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde, o SUS (Ministério da Saúde, 2014).

A campanha inicial, lançada em 2014, contemplava a vacinação de meninas entre 11 e 13 anos de idade. Atualmente, a vacinação se expandiu para meninas entre os 9 e 14 anos, meninos entre 11 e 14 anos, e pacientes imunodeprimidos entre os 9 e 26 anos de idade (Ministério da Saúde, 2017). Ainda, a meta é que sejam incluídos, até 2020, meninos da faixa etária dos 9 aos 14 anos de idade.

Estudos indicam que, além da inestimável melhoria na qualidade de vida da população, a ampliação da vacinação contra o HPV para indivíduos do sexo masculino tem também um impacto positivo sobre a economia do país (Jiang *et al.*, 2013). No Reino Unido, estima-se que os custos com a ampliação da vacinação para indivíduos do sexo masculino custe apenas $\frac{1}{4}$ dos gastos públicos com tratamentos de HNSCC provocado por HPV (Audisio *et al.*, 2016). Considerando outros casos de câncer na população masculina causados pelo HPV, como o câncer de pênis e o câncer anal, o impacto seria ainda maior.

Além das campanhas de vacinação, outra abordagem frente à epidemia de HPV são campanhas que visam conscientizar e informar a população sobre seu risco. Diferentes estudos apontam falhas no conhecimento de diversos setores da população acerca dos riscos envolvidos com a infecção por HPV, bem como sobre a existência de métodos preventivos, como a vacinação (Abdalla *et al.*, 2017; Islam *et al.*, 2018; Jassim, Obeid e Nasheet, 2018; Rosen, von *et al.*, 2018).

Desta forma, é necessário um esforço conjunto entre os órgãos de pesquisa e instituições governamentais para que o conhecimento gerado se traduza em aplicações práticas na melhoria da saúde pública.

Oncogênese mediada por HPV

O HPV apresenta um ciclo de vida pouco usual em relação a outros tipos de vírus. Enquanto na maioria das infecções virais a célula infectada é a responsável por produzir novas partículas virais, a síntese de novas partículas de HPV ocorre somente após a divisão da célula infectada e durante a diferenciação de suas células-filhas (Moody e Laimins, 2010). Desta forma, o controle sobre a proliferação da célula infectada é uma alteração marcante ocasionada pelo HPV.

O HPV apresenta tropismo por epitélios escamosos, e sua infecção ocorre em células da camada basal do epitélio, geralmente por meio de microferimentos que permitem o contato do vírus com as células. Uma vez dentro da célula, o genoma do HPV se organiza de modo a

formar episômos, elementos de DNA extracromossomal que se amplificam de maneira independente em relação ao DNA da célula hospedeira.

O genoma do HPV pode ser dividido em dois grupos de genes, de acordo com sua ordem de expressão. Os *early genes* (E1-E7) são responsáveis por modular o comportamento da célula hospedeira e controlar o número de cópias virais, gerando, assim, um ambiente propício à multiplicação viral. Já os *late genes* (L1 e L2) têm funções relacionadas à estruturação do capsídeo viral (Münger e Howley, 2002; Shai *et al.*, 2007).

O potencial oncogênico do HPV reside, principalmente, nas proteínas E6 e E7 (Villiers, De *et al.*, 2004). De maneira geral, E6, entre outras funções, induz à degradação de p53, importante componente regulador da proliferação celular e da apoptose (Song, Pitot e Lambert, 1999; Shai *et al.*, 2010). Já um dos efeitos da expressão de E7 é a degradação de pRb, que controla a passagem entre as fases G1 e S do ciclo celular (Münger e Howley, 2002; Dick e Rubin, 2013). Evidências indicam que, apesar de não agir diretamente como E6 e E7, a proteína E5 auxilia na carcinogênese mediada por estas proteínas (DiMaio e Mattoon, 2001).

A proteína p53, denominada ‘guardião do genoma’, responde a uma série de estresses que podem comprometer a estabilidade genômica, como mutações no DNA, sinalização de determinados oncogenes e bloqueios de transcrição, entre outros (Vousden e Lane, 2007). A ativação de p53, de maneira geral, induz a parada do ciclo celular e ativa a ação de mecanismos de reparo. Em determinados casos, no entanto, p53 pode ativar vias de apoptose, de forma a evitar que determinados erros não reparados se propaguem para as próximas gerações de células (Jeffers *et al.*, 2003; Villunger *et al.*, 2003).

Por agir como um sensor de estresses, e por sua ativação possuir implicações sérias para a célula, a ação de p53 é finamente regulada por uma série de processos que incluem ubiquitinação, modificações pós-traducionais e até compartimentalização subcelular (Vousden e Lane, 2007). A proteína MDM2, alvo da ação de AKT, é uma das responsáveis por controlar os níveis de p53, por induzi-la à degradação. A deleção de MDM2 em camundongos causa morte embrionária devido à apoptose excessiva causada pela ação de p53 (Marine *et al.*, 2006).

Deve-se ressaltar que a infecção por HPV não necessariamente induz ao surgimento de tumores. A capacidade do sistema imunológico em combater a infecção, bem como a predisposição genômica a outras alterações, têm grande impacto na progressão da doença. A integralização do genoma do HPV na célula hospedeira constitui outro fator importante no processo de carcinogênese (Hausen, zur, 2002).

Análises de lesões pré-malignas apontam que a maior parte das células apresentam o genoma viral ainda em sua forma episomal. Por outro lado, na maioria das lesões de alto grau o genoma do HPV se encontra integralizado à célula hospedeira. Esta relação entre integralização de genomas e malignização se deve, em parte, à ação regulatória exercida por E2 sobre E6 e E7 (Moody e Laimins, 2010).

Estudos indicam que a expressão de E2 controla a ação de *Early genes* responsáveis pela desregulação do ciclo da célula hospedeira e este aparenta ser parte de um mecanismo de controle do número de cópias virais (Stubenrauch, Lim e Laimins, 1998; Goodwin e DiMaio, 2000). Quando o DNA viral se integra ao genoma humano, o gene de E2 é frequentemente perdido, cessando a ação inibitória sobre E6 e E7, que podem então agir de maneira indefinida, garantindo vantagem evolutiva às células que integralizaram o genoma viral (Schwarz *et al.*, 1985; Baker *et al.*, 1987; Jeon, Allen-Hoffmann e Lambert, 1995). Estudos com células transformadas, nas quais havia somente expressão de E6 e E7 integralizados ao genoma, demonstraram que a reintrodução de E2 induziu as células a um estado de senescência (Francis, Schmid e Howley, 2000; Goodwin e DiMaio, 2000).

Em seguida, serão detalhados os aspectos moleculares das desregulações sobre o controle do ciclo celular e apoptose causadas pelos oncogenes virais E6 e E7.

E6 e p53

E6 é uma proteína relativamente pequena, com tamanho aproximado de 18kDa, e se localiza prioritariamente no núcleo da célula hospedeira, onde interage com seus alvos e realiza suas funções (Moody e Laimins, 2010). A expressão de E6 tem grande influência em eventos críticos para a homeostase tecidual, como proliferação, apoptose e imortalização celular. O principal alvo de E6 é p53, regulador fundamental do ciclo celular e apoptose (Huibregtse, Scheffner e Howley, 1991; Scheffner *et al.*, 1990, 1993).

A oncoproteína E6 age sobre p53 por meio de diferentes vias que vão, invariavelmente, impedir sua função ou levá-la a degradação (Lechner e Laimins, 1994). Sob a ótica da infecção pelo HPV, o bloqueio da função de p53 facilitaria a replicação viral por meio do desequilíbrio do ciclo celular e da resistência da célula hospedeira à apoptose.

Uma das vias de inibição de p53 mediada por E6 é dependente da proteína E6AP (*E6-associated protein*), uma ubiquitina ligase recrutada por E6 e que forma complexos triméricos

com p53, induzindo à sua degradação no proteassomo (Huibregtse, Scheffner e Howley, 1991). E6 pode também se ligar a proteínas que garantem estabilidade a p53, como as acetiltransferases de histona p300, CBP (*CREB-binding Protein*) e ADA3 (Kumar *et al.*, 2002). Por fim, E6 também pode se ligar diretamente a p53, bloqueando sua capacidade de ligação ao DNA e impactando negativamente sua ação (Lechner e Laimins, 1994).

Apesar de a inibição de p53 constituir um importante aspecto negativo da ação de E6, estudos com mutantes mostraram que esta proteína, mesmo quando não interagia nas vias de p53, E6 era capaz de immortalizar células (Liu *et al.*, 1999), indicando mecanismos carcinogênicos independentes de p53. Dentre os alvos destas vias independentes de p53, certas proteínas com domínio PDZ merecem destaque, como os homólogos humanos para as proteínas Dlg (*Drosophila discs large*) e Scribble da mosca-da-fruta *Drosophila melanogaster*. Tais proteínas se ligam a E6 por seus domínios PDZ e isto as leva à degradação que, induz a hiperproliferação celular. Além disso, estudos com mutantes de E6 que não reconhecem sítios PDZ indicam que esta função está relacionada à capacidade tumorigênica desta oncoproteína viral (Nguyen *et al.*, 2003).

No contexto da apoptose, além da interação negativa com p53, E6 pode também agir sobre proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 BAX e BAK, levando-as à degradação (Garnett e Duerksen-Hughes, 2006). As proteínas BAX e BAK são responsáveis por, mediante sinalizações específicas de estresse, formar poros na membrana mitocondrial e permitir a liberação de seu conteúdo, incluindo o citocromo-c, componente importante para a formação do apoptossomo e, conseqüentemente, para ativação da via de apoptose (Westphal *et al.*, 2011).

Outra consequência da expressão de E6 de HPVs de alto risco, isto é, alta capacidade tumorigênica, é a ativação de TERT (*Telomerase reverse transcriptase*), proteína responsável pelo alongamento dos telômeros (Moody e Laimins, 2010). O alongamento dos telômeros, sequências de DNA repetidas que se alongam nas extremidades cromossômicas com funções protetivas, é uma característica marcante de immortalização celular, o que contribui para a proliferação e conseqüente malignização das células infectadas (Hanahan e Weinberg, R. a, 2011).

As complexas relações de E6 e seus efeitos negativos sobre o controle do ciclo celular e apoptose, no contexto da infecção pelo HPV e da expressão de outros oncogenes, constituem fatores fundamentais para a carcinogênese mediada pelo vírus. Como veremos a seguir, a

expressão concomitante com E7 orchestra eventos com alta capacidade de imortalização celular.

E7 e pRb

A expressão isolada de E7 parece ser suficiente para o desenvolvimento de câncer em camundongos transgênicos (Herber *et al.*, 1996). E7 é uma proteína de aproximadamente 13 kDa que também pode ser encontrada no núcleo das células infectadas. De maneira similar e complementar a E6, a expressão de E7 também tem impacto sobre a proliferação e morte celular (Moody e Laimins, 2010).

No contexto do controle sobre o ciclo celular, o principal alvo de E7 é, sem dúvidas a proteína pRb. A expressão de E7 impacta direta e indiretamente as funções de pRb, principalmente no que tange ao controle da progressão do ciclo celular (Dick e Rubin, 2013).

De acordo com a abrangente revisão feita por Moody e Laimins (2010), E7 interage com pRb e outras proteínas da mesma família (p107 e p 130) em domínios em sua região N-terminal. Tal interação impede a ligação de pRb com os fatores de transcrição da família E2F, que agem em genes relacionados à progressão e diferenciação celular e à apoptose (Weinberg, 1995; Rubin, 2013;).

E7 também promove a proliferação celular ao inibir as proteínas regulatórias p21 e p27. De maneira geral, p21 e p27 são inibidoras de CDKs, proteínas que por sua vez promovem o avanço de diferentes fases do ciclo celular. A ausência de p21 está relacionada a tumores de mama e orais em humanos, e a um maior número de tumores cervicais em modelos animais *knock-out* (Shin *et al.*, 2010). E7 interage com estes inibidores e os inativa, promovendo desregulações no ciclo celular independentes da inativação de pRb (Helt, Funk e Galloway, 2002)

Em conjunto com E6, E7 também pode induzir a malignização celular pela indução de danos ao DNA, propagação de instabilidade genômica, resistência à apoptose e à sinalização de supressores de crescimento (Moody e Laimins, 2010). É interessante notar que um dos principais efeitos colaterais da desregulação de pRb por E7 é o aumento na expressão de p53. No entanto, quando E6 é também expressa, este efeito protetor é inexistente, corroborando com o maior potencial carcinogênico relacionado à expressão concomitante destas oncoproteínas virais.

A Figura 3 resume algumas desregulações mediadas por E6 e E7 no comportamento celular.

Figura 3 Efeitos da ação de E6 e E7 no comportamento celular – Representação de algumas das vias alteradas por E6 e E7 que culminam, invariavelmente, no desequilíbrio celular, aumentando as taxas de proliferação celular e diminuindo aquelas de apoptose.

PROTEASES E CÂNCER

A complexidade de eventos que ocorrem em uma célula se dá, entre outros motivos, pela dinâmica das reações que permeiam o ambiente intra e extracelular. As modificações pós-traducionais sofridas por diversas proteínas conferem uma camada extra de regulação destas intrincadas relações. Dentre as diversas modificações a que uma proteína pode ser submetida, destacamos a proteólise, a quebra de proteínas por hidrólise em suas ligações peptídicas, uma modificação de caráter geralmente irreversível, que é responsável por diferentes efeitos, como a ativação ou inativação de vias.

A proteólise é catalisada por uma classe de proteínas denominada proteases, ou enzimas proteolíticas (Turk, 2006). A classificação das proteases é feita com base em duas características principais: (i) a natureza de seu sítio catalítico, e (ii) a região da proteína-alvo onde a hidrólise acontece. No primeiro aspecto, as proteases podem ser classificadas como serino, cisteíno, treonino proteases, metaloproteases ou, ainda, proteases de ácido aspártico.

Em relação à região de hidrólise, as proteases podem ser aminopeptidases ou carboxipeptidases, quando clivam seus alvos nas regiões N- e C-terminais, respectivamente, ou ainda endopeptidases, quando essa clivagem ocorre na região central da proteína-alvo (Turk, 2006; López-Otín e Bond, 2008).

As proteases participam ativamente de variados processos intracelulares, seja na degradação de proteínas para reciclagem, progressão do ciclo celular e apoptose, entre outros (Bastians *et al.*, 1999; Taylor, Cullen e Martin, 2008). Por provocarem alterações predominantemente irreversíveis, a atividade das proteases deve ser fortemente regulada. Não surpreendentemente, diversas proteases são expressas juntamente com seus inibidores cognatos, o que acontece com a Matriptase e seu inibidor HAI-1 (Zheng *et al.*, 2014).

Desregulações na ação de proteases estão intimamente relacionadas ao surgimento de doenças, como é o que acontece em diferentes casos de câncer. Como citado anteriormente e aprofundado a seguir, a expressão de Matriptase está alterada na pele de camundongos transgênicos que mimetizam a ação oncogênica do HPV e em diferentes outros casos de câncer (Mendoza-Villanueva *et al.*, 2008; Nakamura, K. *et al.*, 2009).

Desta forma, o estudo das proteases, suas funções e, principalmente, regulação, traz consigo um grande potencial de descoberta de novos biomarcadores ou alvos terapêuticos.

Matriptase

A matriptase é uma serino protease codificada pelo gene ST14 e amplamente expressa em tecidos epiteliais de diferentes regiões, como a pele, o trato gastrointestinal, rins, pulmões, próstata e glândulas mamárias (Takeuchi, Shuman e Craik, 1999; Oberst *et al.*, 2002). Conforme exploraremos a seguir, a Matriptase está envolvida em uma série de eventos fisiológicos no organismo, como na função de barreira da pele e também na migração celular, mas anomalias na sua expressão e atividade podem estar relacionadas à carcinogênese (Uhland, 2006).

A matriptase é uma protease transmembrana de tamanho aproximado de 95kDa. Conforme observado na Figura 5, esta proteína é composta por uma região N-terminal intracelular curta, uma região transmembrana e a grande maioria de seus domínios está presente em sua porção C-terminal extracelular. A porção extracelular da matriptase é composta por um domínio SEA (*sea urchin sperm protein, enterokinase and agrin*), dois domínios CUB

(*complement C1r/s, urchin embryonic growth factor and bone morphogenetic protein 1*), quatro repetições *in tandem* do receptor de LDL (*low density protein*) classe A e um domínio catalítico semelhante à tripsina, composto de uma tríade de aminoácidos Histidina, Ácido Aspártico e Serina (Oberst *et al.*, 2003). A posição extracelular de sua porção C-terminal e a estrutura de seu sítio catalítico conferem à matriptase classificação como uma serino protease transmembrana de tipo II (Szabo e Bugge, 2011).

Figura 4 Estrutura proteica da matriptase – Representação esquemática da estrutura da matriptase ancorada à membrana celular. Como uma serino protease transmembrana tipo II, a matriptase apresenta sua porção N-terminal intracelular e a C-terminal extracelular. Ainda, apresenta uma região transmembrana de passagem única, e na região extracelular encontram-se os domínios SEA, CUBs, quatro repetições de domínio semelhante a receptor LDL e o domínio de serino protease propriamente dito. Além disso, estão indicados os sítios de clivagem no resíduo Glicina 149 e Arginina 614, necessários para a conversão do zimógeno inativo para a conformação ativa da matriptase. (Feito com ajuda de Servier Medical Art tools (<http://www.servier.com>))

Inicialmente, a matriptase é expressa como um zimógeno, isto é, um precursor que demanda uma ou várias modificações pós-traducionais para que desempenhe sua função eficientemente (Turk, 2006). A ativação da matriptase ocorre em dois sítios específicos: (i) uma hidrólise entre os resíduos Glicina 149 e Serina 150, no domínio SEA; e (ii) uma clivagem no resíduo Arginina 614, em sua região catalítica (Nonboe *et al.*, 2017). Assim como ocorre com outras serino proteases, esta segunda clivagem a converte de um zimógeno de cadeia simples a uma protease ativa de cadeia dupla (Benaud, Dickson e Lin, 2001).

Para a maioria das serino proteases, a clivagem que resulta em ativação do zimógeno é geralmente realizada por uma outra proteína. No caso da ativação da matriptase, um agente importante é a proteína prostrasina, uma serino protease semelhante à tripsina, também ancorada

à membrana celular. Friis e colaboradores (2017) apontam um mecanismo de ativação recíproca de zimógenos entre matriptase e prostasina. Neste estudo, os autores indicam que o zimógeno de matriptase tem capacidade de ativar prostasina e que esta, por sua vez, atua na conversão do zimógeno de matriptase em proteína ativa. De maneira peculiar, tal ativação mediada por prostasina aparentemente independe de sua própria ativação ou funções catalíticas. Os autores não descartam, no entanto, a presença de outros agentes ainda desconhecidos neste processo de ativação mútua.

Além da proteólise sítio-específica, comum à maioria das serino proteases, e da clivagem de seu domínio SEA, a ativação da matriptase é dependente do estado de seus outros domínios (Oberst *et al*, 2003; Uhland, 2006). Em uma série de experimentos com mutações pontuais nos diferentes domínios da matriptase, Oberst e colaboradores (2003) demonstraram que a ativação desta protease somente ocorre quando diferentes critérios são atendidos. De maneira geral, os experimentos apontaram que são necessárias, para a ativação da matriptase, (i) glicosilações no primeiro domínio CUB e no seu domínio catalítico; e (ii) a manutenção de seus domínios receptores LDL classe A intactos (Oberst *et al*, 2003).

Uma vez ativa, a matriptase atua em diversos processos relacionados à proliferação e migração celular, etapas importantes para a regeneração de órgãos e tecidos, mas, ao mesmo tempo, características marcantes da tumorigênese (Uhland, 2006). A matriptase também realiza uma função importante no desenvolvimento embrionário, visto que camundongos *knock-out* (KO) para a proteína apresentam formação anormal dos folículos pilosos e morrem logo após o nascimento por meio de desidratação grave (List *et al.*, 2002). Os mesmos autores demonstraram que tal desidratação se dá pela perda da função de barreira da pele dos camundongos, demonstrada por experimentos de permeabilidade a corantes e perda de líquidos.

Matriptase na ativação de uPA

A Matriptase age na via de uPA (*urokinase plasminogen activator*), responsável por, dentre outras funções, participar na regulação da adesão e migração celular, na transdução de sinais e na ativação de fatores de crescimento e zimógenos de diversas metaloproteases (MMPs) (Sidenius e Blasi, 2003; Uhland, 2006).

A protease uPA é inicialmente expressa na forma de um zimógeno de cadeia única, a pro-uPA, com função limitada. A protease uPA ativa, em associação ao seu receptor de membrana uPAR, participa da ativação de plasmina: uma protease semelhante à tripsina que age em processos de remodelação tecidual e migração (Uhland, 2006). Em termos de eficiência de ativação, a matriptase é uma das principais enzimas que catalisam a proteólise que converte pro-uPA na enzima ativa de duas cadeias uPA, juntamente com a plasmina (Förbs *et al.*, 2005).

Diferentes trabalhos indicam a ação de matriptase na ativação da via de uPA, visto que uma menor expressão de matriptase implica em menores ativações de uPA em células de câncer de ovário e de próstata (Suzuki *et al.*, 2004; Förbs *et al.*, 2005). Dão corpo a esta hipótese evidências que demonstram a colocalização de matriptase e uPA/uPAR na membrana plasmática da frente de invasão de células em migração (Rømer *et al.*, 1994; Hung *et al.*, 2003).

Aumentos na expressão de componentes do sistema da uPA estão geralmente relacionados a piores prognósticos de pacientes com câncer, como acontece com casos de câncer de mama (Janicke *et al.*, 2001; Look *et al.*, 2002; Förbs *et al.*, 2005). Desta forma, esta é uma via de importância para a ação de matriptase no câncer.

Matriptase na ativação de HGF/SF

O HGF/SF (*Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor*,) é um fator de crescimento intimamente relacionado à dissociação celular e aumento de motilidade (Uhland, 2006). Por sua alta afinidade com o receptor tirosina-quinase Met, que por sua vez é codificado pelo proto-oncogene c-Met, o HGF/SF possui funções mitogênicas, morfogênicas e induz a migração celular (Szabo *et al.*, 2011). Uma representação das vias influenciadas por HGF/SF pode ser vista na Figura 6, onde, por meio de proteínas adaptadoras como GRB2 e efetoras, como PI3K, a ativação de c-Met induz vias de sobrevivência e proliferação celular.

A ligação de HGF/SF ao receptor Met implica na ativação de vias importantes à invasão celular, como a via de Ras-MAPK, PI3K, entre outras (Uhland, 2006). Tais vias, quando desreguladas, atuam na promoção da carcinogênese (Downward, 2003; Schubbert, Shannon e Bollag, 2007; Pylayeva-Gupta, Grabocka e Bar-Sagi, 2011). Não surpreendentemente, a ação de HGF/SF está relacionada ao câncer (Kawaguchi e Kataoka, 2014).

Figura 5 Efeitos da ativação de HGF/SF – Representação esquemática de algumas das diferentes vias ativadas pela ligação entre HGF/SF e o receptor c-Met, com ênfase em seus efeitos no comportamento celular pela ativação da via de Akt e Ras (Feito com ajuda de Servier Medical Art tools (<http://www.servier.com>)).

De fato, diversos trabalhos têm apontado que o crescimento tumoral e a invasão de células cancerosas são significativamente afetados pela inibição de HGF/SF. Abounader e colaboradores (2002) utilizaram um mecanismo de inibição gênica por meio de ribozimas (U1snRNA) específicas para HGF e c-met em células de glioblastoma (87MG) e comprovaram que o *knockdown* duplo foi o suficiente para comprometer o crescimento tumoral em xenotransplante em camundongos *nude* (nu/nu). Matsumoto e Nakamura (2003) revisam as vias afetadas por HGF/SF e apontam a dupla importância de NK4, um competidor antagonista de HGF, na inibição tanto de HGF/SF quanto da angiogênese. Por fim, Mazzone e colaboradores (2004) geraram uma isoforma de pro-HGF/SF resistente à proteólise e demonstraram que sua expressão suprime o crescimento tumoral, indicando que esta proteólise é necessária para a ação tumorigênica de HGF/SF.

O HGF/SF é ubiquamente expresso como um zimógeno inativo, denominado pro-HGF/SF (Uhland, 2006). A conversão de pro-HGF em HGF é dependente da proteólise extracelular do precursor. Assim como ocorre na ativação de pro-uPA, a matriptase se equipara em termos de eficiência com a principal enzima responsável pela ativação de HGF, o HGFA (*Hepatocyte Growth Factor Activator*) (Förbs *et al.*, 2005; Uhland, 2006).

Diferentes experimentos apontam a relação entre matriptase e HGF/SF no câncer, como a ativação da via de sinalização PI3K-Akt, *downstream* à ligação HGF/SF/Met, pela expressão

do homólogo murino da matriptase (List *et al.*, 2005). Ainda, a inibição de matriptase foi o suficiente para diminuir os efeitos de HGF/SF na dissociação de células de câncer prostático (PC-3) (Förbs *et al.*, 2005).

Os efeitos similares da ação de matriptase sobre as vias de uPA e HGF/SF, e a relação destas com o câncer, corroboram para a importância do controle sobre a ativação de matriptase para a manutenção da homeostasia celular e tecidual.

A ativação de PAR-2 pela Matriptase

As proteínas PAR (*Protease-activated Receptors*) compõem uma família de receptores acoplados à proteína G que são ativados por proteólises específicas catalisadas por proteases (Rothmeier e Ruf, 2012). PAR-1, -3 e -4 são comumente ativados pela trombina, relacionada à coagulação sanguínea, enquanto PAR-2, insensível à trombina, é ativado por diferentes famílias de proteases, como fatores de coagulação VIIa e Xa, calicreínas teciduais e proteases transmembrana, como a matriptase (Riewald e Ruf, 2002; Fan *et al.*, 2005; Oikonomopoulou *et al.*, 2006).

Este receptor é expresso em diferentes tipos celulares presentes na pele, incluindo queratinócitos, fibroblastos, células nervosas e do sistema imune, como células dendríticas, mastócitos e leucócitos (Bocheva *et al.*, 2009). A ativação de PAR-2 está relacionada a processos como a adesão celular, a manutenção da função de barreira da epiderme e a respostas inflamatórias (Takeuchi *et al.*, 2000; Hachem *et al.*, 2006; Demerjian *et al.*, 2008; Sales *et al.*, 2014).

Além da expressão em tecidos saudáveis, PAR-2 também foi detectado em amostras de carcinoma de células escamosas (List *et al.*, 2005; Bocheva *et al.*, 2009). Desta forma, Sales e colaboradores (2015) se propuseram a estudar, por meio de animais transgênicos, a possível contribuição de PAR-2 na carcinogênese mediada por matriptase *in vivo*. Os resultados apontaram que a deficiência na expressão de PAR-2 inibiu (i) o surgimento de lesões pré-malignas (hiperplasia epitelial, hiperproliferação e displasias); (ii) a carcinogênese espontânea e (iii) induzida por agentes químicos, características da expressão ectópica de matriptase. Estes dados indicam a importância da ativação de PAR-2 na carcinogênese mediada por matriptase.

O grande número de evidências geradas por diversos grupos sobre a ação da matriptase em diferentes vias aponta sua importância no surgimento e progressão do câncer.

Desregulações de matriptase e o câncer

Os efeitos fisiológicos da ação da matriptase e sua participação na carcinogênese pelas diferentes vias citadas anteriormente, denotam a importância da sua regulação na manutenção da homeostasia tecidual. O controle sobre a ação da matriptase deve ser muito rígido, visto que alterações, mesmo que sutis, nos níveis da proteína têm sérios efeitos ao organismo, como a carcinogênese espontânea (List *et al.*, 2005; Sales, Friis, Abusleme, *et al.*, 2014).

A expressão diferencial de certos genes e proteínas é característica constante na progressão de diferentes tipos de câncer, e a análise de anomalias é passo importante para a detecção de possíveis biomarcadores de carcinogênese (Alexandrov *et al.*, 2016). Neste contexto, a matriptase tem chamado atenção por ter sido detectada em altos níveis em casos de câncer de mama, próstata, ovário, entre outros (Uhland, 2006).

Em um estudo publicado em 2006, Jin e colaboradores analisaram histologicamente 164 amostras de tumores de ovário, e correlacionaram uma maior expressão de matriptase com a severidade dos casos. Resultados similares foram obtidos em análises de câncer oral, publicadas por Cheng e colaboradores em 2014. Neste trabalho, os autores avaliaram a marcação de matriptase em 104 biópsias de carcinoma oral, e observaram que uma maior expressão de matriptase estava relacionada a um pior prognóstico da doença.

O controle da atividade de matriptase, feito por seus inibidores, também tem grande relevância nos achados clínicos. Diferentes autores apontam a relação entre a expressão de matriptase e HAI-1, seu inibidor cognato, na progressão tumoral. Oberst e colaboradores (2002) associaram um desequilíbrio na razão entre matriptase e HAI-1, onde havia maior expressão da protease em relação ao seu inibidor, com um pior prognóstico em câncer de ovário. Além disso, em um estudo com linhagens celulares de câncer de próstata, Saleem e colaboradores (2006) observaram um aumento na expressão de matriptase acompanhado pela diminuição nos níveis de HAI-1.

Outros trabalhos envolvendo câncer de pulmão, de mama, de rim e de fígado corroboram para a importância da matriptase, principalmente em casos com controle deficiente, na gênese e progressão de tumores (Uhland, 2006). Desta forma, o estudo desta protease se faz necessário para melhor compreensão e potencial tratamento do câncer.

Os inibidores HAI-1 e HAI-2

A irreversibilidade das modificações causadas pelas proteases exige que suas atividades sejam intimamente reguladas, papel exercido em grande parte por proteínas inibitórias. De fato, evidências apontam que o equilíbrio entre certas proteases e seus inibidores é importante para a homeostasia tecidual. Nesta seção abordaremos dois inibidores de serino proteases, HAI-1 e HAI-2 (*Hepatocyte Growth Factor Activator Inhibitor*), no que tange à sua estrutura, alvos e atividades no contexto fisiológico e patológico.

HAI-1 e HAI-2 são proteínas transmembrana tipo-I, ou seja, apresentam extremidade N-terminal extracelular, expressas na maioria das células epiteliais do organismo. Conforme observado na Figura 7, ambas possuem uma porção intracelular curta, um domínio transmembrana e domínios inibidores de serino proteases extracelulares do tipo Kunitz, responsáveis pelo caráter inibitório das mesmas. HAI-1 ainda possui outros domínios, como: (i) MANEC, um domínio rico em cisteínas encontrado em diferentes serino proteases tipo I, mas cuja função ainda não foi totalmente elucidada; (ii) um domínio interno semelhante a PKD (*Polycystic Kidney Disease*) cuja função aparenta ser a manutenção da ligação de HAI-1 e matriptase e, consequentemente, aumenta sua capacidade inibitória; e (iii) um domínio receptor de LDL classe A, envolvido nas interações protéicas realizadas por HAI-1 (Bycroft *et al.*, 1999; Kojima *et al.*, 2008). As diferentes isoformas de HAI-2, *a* e *b*, distinguem-se entre si pela ausência de um domínio do tipo Kunitz. Esta diferença, no entanto, não tem impacto sobre a capacidade inibitória das isoformas (Kataoka *et al.*, 2018).

Apesar de serem caracterizadas como proteínas transmembrana, HAI-1 e HAI-2 foram inicialmente identificadas a partir do sobrenadante de uma linhagem celular de câncer gástrico, a MKN45, indicando uma liberação destas para o ambiente extracelular (Kawaguchi *et al.*, 1997; Shimomura *et al.*, 1997). De fato, diferentes estudos comprovaram a liberação de porções solúveis de HAI-1 frente a estímulos carcinogênicos, e que este processo está relacionado à clivagem por metaloproteases (Shimomura *et al.*, 1997; Kataoka *et al.*, 2000; Ishikawa *et al.*, 2017).

Figura 6 Estrutura de HAI-1 e HAI-2 – Representação gráfica dos inibidores de protease HAI-1 e HAI-2. Ambas são proteases transmembrana do tipo I, com a região N-terminal extracelular. Apresentam região C-terminal intracelular curta, passagem única pela membrana celular e domínios inibidores de serino proteases tipo Kunitz extracelulares. HAI-1 ainda apresenta outros domínios protéicos, com MANEC, domínio tipo PKD e receptor de LDL de classe A. HAI-2 se apresenta em duas isoformas, que diferem entre si apenas na quantidade de domínios tipo Kunitz, sem disparidades na sua capacidade inibitória (Adaptado de Kataoka *et al.*, 2018)

HAI-1 e HAI-2 são potentes inibidores do ativador de HGF/SF, HGFA, regulando sua atividade em nível pericelular (Parr, Sanders e Jiang, 2010; Roversi, Olalla Saad e Machado-Neto, 2018). Como visto anteriormente, a via de HGF/SF está envolvida em processos como proliferação celular e resistência à apoptose, fundamentais à progressão tumoral. Além disso, em ensaios *in vitro*, HAI-1 e HAI-2 demonstraram capacidade inibitória contra uma série de proteases semelhantes à tripsina, incluindo matriptase e prostasina, que também ativam a via de HGF/SF (Kataoka *et al.*, 2018).

Estudos com animais transgênicos denotam a importância de HAI-1 e HAI-2 na manutenção do equilíbrio do organismo. Animais *knock-out* para estas proteínas morrem ainda antes do nascimento por más formações placentárias e embrionárias (Kataoka *et al.*, 2018). Em estudos nos quais foram obtidos camundongos recém-nascidos *knock-out* para HAI-1 (por meio do uso de quimeras para manutenção placentária), estes animais morriam ao fim da segunda semana de vida, devido a comprometimentos das funções da epiderme. (Nagaike *et al.*, 2008; Kawaguchi *et al.*, 2015). De maneira interessante, a deleção ou redução dos níveis de matriptase resgata estes fenótipos letais da ausência de HAI-1, corroborando para a importância do equilíbrio entre as proteases e seus inibidores (Szabo *et al.*, 2007, 2009).

Neste contexto, alterações na expressão de HAI-1 e HAI-2 têm sido evidenciadas na progressão de variados tipos de câncer. Diferentes estudos apontam que menores níveis de destas proteínas em casos de câncer cervical, esofágico, de ovário e de mama estão frequentemente relacionados a piores prognósticos para os pacientes (Roversi *et al.*, 2018). Ainda segundo estes autores, o mecanismo envolvido nesta redução aparenta ser a metilação de promotores. A expressão de HAI-1, além de estar inversamente relacionada à progressão dos tumores supracitados, se apresenta também diminuída nas células invasivas de carcinomas orais de células escamosas (Baba *et al.*, 2012).

Considerando as proteases inibidas por HAI-1 e HAI-2, como a matriptase, e seu papel no câncer, uma inferência razoável é que o balanço entre enzima e inibidor também tenha importância na progressão tumoral. De fato, foi demonstrado que a diminuição da razão Matriptase/HAI-1 confere caráter menos agressivo em células de câncer de ovário (Sun *et al.*, 2016). Efeito similar ocorre em animais transgênicos, onde o fenótipo maligno causado pela superexpressão de matriptase na camada basal da epiderme é revertido mediante superexpressão conjunta de HAI-1 na mesma camada (List *et al.*, 2005).

Como previamente explicitado, a regulação de HAI-1 aparenta estar envolvida em casos de câncer oral e cervical (Nakamura *et al.*, 2009; Baba *et al.*, 2012). Tais cânceres estão frequentemente relacionados à infecção por HPV (Hausen, zur, 2002). Considerando estes dados juntamente com o impacto de serino proteases inibidas por HAI-1 no câncer, buscamos, neste trabalho, avaliar o potencial efeito protetivo da expressão de HAI-1 sobre alterações teciduais causadas pelos oncogenes do HPV16.

MODELOS ANIMAIS PARA O ESTUDO DO HPV

Dada a importância dos oncogenes virais no desenvolvimento do câncer, e considerando a integralização do genoma do HPV como evento que potencializa seus efeitos deletérios, o uso de modelos animais é uma ferramenta importante no estudo da carcinogênese dependente do HPV. Diferentes grupos utilizam animais transgênicos que não são infectados pelo HPV, mas que carregam seus oncogenes, de forma a mimetizar os efeitos de sua expressão. (Riley *et al.*, 2003; Mendoza-Villanueva *et al.*, 2008).

Um modelo utilizado globalmente compreende camundongos que expressam os *early genes* do HPV16, de alto risco, sob a ação do promotor da queratina 14 (Arbeit *et al.*, 1994).

Nestes animais, referidos de agora em diante como K14-HPV16, a expressão dos oncogenes é direcionada, pelo promotor da queratina 14, à camada basal do epitélio dos camundongos. Este direcionamento mimetiza o comportamento viral, que infecta preferencialmente esta região do epitélio (Moody e Laimins, 2010).

A expressão dos oncogenes de maneira constitutiva na pele dos camundongos pode levar a alterações similares às aquelas encontradas em lesões pré-malignas relacionadas à infecção por HPV, como displasia e hiperplasia epitelial, além do desenvolvimento de papilomas (Arbeit et al, 1994). Outros modelos importantes foram derivados deste criado por Arbeit e colaboradores em 1994, como aqueles que expressam, de maneira independente, E6 ou E7, sob a influência do mesmo promotor K14 (Herber *et al.*, 1996; Riley *et al.*, 2003).

O uso de animais que expressam constitutivamente um ou outro oncogene do HPV teve grande influência no conhecimento atual das funções de E6 ou E7 (Herber *et al.*, 1996; Shai *et al.*, 2007). Riley e colaboradores (2003) demonstraram que, mediante tratamento com estrógeno, a expressão isolada de E6 foi insuficiente para o desenvolvimento do câncer, apesar de significativamente diminuir os níveis de p53. A expressão constitutiva de E7, neste cenário, ocasionou instabilidades genômicas e acarretou no surgimento de focos de tumores cervicais. No entanto, a expressão combinada de E6 e E7 teve resultados muito mais significativos, com o surgimento de tumores altamente invasivos, indicando a já mencionada complementariedade dos efeitos de E6 e E7 (Riley *et al.*, 2003; Moody e Laimins, 2010).

Estudos abrangentes de expressão gênica, como o uso da técnica de *microarray*, permitem uma maior compreensão das vias alteradas pelo HPV. Mendoza-Villanueva e colaboradores (2008) apontaram que quase 2 mil genes são diferencialmente expressos na pele dos camundongos transgênicos, enquanto cerca de 350 sofrem influência na região cervical destes camundongos K14E6. Estes dados podem indicar outras vias alteradas pelo HPV e que podem contribuir para sua carcinogênese, além das interações já estudadas e demonstradas. De fato, uma análise dos dados gerados neste estudo demonstrou que matriptase e prostasina, proteases cuja expressão está alterada em diversos tipos de câncer, e seus inibidores, HAI-1 e HAI-2, se encontram superexpressos na pele destes animais (Figura 7 A).

Figura 7 Expressão diferencial de proteases e seus inibidores em camundongos K14-HPVE6 - (A) Análise dos dados fornecidos por Mendoza-Villanueva e colaboradores (2008) e disponível na plataforma GEO (*Gene Expression Omnibus*, NCBI) indica maior expressão de matriptase, prostasina, HAI-1, HAI-2 e KLK7, um alvo de matriptase, na pele de camundongos K14HPVE6. (B e C) Além disso, a expressão de matriptase, relativa àquela de seus inibidores HAI-1 e HAI-2, também se encontra elevada em animais K14HPVe6 em relação às suas contrapartes selvagens (Adaptado de Mendoza-Villanueva *et al*, 2008)

Como veremos nas próximas seções, o equilíbrio entre certas proteases e seus inibidores tem importância na progressão de diferentes tumores. Neste cenário, o desequilíbrio da expressão matriptase/inibidores, com maior expressão relativa da protease (Fig. 7 B e C), levou-nos a construir a hipótese a ser testada no presente estudo. Questionamentos de fundamental importância para compreensão das vias da carcinogênese relacionada ao HPV.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Analisar a atividade *in vivo* da via proteolítica da matriptase na modulação do fenótipo causado pela atividade dos oncogenes E6 e E7 do HPV16.

Objetivos Específicos

- Validar o modelo animal como instrumento para testar a hipótese supracitada. Em detalhes (i) confirmar a expressão concomitante dos transgenes de HAI-1 e HPV na camada basal do epitélio; e (ii) analisar a viabilidade da co-expressão de ambos os transgenes (K5-HAI-1 e K14-HPV) nos camundongos;
- Avaliar a modulação do fenótipo dependente do HPV16, através da análise dos seguintes coortes: (i) camundongos selvagens oriundos de mesmas ninhadas; (ii) camundongos que expressam apenas o transgene de HAI-1 (K5-HAI-1); (iii) camundongos que expressam apenas o transgene do HPV16 (K14-HPV); e (iv) camundongos que expressam ambos os transgenes (K5-HAI-1; K14-HPV);
- Analisar semi-quantitativamente os níveis de mRNA de matriptase e HAI-1 nos camundongos selvagens e K14-HPV.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais transgênicos

Neste trabalho foram utilizados camundongos FVB transgênicos, machos e fêmeas, gentilmente cedidos pelo Dr. Thomas Bugge (NIH/NIDCR, EUA). Foram utilizadas duas linhagens de animais transgênicos: (i) linhagem na qual os oncogenes virais do HPV16, E6 e E7, estão expressos sob o promotor da queratina 14 (K14-HPV, Hanahan *et al.*, 1994); e (ii) linhagem na qual o cDNA do inibidor de protease HAI-1 (gene *Spint1*, [NM_016907.3](#), List *et al.*, 2005) está expresso sob o promotor da queratina 5 (K5-HAI-1) (Figura 8). A partir do cruzamento destas linhagens, foram obtidos animais: K14-HPV, K5-HAI-1, K14-HPV/K5-HAI-1 e selvagens (*wild-type*).

Figura 4 Construtos transgênicos utilizados neste trabalho - À esquerda, representação gráfica do construto carregando os oncogenes E6 e E7 do HPV16, sob o promotor da queratina 14 (adaptado de Hanahan *et al.*, 1994). À direita, construto utilizado nos animais K5-HAI-1, compreendendo o cDNA de HAI-1 murino (gene *Spint1*), sob a ação do promotor da queratina 5 (extraído de List *et al.*, 2005)

Os animais foram criados e mantidos no Biotério do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (número 003/2015-1). Finalmente, os experimentos foram realizados com camundongos oriundos de mesma ninhada para minimizar as variáveis de confusão.

Para estudos de coorte, camundongos duplo transgênicos K14-HPV/K5-HAI-1 foram observados por um período de até 52 semanas e documentados periodicamente. Foram analisados aspectos morfológicos gerais para estudo das características fenotípicas apresentadas por indivíduos de cada um dos genótipos listados acima. Maiores detalhes sobre a identificação e análise serão fornecidos nas próximas seções.

2. Identificação e extração de DNA

Por se tratarem de animais transgênicos, os camundongos foram propriamente identificados e genotipados em até 21 dias de vida dos filhotes. Para a identificação de cada

animal foi utilizado o padrão de clipagem, com *ear punching*, que consiste na perfuração da orelha dos animais de maneira ordenada, conforme exposto na Tabela 1.

Clipagem (Sigla)	Região perfurada
<i>Nothing</i> (N)	Sem perfurações
<i>Right</i> (R)	Perfuração única na orelha direita
<i>Left</i> (L)	Perfuração única na orelha esquerda
<i>Both</i> (B)	Perfuração única em ambas orelhas
<i>Right, Right</i> (RR)	Perfuração dupla na orelha direita
<i>Left, Left</i> (LL)	Perfuração dupla na orelha esquerda
<i>Right, Right, Left</i> (RRL)	Perfuração dupla na orelha direita, e única na esquerda
<i>Left, Left, Right</i> (LLR)	Perfuração dupla na orelha esquerda, e única na direita
<i>Right, Right, Left, Left</i> (RRLl)	Perfuração dupla em ambas orelhas

Tabela 1 Padrão de clipagem para identificação dos animais

Após a identificação de cada animal, uma pequena porção (com tamanho máximo de 2mm) da extremidade distal da cauda era seccionada para extração de DNA genômico. Este material passou, então, por digestão enzimática, que consiste em incubação em solução de lise (200µL – Tampão de Lise, receita abaixo) a 55°C, em banho seco, *overnight*.

Tampão de Lise

- Tris-HCL (pH8) 1M – 10mL
- EDTA 500mM – 1mL
- NaCl 5M – 4mL
- SDS 10% – 2mL
- H₂O – 83mL
- Proteinase K (20mg/mL) – 500µL

Após a digestão, a separação do DNA se dava pela adição de 200µL de álcool isopropílico e centrifugação (13200 rpm) por 10 minutos a temperatura ambiente. O *pellet*

formado era ressuspensionado em 200µL de solução Tris-EDTA (TE, Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 7,4).

Após a identificação e extração do DNA genômico, a genotipagem de cada animal foi realizada através da reação de PCR explicitada abaixo.

3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A amplificação do DNA genômico foi feita pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Foi utilizado o kit *Taq Pol Master Mix 2x Green* (Cellco Biotec, São Carlos, Brasil), que contém, em uma única solução (Master Mix), a enzima DNA polimerase termoestável, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, KCl, MgCl₂, corante, tampão de carregamento e estabilizantes. O protocolo utilizado seguiu as instruções do fabricante. Os primers utilizados foram:

- **K5-HAI-1 Fw** 5'-GTACTGAACGAGGCAGACAA-3'
- **K5-HAI-1 Rev** 5'-GTCCCCTCCTTAAGTCCCCA-3';
- **K14-HPV16 Fw** 5'-AGAACTGCAATGTTTCAGGACCCACAG-3'
- **K14-HPV16 Rev** 5'-TCTGCAACAAGACATACATCGACCGG-3'

O aparelho utilizado para a ciclagem da PCR foi o Termociclador (*C1000-Touch™ Thermocycler*, Bio-Rad, Berkeley, California, EUA). O programa utilizado foi, como se segue:

1. Desnaturação inicial – 95°C por 2 minutos;
2. Desnaturação – 95°C por 1 minuto;
3. Anelamento/Hibridização – 55°C por 1 minuto
4. Elongação – 72°C por 1 minuto
5. Repetição dos passos 2-4 por 33 vezes
6. Elongação final – 72°C por 7 minutos
7. Manutenção das amostras – 4°C até a retirada das amostras

Ao término do ciclo, as amostras eram aplicadas em gel de Agarose 1,5% p/v (Sigma Aldrich, St Louis, EUA) em tampão TAE (Tris, Ácido Acético, EDTA) e contendo o intercalante de DNA *SYBR™ Safe* (Invitrogen, California, EUA) em diluição 1:10.000. As

amostras eram então submetidas a eletroforese para separação das bandas (100 volts por 30 minutos). Após a corrida, o gel era revelado em fotodocumentador *ChemiDoc™ MP* (Bio-Rad, Berkeley, California, EUA), com uso do software *Image Lab* v5.2, desenvolvido pela mesma empresa.

4. Extração de Epiderme

Animais recém-nascidos (com menos de 24 horas de vida), provenientes do cruzamento K14-HPV x WT, foram submetidos ao protocolo descrito abaixo, adaptado daquele publicado por Lichti, Anders e Yuspa (2008), e consiste em:

- Decapitação e desmembramento dos animais;
- Retirada de porção distal da cauda para re-genotipagem (conforme exposto nos itens anteriores);
- Excisão da pele total dos animais, com o uso de pinças e tesoura estéreis (para maiores detalhes, referir à Figura 1 do artigo publicado por Lichti, Anders e Yuspa, (2008);
- Incubação da pele total em solução de EDTA 10mM (1mL EDTA 0,5M em 49mL PBS) a 55°C por 5 minutos;
- Separação mecânica da epiderme e da derme, com auxílio dos instrumentos estéreis.
- Divisão da epiderme em duas porções:
 - Extração de RNA: adição de 500µL de *RNAlater®* (ThermoFisher Scientific, EUA) para estocagem a -20°C;
 - Extração de proteína: congelamento imediato com nitrogênio líquido ou gelo seco e estocagem a -80°C.

5. Extração de RNA e Síntese de cDNA

Por se tratarem de tecidos, as amostras precisaram ser maceradas antes da extração de RNA propriamente dita. Para isso, foram preparados tubos de centrifugação cilíndricos de volume 1,5mL com *beads* plásticas responsáveis pelo maceramento do tecido. Ao tubo foram

adicionados 500µL de TRIzol® (Life Technologies™, CA, EUA), seguido da adição das amostras. Os tubos foram então submetidos a três ciclos de agitação em alta velocidade (6800x/min por 15 segundos) no homogeneizador tecidual *Precellys* (Bertin Instruments, Montigny-le-Bretonneux, França), intercalados por incubações de um minuto em gelo, para evitar degradação por aquecimento.

Após homogeneização, o material foi transferido para tubos limpos e foi dado prosseguimento ao processo de extração de RNA utilizando-se TRIzol® e protocolo adaptado, que difere do proposto pelo fabricante apenas em uma incubação em isopropanol por 60 minutos a -80°C para precipitação do RNA. Uma vez concluída a extração de RNA, as amostras foram quantificadas no espectrofotômetro *Eppendorf BioSpectrometer® kinetic* (Eppendorf, Alemanha) e 3 µg de RNA foram tratados com duas unidades da enzima DNase I (New England BioLabs®, EUA) para eliminação de DNA genômico residual, segundo instruções do fornecedor.

Após este procedimento, as amostras foram mais uma vez quantificadas, e foram utilizados 500ng de RNA para síntese de DNA complementar (cDNA). Foi utilizado o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, EUA), e o protocolo utilizado foi o proposto pelo fabricante.

Como controle da qualidade das amostras, para cada reação feita, foi realizada também uma reação sem a presença da enzima Transcriptase Reversa, denominada ‘No-RT’. Nestas, substituiu-se o volume da enzima por 1µL de H₂O livre de nucleases. Desta forma, as amostras de cDNA seriam descartadas caso houvesse amplificação de produto, decorrente da contaminação por DNA genômico, na reação ‘No-RT’.

A validação das amostras foi feita por PCR convencional, seguindo o exposto no ‘*Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)*’, utilizando-se primers específicos para o gene GAPDH de camundongos (para mais informações, referir-se à Tabela de Primers, abaixo).

Foram desenhados diversos pares de primers, ou sequências de oligonucleotídeos, específicos para cada gene em análise. Foi utilizado o software *SnapGene* (GSL Biotech LLC, disponível em snapgene.com), para o desenho dos primers, que consistia em: (i) importação das sequências dos genes estudados, (ii) análise de íntrons e éxons e possíveis isoformas, (iii) desenho das sequências de oligonucleotídeos.

Com o intuito de se manter um padrão para futuros experimentos, os primers desenhados em nosso laboratório têm certas características em comum: (i) *Tm* próxima a 55°C, (ii) conteúdo de GC entre 40-60%, (iii) tamanho dos primers entre 15-25 nucleotídeos, e (iv) *amplicon* resultante de 120 pares de bases (pb).

Todos primers desenhados neste estudo podem ser conferidos na tabela a seguir. Aqueles utilizados estão marcados em negrito.

Primer	Sequência 5'-3'
mProstasin_Fw(1)	CCATGTTTGTGGCGGG
mProstasin_Rev(1)	GAGTCTAGCTGGTGGGC
mProstasin_Fw(2)	AATCCGAGCTGACGGG
mProstasin_Rev(2)	TTGCCATCGTAGGTGATGC
HPV16_E6_Fw	CCCACAGGAGCGACC
HPV16_E6_Rev	TCATATACCTCACGTGCGAG
HPV16_E7_Fw	CAGAACCGGACAGAGCC
HPV16_E7_Rev	CCATTAACAGGTCTTCCAAAGTAC
mLEKTI_E1-2_Fw(1)	GAGCAATGCACAGAGCAGTCC
mLEKTI_E1-2_Rev(1)	CTTTCTCACCAGCAGCATCTTGTGT
mMatriptase_E1-2_Fw(1)	ATCGGACCGCCAAAACCATG
mMatriptase_E1-2_Rev(1)	GCCATTCATGTTCTCTAGCCGG
mMatriptase_E3-4_Fw(2)	TCCACAGAGTTTATCAGCCTGGC
mMatriptase_E3-4_Rev(2)	GCCCTCACTGAAGGCAGTTACA
mGAPDH_E2-3_Fw(1)	AAGGTCGGTGTGAACGGATTG
mGAPDH_E2-3_Rev(1)	TGAAGGGGTCGTTGATGGCA
mGAPDH_E2-3_Fw(2)	TCGTCCCGTAGACAAAATGGTGAAG
mGAPDH_E2-3_Rev(2)	AAGGGGTCGTTGATGGCAACA
mHAI-1_E1-E2_Fw(1)	GCAGCCAATCTTCCGTGCAG
mHAI-1_E1-E2_Rev(1)	TTCACAGTGCGAGCCTCCG
mHAI-1_E2-E3_Fw(2)	TTTACCGCTCCTACCGCGAG
mHAI-1_E2-E3_Rev(2)	CTGCCTCGTTCAGTACCAGGG

Tabela 2 Primers desenhados no presente trabalho. Em negrito, as sequências utilizadas para obtenção dos resultados.

6. Análise Fenotípica e SCORAD

Os animais em coorte foram separados de acordo com o sexo e identificados, conforme explicitado anteriormente. Para análise das lesões espontâneas causadas pelos transgenes, os camundongos foram observados e documentados periodicamente, até atingirem um ano de idade, quando foram eutanasiados em câmara de CO₂, em conformidade com o preconizado pelo Comitê de Ética.

A análise fenotípica dos animais e o acompanhamento das lesões espontâneas com o tempo têm caráter bastante subjetivo. Para diminuir o viés causado pela experiência do observador, adaptamos um sistema de quantificação de lesões utilizado por dermatologistas em todo o mundo. Tal sistema foi inicialmente proposto pelo *European Task Force on Atopic Dermatitis* em 1992 e consiste na pontuação de lesões em quesitos como localização, abrangência, severidade e sintomas comportamentais para exame de casos de Dermatite Atópica. Este sistema foi validado e denominado SCORAD (*Scoring for Atopic Dermatitis*).

Neste estudo, adaptamos a escala utilizada em humanos para uso em camundongos. Como todas lesões surgiam na região da cabeça dos animais, e como a análise comportamental em humanos é bastante pessoal (episódios de coceiras, irritabilidade e dificuldades no sono e em situações habituais), nossa quantificação consistiu na análise da severidade das lesões. Para tanto, foram feitas fotografias mensais dos camundongos, iniciando-se ao terceiro mês e progredindo ao décimo segundo mês de vida.

Para cada animal, foram feitas, a cada mês, no mínimo três fotografias: (i) uma do dorso do animal, tirada do topo (Fig 9A); (ii) uma da lateral direita da face (Fig 9B); e (iii) uma frontal, com foco em toda a face do animal (Fig 9C). Em casos específicos, nos quais os observadores notaram lesões em regiões da face não abrangidas nas fotos habituais, outros ângulos foram utilizados de forma a se documentar todas as características de cada indivíduo. Para as fotos, os animais eram anestesiados com administração de Isuflurano (BioChimico, Rio de Janeiro, Brasil) inalatório, em taxa de 3% em O₂. Foi utilizada a câmera *Canon PowerShot S110* (Canon, Tóquio, Japão), e as fotos foram identificadas de acordo com o animal a que se referiam, sendo armazenadas até a análise.

Figura 5 Padrão de documentação fotográfica dos animais em coorte. A cada mês foram feitas: (A) uma do dorso do animal, tirada do topo; (B) uma da lateral direita da face; e (C) uma frontal, com foco em toda a face do animal.

Buscando manter a maior imparcialidade possível na análise, todas as fotos obtidas foram armazenadas e o seu exame foi feito em dia único, pelo mesmo observador. Para tanto, foi necessário que outro pesquisador randomizasse as amostras, gerando um código alfanumérico único para cada animal e desconhecido ao observador inicial. Desta forma a análise foi feita de maneira neutra, uma vez que foi eliminada a possibilidade de identificação dos animais e a possível relação com seu genótipo.

Em cada foto, o observador analisou aspectos como inchaço, vermelhidão e a presença de feridas abertas e/ou cicatrizadas. Foram observadas individualmente as regiões das orelhas, dos olhos e do focinho de cada animal. Cada região recebeu uma pontuação crescente de acordo com a severidade das lesões ali presentes (Figura 12). Ao término do exame, as pontuações foram somadas de maneira simples, utilizando-se a seguinte equação, onde ‘p’ é o valor da pontuação dada pelo observador:

$$SCORAD = pOrelhas + pOlhos + pFocinho$$

Os resultados obtidos foram então agrupados de acordo com o genótipo dos animais, e os dados foram analisados em conformidade com o exposto no item ‘Análise Estatística’.

7. Análise Estatística

Todos testes estatísticos foram feitos utilizando-se o software *GraphPad Prism* v7.04 (GraphPad Software, San Diego, California, EUA, www.graphpad.com). Para análise do SCORAD, foram realizadas análises de variância ANOVA de uma via, com pós-teste de Dunn; para estudos de sobrevivência, foi utilizado teste de Mantel-Cox, e para todos os testes os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. A presença de ambos os transgenes acontece concomitantemente na mesma camada epitelial

Os modelos animais utilizados nas análises *in vivo* foram gentilmente cedidos pelo Dr. Thomas Bugge (NIH/NIDCR, EUA). Foram utilizadas duas linhagens transgênicas de camundongos FVB, machos e fêmeas. Uma linhagem, a K14-HPV, expressa as proteínas E6 e E7 do HPV16 sob o promotor da queratina 14 (Fig. 10A, painel à direita), enquanto animais da linhagem K5-HAI-1 expressam o cDNA de HAI-1 murino sob o promotor da queratina 5 (Fig. 10A, painel à esquerda). Neste estudo, os transgenes foram expressos sempre em estado de hemizigose (+/0).

Para confecção das coortes de camundongos, foram estabelecidos cruzamentos entre animais transgênicos de cada linhagem. Conforme observado em Figura 10 A , o cruzamento entre um indivíduo K5-HAI-1 com um K14-HPV pode gerar filhotes de 4 genótipos distintos: (i) selvagens (WT, Figura 10 B coluna 1); (ii) K5-HAI-1^{+/0} (Figura 10 B coluna 2); (iii) K14-HPV^{+/0} (Figura 10 B coluna 3); ou (iv) K14-HPV^{+/0}/K5-HAI-1^{+/0} (Figura 10 B coluna 4). Não houve predileção por machos ou fêmeas de um certo genótipo, ou seja, parte dos casais possuía machos K14-HPV^{+/0} e fêmeas K5-HAI-1^{+/0}, enquanto na outra a disposição dos genótipos era oposta.

Para mostrar a localização da expressão dos transgenes e validar nosso modelo animal, através da confirmação de que tanto HAI-1 quanto os oncogenes virais, E6 e E7, estavam presentes na mesma população celular, foi feito um ensaio de imunofluorescência da epiderme dos camundongos. Foram utilizados camundongos recém-nascidos, sacrificados no primeiro dia de vida.

Os resultados observados na Figura 10 C-F indicam que a expressão de HAI-1 e dos oncogenes do HPV16 ocorre nas mesmas camadas do epitélio dos animais transgênicos (linhas tracejadas em 10 C-F). A marcação anti-HAI-1 indica que a expressão dessa proteína, sob o promotor da queratina 5, está direcionada à camada basal da epiderme dos camundongos que carregam este transgene (cabeças de seta branca em C, comparar D com C). Como esperado, tal expressão não é observada nas camadas basal e parabasal de camundongos que expressam o transgene K14HPV, mas que não expressam o transgene HAI-1 (cabeças de seta branca em

D, comparar D com C). Como indicado pelas cabeças de seta amarela, na Figura 10 E, a marcação da queratina 14 na camada basal pode direcionar a expressão dos oncogenes virais a esta região do tecido. Na Figura 10 F aprecia-se o controle negativo com a utilização apenas do anticorpo secundário (comparar F com E). Estes resultados, indicando a expressão de ambos transgenes na mesma camada do epitélio, viabilizam a análise da hipótese desse trabalho.

Figura 6 A expressão de ambos os transgenes acontece na mesma camada epitelial – (A) Desenho dos cruzamentos realizados para confecção da coorte, indicando os quatro genótipos possíveis da prole: WT (1), K5-HAI-1 (2), K14-HPV (3) ou K14-HPV;K5-HAI-1 (4) (B) Confirmação, por PCR, dos genótipos citados em A. No gel à esquerda, a positividade para K5-HAI-1 é demonstrada na banda de 110pb (poços 2, 4 e 5), enquanto para K14-HPV, no gel à direita, a banda positiva tem aproximadamente 430pb (poços 3, 4 e 5). A numeração de 1-4 representa, respectivamente: selvagem, K5-HAI-1, K14-HPV e K14HPV; K5-HAI-1. O número 5 é o controle positivo da reação e o número 6, seu controle negativo. (C-F) Marcação por imunofluorescência (IF) de HAI-1 e de queratina 14 (K14) no epitélio. Em C e D observam-se biópsias de pele oriundas de camundongos transgênicos K5-HAI-1 (C) e K14-HPV (D) marcadas com anticorpo anti-HAI-1; cabeças de setas brancas indicam a expressão na camada basal do epitélio, onde há marcação de HAI-1 apenas em camundongos K5-HAI-1. Em E e F, biópsias de pele oriundas de camundongos K14-HPV marcadas com anticorpo anti-K14 (E) ou com utilização do anticorpo secundário apenas (controle negativo, F); em E, cabeças de setas amarelas indicam a marcação da K14 nas células basais do epitélio, região de provável expressão do transgene K14-HPV. Barra: 50 µm. Tracejado: representa a membrana basal

2. A presença concomitante de ambos os transgenes é compatível com o nascimento, desenvolvimento e sobrevida dos animais

Uma vez validado nosso modelo animal, objetivamos analisar, se a presença concomitante de ambos os transgenes é viável, ou seja, se a co-expressão dos mesmos tem influência sobre as diferentes etapas do desenvolvimento dos camundongos. Analisamos aspectos como a herança genética dos casais, o crescimento inicial dos animais e, por fim, a sobrevida de cada grupo.

Inicialmente, observamos se houve alguma perturbação na distribuição dos genótipos para os filhotes que, segundo as leis de Mendel, deveria ser de 25% para cada genótipo. Para tanto, foi feito um estudo retrospectivo de todos animais provenientes dos cruzamentos K5-HAI-1 x K14-HPV e a distribuição genética pode ser observada na figura 11 A. Dos 197 camundongos nascidos entre 03/05/2015 e 02/11/2017, 64 (32,5%) eram selvagens (WT); 51 (25,9%) K5-HAI-1; 43 (21,8%) K14-HPV; e 39 (19,8%) K14-HPV;K5-HAI-1. Apesar da tendência de um menor número de animais carregarem o transgene K14-HPV (seja de forma isolada ou em conjunto com K5-HAI-1), a distribuição observada não diverge estatisticamente daquela prevista de 25% (Teste qui-quadrado, $p=0,06$).

O próximo passo de análise foi o acompanhamento do ganho de peso dos animais durante os seus dois primeiros meses de vida, período no qual acontece a transição do nascimento até a vida adulta do camundongo. Um total de 44 animais foram pesados periodicamente e, conforme podemos observar na Figura 11, não há uma diferença significativa entre o desenvolvimento dos animais dos diferentes grupos. De fato, os camundongos K14-HPV tendem a apresentar menores pesos nas primeiras semanas de vida, mas se equiparam aos demais indivíduos ao final do período de observação. De maneira esperada, machos apresentaram um peso corporal médio maior que as fêmeas (médias de 23,87g x 19,87g, respectivamente). Ainda, ao se comparar os dados obtidos com aqueles disponíveis na literatura, notamos que nossos animais apresentaram um padrão de crescimento condizente com a linhagem FVB a que pertencem (Fig 11 B e 11 C).

Por fim, analisamos a possível influência exercida pelos transgenes sobre as taxas de sobrevida dos camundongos. Conforme exposto na figura 11 D, a presença do transgene K14-HPV, seja de maneira isolada ou em conjunto com K5-HAI-1, causa um número significativo de mortes em relação aos grupos que não expressam os oncogenes do HPV16 (WT e K5-HAI-

1) (Teste Mantel-Cox, $p=0,0002$). A presença de K5-HAI-1, no entanto, parece não modular os efeitos causados pela expressão de K14-HPV, visto que não há diferença significativa entre a sobrevivência destes grupos.

Figura 7 A presença dos transgenes é compatível com o nascimento, o desenvolvimento e a sobrevivência dos camundongos – (A) A análise da distribuição dos genótipos de todos animais ($n=197$) indica que a presença dos transgenes não interfere na herança Mendeliana (25%, em vermelho) (Teste qui-quadrado, $p=0,06$). (B e C) Apesar de animais K14-HPV apresentarem um peso médio inicial ligeiramente inferior aos demais grupos, podemos notar que todos se desenvolvem de maneira similar durante os dois primeiros meses de idade. Como esperado, os machos (B) são mais pesados que as fêmeas (C), e os animais, de maneira geral, se desenvolveram dentro do esperado para a linhagem FVB (linhas tracejadas em verde). (D) A presença do transgene K14-HPV, seja de maneira isolada ou em conjunto com K5-HAI-1, impacta negativamente a sobrevivência dos animais (Teste Mantel-Cox, $p=0,0002$). A presença de K5-HAI-1, no entanto, não causa nenhum efeito nestas taxas observadas.

Desta forma, este conjunto de resultados nos indica que o nascimento, desenvolvimento e sobrevivência dos animais K14-HPV não são alterados pela expressão concomitante de HAI-1. A maior taxa de mortalidade apresentada pelos animais que possuem o transgene K14-HPV era esperada, uma vez que, como veremos na próxima seção, a expressão dos oncogenes do HPV16 nas células basais da epiderme está relacionada ao surgimento de lesões características.

3. A expressão concomitante do transgene de HAI-1 não resgata o fenótipo presente nos camundongos K14-HPV

A presença de HPV está relacionada a alterações fenotípicas, aqui denominadas lesões, como edema, eritema e hiperqueratose, observadas principalmente nas regiões auriculares, periorbitais e nasais (Figura 12).

Com o objetivo de testar a hipótese de que a expressão concomitante do inibidor HAI-1 pudesse modular o fenótipo presente na pele dos camundongos K14-HPV, desenvolvemos uma metodologia de análise quantitativa das lesões apresentadas, com base no método SCORAD, amplamente utilizados por dermatologistas e discutido na seção de Material e Métodos. Conforme observado na Figura 12, as lesões nas orelhas (A, variação de 0 a 7), ao redor dos olhos (B, variação de 0 a 6) e no focinho (C, variação de 0 a 6) variam em termos de intensidade: quanto mais severa a lesão, maior a pontuação dada.

Para estudo de coorte, animais *littermate* dos quatro genótipos (n=60 no total, sendo: n=21 WT, n=16 K5-HAI-1, n=10 K14-HPV e n=13 K5HAI-1; K14-HPV) foram separados em grupos e observados periodicamente entre o 3º e 10º meses de vida.

SCORAD - Tabela de Quantificação

Figura 8 Pontuação das lesões observadas – Mediante análise dos animais, as lesões apresentadas nas orelhas (A), ao redor dos olhos (B) e no focinho (C) foram pontuadas de acordo com a severidade e extensão. Estes valores foram então utilizados para a classificação dos animais.

A cada mês, todos animais foram analisados de acordo os valores da Figura 12, e os dados obtidos estão expostos na Figura 13. Os resultados indicam que não há diferença estatisticamente significativa entre o desenvolvimento das lesões em animais K14-HPV e K14-HPV;K5-HAI-1 (Figura 13 E). Isto significa que a expressão de HAI-1 não exerceu efeito protetivo sobre as lesões características causadas por K14-HPV. (Figura 13 E). Em outras palavras, este fenótipo foi observado, em maior ou menor intensidade, em todos os animais que expressavam o transgene K14-HPV, quando da presença ou ausência de inibição da via proteolítica que é orquestrada pela matriptase. Como esperado, animais WT e K5-HAI-1 eram fenotipicamente indistinguíveis entre si (Fig13 A e 13 B).

Figura 9 A presença de K5-HAI-1 não recupera o fenótipo de lesões causadas por K14-HPV – Aos 10 meses de idade, os camundongos K5-HAI-1 e WT são fenotipicamente indistinguíveis entre si (A e B), enquanto camundongos K14-HPV e K14-HPV;K5-HAI-1 apresentam lesões nas orelhas, ao redor dos olhos e no focinho (C e D). Tais lesões se caracterizam como inchaço, vermelhidão e ligeira alopecia nas regiões destacadas, além de áreas de hiperqueratinização. (E) A análise da quantificação das lesões (SCORAD) indica que não há diferença significativa entre as pontuações obtidas pelos animais K14-HPV e K14-HPV;K5-HAI-1, com base em seu fenótipo. (ANOVA de uma via, 0,4164 < p < 0,9998)

Por fim, com o objetivo de testarmos uma possível influência hormonal nas transformações dependentes de HPV, analisamos a progressão das lesões nos grupos K14-HPV e K14-HPV;K5-HAI-1 de acordo com o sexo dos indivíduos. Conforme pode ser observado na Figura 14, machos e fêmeas apresentaram comportamento similar: em ambos os grupos, os machos tiveram uma pontuação média ligeiramente maior que as fêmeas, mas não

estatisticamente significativa (Fig. 14 A e B). A análise de animais do mesmo sexo, mas em diferentes grupos, também indica que não houve diferença no padrão de desenvolvimento das lesões (Fig. 14 C e D).

Desta forma, estes resultados indicam que não existe variação no fenótipo a depender do sexo dos indivíduos, na presença ou ausência de inibição da via proteolítica que é dependente da matriptase.

Figura 10 O desenvolvimento das lesões não é influenciado pelo sexo dos animais – A análise dos dados de SCORAD com base no genótipo e no sexo de cada animal indica que não há variações significativas no desenvolvimento das lesões entre indivíduos machos e fêmeas dos mesmos grupos (A e B), nem entre machos ou fêmeas de grupos distintos (C e D). Em todas os gráficos, as linhas contínuas representam a regressão linear das pontuações médias, enquanto as linhas tracejadas denotam as médias em cada tempo. (ANOVA de duas vias, $0,9672 < p < 0,9999$).

4. Os níveis de RNAm de matriptase e HAI-1 parecem estar semi-quantitativamente inalterados nos camundongos K14-HPV

Motivados pela aparente ausência de efeitos protetivos no fenótipo dependente dos oncogenes do HPV, quando a via proteolítica da matriptase é inibida no camundongo K5-HAI-1; analisamos semi-quantitativamente os níveis de mRNA de matriptase e HAI-1, na pele de camundongos recém-nascidos WT e K14-HPV. Conforme observado na Figura 15, há uma significativa heterogeneidade na expressão de mRNA de matriptase (A) e HAI-1 (B) nos animais dos diferentes grupos, e esta heterogeneidade parece acontecer independentemente do genótipo dos camundongos (comparar A com B). Os controles utilizados foram: (i) amostra de RNA onde não se utilizou a enzima transcriptase reversa (dados não mostrados) como controle negativo da reação; e (ii) oligonucleotídeos que amplificam o cDNA do GAPDH (C) como controle da quantidade de amostra.

Figura 11 Os níveis de RNAm de matriptase e HAI-1 parecem estar semi-quantitativamente inalterados nos camundongos K14-HPV– Análise da expressão de mRNA de matriptase e HAI-1, pela técnica de RT-PCR, na epiderme de camundongos recém-nascidos WT e HPV. Nota-se um certo grau de heterogeneidade na expressão de matriptase (A) e HAI-1 (B) entre os animais de cada grupo, apesar de os níveis de GAPDH (C) estarem similares.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

No presente trabalho, objetivou-se analisar a atividade *in vivo* da via proteolítica da matriptase na modulação do fenótipo causado pela atividade dos oncogenes E6 e E7 do HPV16.

Especificamente, nos propusemos a: (i) validar o modelo animal como instrumento para testar nossa hipótese; (ii) avaliar a modulação do fenótipo dependente do HPV16, através de uma cuidadosa análise de coortes; e (iii) analisar semi-quantitativamente os níveis de mRNA de matriptase e HAI-1 nos camundongos selvagens (WT) e K14-HPV.

O surgimento e a progressão do câncer podem ser considerados processos, muito mais que eventos, uma vez que são necessárias diferentes e sucessivas alterações para que uma célula adquira um comportamento maligno. As alterações moleculares que implicam no surgimento do câncer podem ter cunho genético, isto é, mutações herdadas em genes específicos para o controle celular, ou ainda provir de instabilidades genéticas causadas por agentes ambientais, como o tabagismo, o etilismo e a infecção por certos tipos de vírus, como o HPV (Ramqvist e Dalianis, 2010).

A infecção por HPV é uma questão de saúde pública e responsável por cerca de 90% dos cânceres cervicais, além de figurar entre as principais causas de câncer de cabeça e pescoço (OMS, 2017). O potencial oncogênico dos HPVs de alto risco se dá, principalmente, por sua relação com as células-hospedeiras, visto que para a produção de novas partículas virais é necessária uma modulação no controle da proliferação da célula infectada (Moody e Laimins, 2010). O vírus tem tropismo pelas células da camada basal do epitélio escamoso de mucosas, onde há naturalmente altas taxas de divisão celular para manutenção do tecido. Desta forma, o acúmulo de alterações causadas pelos oncogenes do HPV pode, com o tempo, causar a transformação maligna das células do tecido infectado (Moody e Laimins, 2010).

O uso de modelos animais transgênicos que expressam os oncogenes virais tem grande valor na compreensão das alterações *in vivo* decorrentes da infecção pelo HPV. Diferentes estudos têm abordado os impactos causados por E6 e E7 no surgimento de tumores cervicais e de cabeça e pescoço (Jabbar *et al.*, 2010; Lambert, 2016). De fato, no modelo animal utilizado em nosso estudo, onde a expressão dos oncogenes E6 e E7 do HPV16 está direcionada à camada basal do epitélio pelo promotor da queratina 14 (K14-HPV), notam-se alterações

fenotípicas características como ligeira alopecia, edema e eritema de regiões da pele (Figura 13C), já bem estabelecidas na literatura (Arbeit *et al*, 1994).

Em um estudo feito em 2008, Mendoza-Villanueva e colaboradores analisaram cerca de 20 mil genes para avaliar as diferenças na expressão na pele e no colo uterino de animais que carregavam apenas o oncogene E6, sob o promotor da queratina 14 (K14-HPVE6), em relação às suas contrapartes selvagens. Os resultados deste estudo foram disponibilizados na plataforma GEO (*Gene Expression Omnibus*, NCBI) e, ao analisarmos estes dados, observamos um aumento considerável na expressão de matriptase e prostasina, serino proteases envolvidas em processos carcinogênicos, na pele de camundongos K14-HPVE6 (Figura 7).

Ainda, como apontado por Sun e colaboradores em 2016, a razão entre os níveis da matriptase e seus inibidores pode impactar sobre o comportamento tumoral. Neste contexto, ao analisarmos os dados de Mendoza-Villanueva e colaboradores, notamos que havia um aumento na razão matriptase/inibidores, frente a HAI-1 e HAI-2 de, respectivamente, 1,25x e 4,9x nos animais K14-HPVE6 (Figura 7 B). Entretanto, e por isso colocado na Introdução desta Dissertação, Mendoza-Villanueva e colaboradores utilizaram apenas um pool de 3 animais de cada genótipo, com duplicata técnica. Este resultado, apesar de faltar solidez, em conjunto com a literatura que aponta HAI-1 como fator de prognóstico em carcinoma cervical (altamente relacionando à infecção por HPV) (Nakamura *et al.*, 2010), nos motivou a investigar o real envolvimento da via proteolítica orquestrada pela matriptase na carcinogênese dependente do HPV.

Em um trabalho publicado em 2005, List e colaboradores indicaram que o fenótipo de lesões apresentado por animais que superexpressavam matriptase sob o promotor da queratina 5 (K5-Matriptase) foi totalmente revertido na superexpressão concomitante de HAI-1 (K5-HAI-1), comprovando o efeito protetivo do inibidor frente à protease. Tais resultados corroboram com o exposto por Sun e colaboradores (2006), indicando que uma diminuição na razão matriptase/HAI-1 confere caráter menos agressivo em células de câncer de ovário. Desta forma, denota-se a importância do equilíbrio entre matriptase e seu inibidor HAI-1, o que novamente justifica a abordagem *in vivo* descrita nesta Dissertação.

Esta análise da interação da via proteolítica da matriptase na modulação do fenótipo causado pela atividade dos oncogenes E6 e E7 do HPV16 foi investigada a partir do cruzamento dos animais K5-HAI-1 e K14-HPV. Como resultado destes cruzamentos, obtivemos quatro genótipos: selvagem (WT), K5-HAI-1, K14-HPV e K14-HPV;K5-HAI-1 (Figura 10A). Por

análise de imunofluorescência da pele de animais K5-HAI-1 e K14-HPV, mostramos que ambos os promotores das queratinas 5 e 14 direcionam a expressão dos seus transgenes para as camadas basal e parabasal do epitélio (cabeças de seta brancas e amarelas em 10C e 10E). Validamos, assim, nosso modelo animal.

Uma vez validado o modelo animal, foi necessário avaliar se a expressão concomitante dos transgenes HAI-1 e HPV era compatível com o nascimento, desenvolvimento e sobrevivência dos animais.

A distribuição mendeliana de ambos os transgenes, quando expressos separadamente ou em combinação, estava em acordo com as diretrizes de Harayuma, Cho e Kulkarni (2009) para o uso de animais transgênicos.

Para a análise do desenvolvimento destes camundongos, otimizamos um protocolo de pesagens periódicas do 10º ao 60º dias de vida dos animais. Conforme plotado nos gráficos da Figura 11, os camundongos utilizados neste estudo apresentaram desenvolvimento dentro do padrão apresentado pela linhagem FVB parental (Jackson Laboratories®, EUA) (linha verde tracejada em 11B e 11C). Em outras palavras, nosso modelo animal, que expressa ambos os transgenes de forma concomitante, apresentou um desenvolvimento normal, do nascimento à fase adulta.

Por fim, visto que a expressão dos oncogenes do HPV está associada ao surgimento de um fenótipo característico de lesões (Coussens, Hanahan e Arbeit, 1996; Lambert, 2016), analisamos as taxas de sobrevivência dos animais duplo transgênicos. Os grupos de animais que expressavam apenas o transgene K14-HPV tiveram um maior índice de mortalidade em relação aos animais selvagens (Teste de Mantel-Cox, $p=0,0002$). Este resultado está em acordo com o exposto por Arbeit e colaboradores (1994), que indicam uma menor sobrevivência destes animais (8 – 15 meses), quando comparados aos camundongos selvagens (20 – 30 meses) (Panchenko *et al.*, 2016). A expressão concomitante de K14-HPV e K5-HAI-1 não exerceu efeito protetivo na sobrevivência deste grupo, visto que não há diferença entre a mortalidade dos animais K14-HPV e K14-HPV;K5-HAI-1 (Figura 11D). Com base nestes resultados, indicamos que a presença dos oncogenes virais, de maneira individual ou conjunta com a expressão de HAI-1, diminuiu a sobrevivência destes animais, nos 10 primeiros meses, em 47,8%.

O surgimento de lesões hiperplásicas e displásicas, bem como características fenotípicas macroscópicas como alopecia, hiperqueratose e eritema em animais K14-HPV são bem descritas na literatura (Coussens, Hanahan e Arbeit, 1996; Paiva *et al.*, 2015; Lambert,

2016). Enquanto a análise histológica das lesões provê uma importante métrica dos efeitos causados pelos oncogenes, a observação do fenótipo tem caráter estritamente subjetivo. Nossos resultados apresentam apenas as características fenotípicas, pois o *endpoint* do estudo é de acompanhamento destes animais por 12 meses, já que de acordo com Arbeit e colaboradores (1994), a sobrevida destes animais é de 8 a 15 meses. Até o presente momento, quando finalizo a escrita desta Dissertação, correram-se apenas 10 meses de acompanhamento dos coortes. Assim, não houve tempo hábil para a análise histológica destas lesões.

Para conferir maior imparcialidade e reprodutibilidade às observações fenotípicas do modelo animal, foi necessário que desenvolvêssemos um protocolo de quantificação destas lesões para diminuir o caráter de subjetividade inerente a esta análise. Foi feita a adaptação de uma metodologia, amplamente utilizada por dermatologistas, para a padronização de lesões de dermatite atópica, o SCORAD (*Scoring for Atopic Dermatitis*) (*European Task Force on Atopic Dermatitis*, 1993). Nesta, são analisados três aspectos fundamentais das lesões: (i) a extensão das áreas lesionadas; (ii) a severidade das lesões; e (iii) as perturbações comportamentais decorrentes das mesmas. Como os animais apresentam as lesões nas mesmas regiões, e como a análise comportamental foge do escopo do estudo, nossa adaptação consistiu na análise da severidade das lesões e sua progressão com o tempo.

Animais K14-HPV apresentam lesões bem características como edema, eritema e hiperqueratose das regiões auriculares, periorbitais e nasais (Figura 13C), em congruência com a literatura (Coussens, Hanahan e Arbeit, 1996; Lambert, 2016). A análise e pontuação destas lesões indicou que, no que tange à severidade das mesmas, a expressão concomitante de K5-HAI-1 não foi suficiente para recuperar o fenótipo dos animais K14-HPV. Como esperado, e demonstrado por List e colaboradores (2005), animais WT e K5-HAI-1 são fenotipicamente indistinguíveis entre si (Fig. 13A e 13B).

A ausência de um efeito protetivo de K5-HAI-1 no desenvolvimento das lesões e na sobrevida dos animais K14-HPV descarta a modulação deste fenótipo em resposta à atividade de matriptase que é inibida por HAI-1.

Isto nos motivou a realizar uma análise dos níveis de mRNA de matriptase e HAI-1 na pele de camundongos selvagens e K14-HPV recém-nascidos. Os resultados indicaram um significativo grau de heterogeneidade na expressão destes mRNA entre os animais de cada grupo (Fig. 15A e 15B). Desta forma, não foi possível confirmar os resultados obtidos neste trabalho com aqueles observados por Mendoza-Villanueva e colaboradores (2008). A

validação completa das informações obtidas por bioinformática, e colocadas como informação de *background* na Introdução deste trabalho, só será possível mediante análises quantitativas, como a de PCR em tempo real. Para isso, estamos coletando uma quantidade amostral maior de material. O real entendimento da relação entre matriptase e HPV, no entanto, não pode ser obtido apenas a partir de técnicas que visam a quantificação de mRNA.

Sabe-se que a regulação de diversas proteínas é feita por eventos pós-transcricionais e que impactam diretamente na sua eficácia (Rape, 2017). De fato, como discutido anteriormente, a ativação da própria matriptase é dependente da ação de outras proteínas (Friis *et al.*, 2013). Desta forma, apesar de possuírem um inestimável valor investigativo, os diferentes níveis de mRNA podem não necessariamente se relacionar com a abundância ou escassez de proteínas e o consequente desenvolvimento das lesões nos animais. Ainda, o uso de camundongos recém-nascidos para obtenção de material, utilizado para experimentos de qPCR e western-blot, traz consigo o empecilho de não necessariamente representar uma pele lesionada, visto que, ao primeiro dia de vida, não conseguimos notar diferenças fenotípicas aparentes entre animais selvagens e K14-HPV. Uma resposta que atende a estes critérios será obtida quando forem feitas análises imunohistoquímicas da expressão de matriptase, HAI-1 e outras proteínas associadas na pele dos camundongos adultos (transgênicos e selvagens).

Nossos resultados, ou a ausência deles, nos propuseram uma reflexão acerca da hipótese testada neste trabalho. Inicialmente, levando em consideração o notório efeito protetivo de HAI-1 sobre as lesões dependentes de matriptase, demonstrado por List e colaboradores (2005); associado ao desequilíbrio entre matriptase e seus inibidores em animais K14-HPVE6, proposto por Mendoza-Villanueva e colaboradores (2008), nos propusemos a avaliar a possível modulação de HAI-1 sobre as lesões causadas pelos oncogenes do HPV16. Em outras palavras, poderia a expressão de HAI-1 atenuar, ou até mesmo impedir, a progressão das lesões causadas por E6 e E7? Caso positivo, poderia ser este um indicativo da participação ativa de matriptase na carcinogênese mediada pelo HPV?

No entanto, a não-proteção de K5-HAI-1 no que tange ao desenvolvimento de lesões e sobrevida dos animais K14-HPV pode ter colocado em xeque seu protagonismo (e consequentemente o de matriptase) nesta via carcinogênica.

De fato, ao se observar o desenvolvimento das alterações fenotípicas com o tempo, nota-se que as lesões apresentam características inflamatórias, como edema e eritema. Além disso, a via proteolítica orquestrada pela matriptase ainda pode sofrer inibição por outras

proteínas, como HAI-2 e LEKTI (Szabo e Bugge, 2011). Seriam as vias dependentes da matriptase, mas inibidas por HAI-2 ou LEKTI, aquelas envolvidas na modulação deste fenótipo? Como mostrado por Sales e colaboradores (2015), a indução de HAI-2 em modelos animais de carcinogênese mediada pela matriptase, parcialmente resgata a formação tumoral e, nos casos em que a formação tumoral acontece, esta é acompanhada por diminuição no recrutamento de células inflamatórias para o estroma tumoral.

Ainda, trabalhos como o de Kataoka e colaboradores (2000) demonstram que há uma regulação positiva na expressão de HAI-1 ancorado à membrana, e sua subsequente clivagem e liberação, em resposta a estímulos inflamatórios. Tais processos poderiam justificar o aumento, na expressão de matriptase e HAI-1 em tecidos de camundongos K14-HPV, como consequência dos oncogenes E6 e E7. Assim, níveis aumentados de matriptase e HAI-1, nestes animais K14-HPV, poderiam ser consequência, e não um evento modulador, do fenótipo dependente das oncoproteínas virais E6 e E7.

Finalmente, como resultado deste trabalho, pensamos em três possibilidades no que diz respeito à atividade proteolítica da matriptase envolvida na modulação fenotípica dos camundongos K14-HPV (contendo os oncogenes E6 e E7): (i) outras vias, que não aquelas inibidas por HAI-1, estariam contribuindo para este fenótipo; (ii) a atividade de E7 seria mais robusta do que aquela elicitada por E6, e contribuiria para este fenótipo independentemente da atividade de matriptase; e (iii) o aumento de matriptase e HAI-1 seria a consequência, e não o evento modulador, do fenótipo encontrado nestes camundongos K14-HPV.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho nos permitem concluir que:

- A expressão concomitante dos transgenes de HAI-1 e HPV na camada basal do epitélio é viável e compatível com o desenvolvimento dos animais;
- A diminuição na sobrevida dos animais duplo transgênicos (K14-HPV; K5-HAI-1), nos 10 primeiros meses, foi de 53,8% e não diferiu daquela dos animais K14-HPV (50%).
- A inibição da via proteolítica orquestrada pela matriptase, através da expressão de HAI-1, não modula o fenótipo causado pelos oncogenes E6 e E7 do HPV16;
- Os níveis de mRNA de matriptase e HAI-1 parecem não estar alterados nos camundongos K14-HPV, em análise preliminar e semi-quantitativa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

5. ABDALLA, G. K. *et al.* Analysis of Knowledge Level in Brazilian Students about Human Papillomavirus Infection and Development of Penile Cancer. **Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP**, v. 18, n. 5, p. 1371–1376, 2017.
6. ABOUNADER, R. *et al.* In vivo targeting of SF/HGF and c-met expression via U1snRNA/ribozymes inhibits glioma growth and angiogenesis and promotes apoptosis. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 16, n. 1, p. 108–110, 2002.
7. ALEXANDROV, L. B. *et al.* Signatures of mutational processes in human cancer. **Nature**, v. 500, n. 7463, p. 415–421, 2013.
8. ALEXANDROV, L. B. *et al.* Mutational signatures associated with tobacco smoking in human cancer. **Science**, v. 354, n. 6312, p. 618–622, 2016.
9. ARBEIT, J. M. *et al.* Progressive squamous epithelial neoplasia in K14-human papillomavirus type 16 transgenic mice. **Journal of virology**, v. 68, n. 7, p. 4358–68, 1994.
10. AUDISIO, R. A. *et al.* Critical Reviews in Oncology / Hematology Public health value of universal HPV vaccination. v. 97, p. 157–167, 2016.
11. BABA, T. *et al.* Loss of membrane-bound serine protease inhibitor HAI-1 induces oral squamous cell carcinoma cells' invasiveness. **Journal of Pathology**, v. 228, n. 2, p. 181–192, 2012.
12. BAERISWYL, V.; CHRISTOFORI, G. The angiogenic switch in tumorigenesis. **Tumor Angiogenesis: Basic Mechanisms and Cancer Therapy**, v. 19, p. 67–88, 2008.
13. BAKER, C. C. *et al.* Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. **Journal of Virology**, v. 61, n. 4, p. 962–971, 1987.
14. BASTIANS, H. *et al.* Cell cycle-regulated proteolysis of mitotic target proteins. **Mol Biol Cell**, v. 10, n. 11, p. 3927–3941, 1999.
15. BEHJATI, S. *et al.* Mutational signatures of ionizing radiation in second malignancies. **Nature Communications**, v. 7, p. 12605, 2016.
16. BENAUD, C.; DICKSON, R. B.; LIN, C. Y. Regulation of the activity of matriptase on epithelial cell surfaces by a blood-derived factor. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 5, p. 1439–1447, 2001.
17. BERGSBAKEN, T.; FINK, S. L.; COOKSON, B. T. NIH Public Access. **Nature reviews. Microbiology**, v. 7, n. 2, p. 99–109, 2010.
18. BERMAN, T. A.; SCHILLER, J. T. Human papillomavirus in cervical cancer and oropharyngeal cancer: One cause, two diseases. **Cancer**, v. 123, n. 12, p. 2219–2229, 2017.
19. BOCHEVA, G. *et al.* Role of Matriptase and Proteinase-Activated Receptor-2 in Nonmelanoma Skin Cancer. v. 129, 2009.
20. BRAY, F. *et al.* Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): A population-based study. **The Lancet Oncology**, v. 13, n. 8, p. 790–801, 2012.
21. BRAY, F. *et al.* Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. **International Journal of Cancer**, v. 132, n. 5, p. 1133–1145, 2013.
22. BRENNAN, P.; HAINAUT, P.; BOFFETTA, P. Genetics of lung-cancer susceptibility. **The Lancet Oncology**, v. 12, n. 4, p. 399–408, 2011.
23. BUHRMAN, G. *et al.* Allosteric modulation of Ras positions Q61 for a direct role in

- catalysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 11, p. 4931–4936, 2010.
24. BURKHART, D. L.; SAGE, J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, n. 9, p. 671–682, 2008.
25. BYCROFT, M. *et al.* The structure of a PKD domain from polycystin-1: Implications for polycystic kidney disease. **EMBO Journal**, v. 18, n. 2, p. 297–305, 1999.
26. CARTWRIGHT, S.; KARAKESISOGLOU, I. Nesprins in health and disease. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 29, p. 169–179, 2014.
27. CHATURVEDI, A. K. *et al.* Worldwide Trends in Incidence Rates for Oral Cavity and Oropharyngeal Cancers. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 36, p. 4550–4559, 2013.
28. CHENG, M. F. *et al.* Expression of matriptase correlates with tumour progression and clinical prognosis in oral squamous cell carcinoma. **Histopathology**, v. 65, n. 1, p. 24–34, 2014.
29. COUSSENS, L. M.; HANAHAHAN, D.; ARBEIT, J. M. Genetic predisposition and parameters of malignant progression in K14- HPV16 transgenic mice. **Am.J.Pathol.**, v. 149, n. 6, p. 1899–1917, 1996.
30. DATTA, S. R. *et al.* Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. **Cell**, v. 91, n. 2, p. 231–241, 1997.
31. DAVIES, H. *et al.* HRDetect is a predictor of BRCA1 and BRCA2 deficiency based on mutational signatures. **Nature Medicine**, v. 23, n. 4, p. 517–525, 2017.
32. DEMERJIAN, M. *et al.* Acute modulations in permeability barrier function regulate epidermal cornification: Role of caspase-14 and the protease-activated receptor type 2. **American Journal of Pathology**, v. 172, n. 1, p. 86–97, 2008.
33. DICK, F. A.; RUBIN, S. M. Molecular mechanisms underlying RB protein function. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 14, n. 5, p. 297–306, 2013.
34. DIMAIO, D.; MATTOON, D. Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. **Oncogene**, v. 20, n. 54 REV. ISS. 7, p. 7866–7873, 2001.
35. DOWNWARD, J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 1, p. 11–22, 2003.
36. DROST, J. *et al.* Use of CRISPR-modified human stem cell organoids to study the origin of mutational signatures in cancer. v. 3130, n. September, 2017.
37. DUYCKAERTS, C.; DELATOUR, B.; POTIER, M. C. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. **Acta Neuropathologica**, v. 118, n. 1, p. 5–36, 2009.
38. EBELT, N. D.; CANTRELL, M. A.; BERG, C. L. VAN DEN. c-Jun N-Terminal Kinases Mediate a Wide Range of Targets in the Metastatic Cascade. **Genes & Cancer**, v. 4, n. 9–10, p. 378–387, 2013.
39. ENGELMAN, J. A.; LUO, J.; CANTLEY, L. C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, n. 8, p. 606–619, 2006.
40. FAN, L. *et al.* Tissue factor enhances protease-activated receptor-2-mediated factor VIIa cell proliferative properties. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 3, n. 5, p. 1056–1063, 2005.
41. FAVALORO, B. *et al.* Role of apoptosis in disease. **Aging**, v. 4, n. 5, p. 330–349, 2012.
42. FORASTIERE, A. *et al.* Head and Neck Cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 26, p. 1890–1900, 2001.
43. FÖRBS, D. *et al.* In vitro inhibition of matriptase prevents invasive growth of cell lines of prostate and colon carcinoma. **International Journal of Oncology**, v. 27, n. 4, p. 1061–1070, 2005.
44. FRANCIS, D. A.; SCHMID, S. I.; HOWLEY, P. M. Repression of the integrated

- papillomavirus E6/E7 promoter is required for growth suppression of cervical cancer cells. **Journal of virology**, v. 74, n. 6, p. 2679–86, 2000.
45. FRIEDL, P.; WOLF, K.; LAMMERDING, J. Nuclear mechanics during cell migration. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 23, n. 1, p. 55–64, 2011.
 46. FRIIS, S. *et al.* A matriptase-prostasin reciprocal zymogen activation complex with unique features: Prostasin as a non-enzymatic co-factor for matriptase activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 26, p. 19028–19039, 2013.
 47. GARNETT, T. O.; DUERKSEN-HUGHES, P. J. Modulation of apoptosis by human papillomavirus (HPV) oncoproteins. **Archives of Virology**, v. 151, n. 12, p. 2321–2335, 2006.
 48. GLAZER, C. A. *et al.* Applying the molecular biology and epigenetics of head and neck cancer in everyday clinical practice. **Oral Oncology**, v. 45, n. 4–5, p. 440–446, 2009.
 49. GOODWIN, E. C.; DIMAIO, D. Repression of human papillomavirus oncogenes in HeLa cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 23, p. 12513–8, 2000.
 50. HA, P. P. K. *et al.* Molecular techniques and genetic alterations in head and neck cancer. **Oral Oncology**, v. 45, n. 4–5, p. 335–339, 2009.
 51. HACHEM, J. P. *et al.* Serine protease signaling of epidermal permeability barrier homeostasis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 126, n. 9, p. 2074–2086, 2006.
 52. HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–74, 2011.
 53. HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000.
 54. HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.
 55. HAUSEN, H. ZUR. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 5, p. 342–350, 2002.
 56. HELT, A.; FUNK, J. O.; GALLOWAY, D. A. Inactivation of both the retinoblastoma tumor suppressor and p21 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is necessary to inhibit cell cycle arrest in human epithelial cells. **Journal of virology**, v. 76, n. 20, p. 10559–68, 2002.
 57. HERBER, R. *et al.* Squamous epithelial hyperplasia and carcinoma in mice transgenic for the human papillomavirus type 16 E7 oncogene. **Journal of virology**, v. 70, n. 3, p. 1873–81, 1996.
 58. HUIBREGTSE, J. M.; SCHEFFNER, M.; HOWLEY, P. M. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. **The EMBO journal**, v. 10, n. 13, p. 4129, 1991.
 59. HUNG, R.-J. *et al.* Assembly of adherens junctions is required for sphingosine 1-phosphate-induced matriptase accumulation and activation at mammary epithelial cell-cell contacts. **AJP: Cell Physiology**, v. 286, n. 5, p. C1159–C1169, 2003.
 60. HUNG, R. J. *et al.* A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25. **Nature**, v. 452, n. 7187, p. 633–637, 2008.
 61. ISERMANN, P.; LAMMERDING, J. Nuclear Mechanics and Mechanotransduction in Health and Disease. **Current Biology**, v. 23, n. 24, p. R1113–R1121, 2013.
 62. ISHIKAWA, T. *et al.* Matrix metalloproteinase-7 induces homotypic tumor cell aggregation via proteolytic cleavage of the membrane-bound Kunitz-type inhibitor HAI-1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 50, p. 20769–20784, 15 dez. 2017.
 63. ISLAM, J. Y. *et al.* Knowledge of cervical cancer and HPV vaccine in Bangladeshi

- women : a population based , cross-sectional study. p. 1–13, 2018.
64. JABBAR, S. *et al.* Human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins act synergistically to cause head and neck cancer in mice. **Virology**, v. 407, n. 1, p. 60–7, 10 nov. 2010.
 65. JANICKE, F. *et al.* Randomized Adjuvant Chemotherapy Trial in High-Risk, Lymph Node-Negative Breast Cancer Patients Identified by Urokinase-Type Plasminogen Activator and Plasminogen Activator Inhibitor Type 1. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 93, n. 12, p. 913–920, 2001.
 66. JASSIM, G.; OBEID, A.; NASHEET, H. A. AL. Knowledge , attitudes , and practices regarding cervical cancer and screening among women visiting primary health care Centres in Bahrain. p. 1–6, 2018.
 67. JEFFERS, J. R. *et al.* Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. **Cancer Cell**, v. 4, n. 4, p. 321–328, 2003.
 68. JEMAL, A. *et al.* Global Cancer Statistics: 2011. **CA Cancer J Clin**, v. 49, n. 61, p. 69–90, 2011.
 69. JEON, S.; ALLEN-HOFFMANN, B. L.; LAMBERT, P. F. Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. **Journal of virology**, v. 69, n. 5, p. 2989–97, 1995.
 70. JHA, P. *et al.* 21st-Century Hazards of Smoking and Benefits of Cessation in the United States. **New England Journal of Medicine**, v. 368, n. 4, p. 341–350, 2013.
 71. JIANG, Y. *et al.* A critical review of cost-effectiveness analyses of vaccinating males against human papillomavirus. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 9, n. 11, p. 2285–2295, 2013.
 72. KATAOKA, H. *et al.* Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 is a specific cell surface binding protein of hepatocyte growth factor activator (HGFA) and regulates HGFA activity in the pericellular microenvironment. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 51, p. 40453–40462, 2000.
 73. KATAOKA, H. *et al.* Hepatocyte growth factor activator inhibitors (HAI-1 and HAI-2): Emerging key players in epithelial integrity and cancer. v. 1, p. 1–14, 2018.
 74. KAWAGUCHI, M. *et al.* Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 maintains the assembly of keratin into desmosomes in keratinocytes by regulating protease-activated receptor 2-dependent p38 signaling. **American Journal of Pathology**, v. 185, n. 6, p. 1610–1623, 2015.
 75. KAWAGUCHI, M.; KATAOKA, H. Mechanisms of hepatocyte growth factor activation in cancer tissues. **Cancers**, v. 6, n. 4, p. 1890–1904, 2014.
 76. KAWAGUCHI, T. *et al.* Purification and cloning of hepatocyte growth factor activator inhibitor type 2, a Kunitz-type serine protease inhibitor. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 44, p. 27558–27564, 1997.
 77. KHETAN, V.; GUPTA, A.; GOPAL, L. Retinoblastoma: Recent trends A mini review based on published literature. **Oman journal of ophthalmology**, v. 4, n. 3, p. 108–15, set. 2011.
 78. KOJIMA, K. *et al.* Roles of functional and structural domains of hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 in the inhibition of matriptase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 5, p. 2478–2487, 2008.
 79. KREIMER, A. R. *et al.* Human Papillomavirus Types in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas Worldwide : A Systematic Review Human Papillomavirus Types in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas Worldwide : A Systematic Review. v. 14, n. February, p. 467–475, 2005.
 80. KUMAR, A. *et al.* Human papillomavirus oncoprotein E6 inactivates the transcriptional coactivator human ADA3. **Molecular and cellular biology**, v. 22, n.

- 16, p. 5801–12, 2002.
81. LAMBERT, P. F. Transgenic Mouse Models of Tumor Virus Action. **Annual Review of Virology**, v. 3, n. 1, p. 473–489, 2016.
82. LECHNER, M. S.; LAIMINS, L. A. Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. **Journal of virology**, v. 68, n. 7, p. 4262–73, 1994.
83. LEVER, E.; SHEER, D. The role of nuclear organization in cancer. **The Journal of pathology**, v. 220, n. September, p. 114–125, 2010.
84. LICHTI, U.; ANDERS, J.; YUSPA, S. H. Isolation and short-term culture of primary keratinocytes, hair follicle populations and dermal cells from newborn mice and keratinocytes from adult mice for in vitro analysis and for grafting to immunodeficient mice. **Nature Protocols**, v. 3, n. 5, p. 799–810, 2008.
85. LIST, K. *et al.* Matriptase/MT-SP1 is required for postnatal survival, epidermal barrier function, hair follicle development, and thymic homeostasis. **Oncogene**, v. 21, n. 23, p. 3765–3779, 2002.
86. LIST, K. *et al.* Deregulated matriptase causes ras -independent multistage carcinogenesis and promotes ras -mediated malignant transformation. **Genes & Development**, v. 19, p. 1934–1950, 2005.
87. LIU, Y. *et al.* Multiple functions of human papillomavirus type 16 E6 contribute to the immortalization of mammary epithelial cells. **J Virol**, v. 73, n. 9, p. 7297–7307, 1999.
88. LOOK, M. P. *et al.* Pooled Analysis of Prognostic Impact of Urokinase-Type Plasminogen Activator and Its Inhibitor PAI-1 in 8377 Breast Cancer Patients. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 94, n. 2, p. 116–128, 2002.
89. LÓPEZ-OTÍN, C.; BOND, J. S. Proteases: Multifunctional enzymes in life and disease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 45, p. 30433–30437, 2008.
90. MAHAPATRA, S. *et al.* Risk of oral cancer associated with gutka and other tobacco products: A hospital-based case-control study. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 11, n. 1, p. 199, 2015.
91. MANNING, B.; CANTLEY, L. AKT/PKB Signalling: Navigating Downstream. **Cell**, v. 129, n. 7, p. 1261–1274, 2007.
92. MANNING, B. D.; TOKER, A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. **Cell**, v. 169, n. 3, p. 381–405, 2017.
93. MARINE, J. C. *et al.* Keeping p53 in check: Essential and synergistic functions of Mdm2 and Mdm4. **Cell Death and Differentiation**, v. 13, n. 6, p. 927–934, 2006.
94. MATSUMOTO, K.; NAKAMURA, T. Cancer Biology and Therapeutics. v. 94, n. 4, p. 321–327, 2003.
95. MAYO, L. D.; DONNER, D. B. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 20, p. 11598–11603, 2001.
96. MAZZONE, M. *et al.* An uncleavable form of pro-scatter factor suppresses tumor growth and dissemination in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 114, n. 10, p. 1418–1432, 2004.
97. MENDOZA-VILLANUEVA, D. *et al.* Gene expression profile of cervical and skin tissues from human papillomavirus type 16 E6 transgenic mice. **BMC cancer**, v. 8, p. 347, 2008.
98. MOLINOLO, A. A. *et al.* Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis. **Oral Oncology**, v. 45, n. 4–5, p. 324–334, 2009.
99. MØLLER, M. B. p27 in Cell Cycle Control and Cancer. **Leukemia & Lymphoma**, v. 39, n. 1–2, p. 19–27, 2000.
100. MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: Pathways to transformation. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 8, p. 550–560, 2010.

101. MOTGI, A. *et al.* Assessment of cytogenic damage in the form of micronuclei in oral epithelial cells in patients using smokeless and smoked form of tobacco and non-tobacco users and its relevance for oral cancer. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 10, n. 1, p. 165, 2014.
102. MÜNGER, K.; HOWLEY, P. M. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. **Virus Research**, v. 89, n. 2, p. 213–228, 2002.
103. MUÑOZ, N. *et al.* Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. **N Engl J Med**, v. 348, p. 518–527, 2003.
104. NAGAIKE, K. *et al.* Defect of hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1/serine protease inhibitor, Kunitz type 1 (Hai-1/Spint1) leads to ichthyosis-like condition and abnormal hair development in mice. **American Journal of Pathology**, v. 173, n. 5, p. 1464–1475, 2008.
105. NAGATA, K. *et al.* Expression of hepatocyte growth factor activator and hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 in human hepatocellular carcinoma. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 289, n. 1, p. 205–11, 2001.
106. NAKAMURA, K. *et al.* Expression of matriptase and clinical outcome of human endometrial cancer. **Anticancer Research**, v. 29, n. 5, p. 1685–1690, 2009.
107. NAKAMURA, K. *et al.* Hepatocyte growth factor activator inhibitor-2 (HAI-2) is a favorable prognosis marker and inhibits cell growth through the apoptotic pathway in cervical cancer. **Annals of Oncology**, v. 20, n. 1, p. 63–70, 2009.
108. NETWORK, C. G. A. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. **Nature**, v. 517, p. 576–582, 2015.
109. NGUYEN, M. L. *et al.* The PDZ Ligand Domain of the Human Papillomavirus Type 16 E6 Protein Is Required for E6's Induction of Epithelial Hyperplasia In Vivo. **v. 77, n. 12, p. 6957–6964, 2003.**
110. OBERST, M. D. *et al.* Expression of the serine protease matriptase and its inhibitor HAI-1 in epithelial ovarian cancer: correlation with clinical outcome and tumor clinicopathological parameters expression of the serine protease matriptase and its inhibitor HAI- 1 in epithel. **Clinical Cancer Research**, v. 8, n. April, p. 1101–1107, 2002.
111. OBERST, M. D. *et al.* The activation of matriptase requires its noncatalytic domains, serine protease domain, and its cognate inhibitor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 29, p. 26773–26779, 2003.
112. OIKONOMOPOULOU, K. *et al.* Kallikrein-mediated cell signalling: targeting proteinase-activated receptors (PARs). **Biological Chemistry**, v. 387, n. 6, p. 817–824, 2006.
113. OLINS, A. L. *et al.* The LINC-less granulocyte nucleus. **European Journal of Cell Biology**, v. 88, n. 4, p. 203–214, 2009.
114. ORTMANN, C. A. *et al.* Effect of Mutation Order on Myeloproliferative Neoplasms. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 7, p. 601–612, 2015.
115. PAIVA, I. *et al.* A role for MicroRNA-155 expression in microenvironment associated to HPV-induced carcinogenesis in K14-HPV16 transgenic mice. **PLoS ONE**, v. 10, n. 1, 2015.
116. PANCHENKO, A. V. *et al.* Biomarkers of aging, life span and spontaneous carcinogenesis in the wild type and HER-2 transgenic FVB/N female mice. **BioGerontology**, v. 17, n. 2, p. 317–324, 2016.
117. PARKIN, D. M. *et al.* Global cancer statistics, 2002. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 55, n. 2, p. 74–108, 2005.
118. PARR, C.; SANDERS, A. J.; JIANG, W. G. Hepatocyte growth factor

- activation inhibitors - therapeutic potential in cancer. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, v. 10, n. 1, p. 47–57, 2010.
119. PEARSON, A. T.; JACKSON, T. L.; NÖR, J. E. Modeling head and neck cancer stem cell-mediated tumorigenesis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 2016.
120. PIRIE, K. *et al.* The 21st century hazards of smoking and benefits of stopping: A prospective study of one million women in the UK. **The Lancet**, v. 381, n. 9861, p. 133–141, 2013.
121. PLUMMER, M. *et al.* Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis. **The Lancet Global Health**, v. 4, n. 9, p. e609–e616, 2016.
122. PYLAYEVA-GUPTA, Y.; GRABOCKA, E.; BAR-SAGI, D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 11, p. 761–774, 2011.
123. RAMQVIST, T.; DALIANIS, T. Oropharyngeal cancer epidemic and human papillomavirus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 11, p. 1671–1677, 2010.
124. RAMQVIST, T. *et al.* An epidemic of oropharyngeal squamous cell carcinoma (OSCC) due to human papillomavirus (HPV) infection and aspects of treatment and prevention. **Anticancer research**, v. 31, n. 5, p. 1515–9, 2011.
125. RAPE, M. Ubiquitylation at the crossroads of development and disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 19, n. 1, p. 59–70, 20 set. 2017.
126. RIEWALD, M.; RUF, W. Orchestration of coagulation protease signaling by tissue factor. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 12, n. 4, p. 149–154, 2002.
127. RILEY, R. R. *et al.* Dissection of Human Papillomavirus E6 and E7 Function in Transgenic Mouse Models of Cervical Carcinogenesis Dissection of Human Papillomavirus E6 and E7 Function in Transgenic Mouse. v. 20, p. 4862–4871, 2003.
128. RIVANDI, M. *et al.* The 9p21 locus: A potential therapeutic target and prognostic marker in breast cancer. **Journal of Cellular Physiology**, n. November, 2018.
129. RØMER, J. *et al.* The receptor for urokinase-type plasminogen activator is expressed by keratinocytes at the leading edge during re-epithelialization of mouse skin wounds. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 102, n. 4, p. 519–522, 1994.
130. ROSEN, F. VON *et al.* STI Knowledge in Berlin Adolescents. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 1, p. 110, 2018.
131. ROTHMEIER, A. S.; RUF, W. Protease-activated receptor 2 signaling in inflammation. **Seminars in Immunopathology**, v. 34, n. 1, p. 133–149, 2012.
132. ROVERSI, F. M.; OLALLA SAAD, S. T.; MACHADO-NETO, J. A. Serine peptidase inhibitor Kunitz type 2 (SPINT2) in cancer development and progression. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 101, n. October 2017, p. 278–286, 2018.
133. RUBIN, S. M. Deciphering the Rb phosphorylation code. **Trends Biochem Sci**, v. 38, n. 1, p. 12–19, 2013.
134. SALEEM, M. *et al.* A novel biomarker for staging human prostate adenocarcinoma: Overexpression of matriptase with concomitant loss of its inhibitor, hepatocyte growth factor activator inhibitor-1. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 15, n. 2, p. 217–227, 2006.
135. SALES, K. U.; FRIIS, S.; KONKEL, J. E.; *et al.* Non-hematopoietic PAR-2 is essential for matriptase-driven pre-malignant progression and potentiation of ras-mediated squamous cell carcinogenesis. **Oncogene**, v. 34, n. 3, p. 1–11, 2014.
136. SALES, K. U.; FRIIS, S.; ABUSLEME, L.; *et al.* Matriptase promotes inflammatory cell accumulation and progression of established epidermal tumors. **Oncogene**, v. 0, n. October, p. 1–9, 2014.
137. SATTERWHITE, C. L. *et al.* Sexually transmitted infections among US women and men: Prevalence and incidence estimates, 2008. **Sexually Transmitted Diseases**,

- v. 40, n. 3, p. 187–193, 2013.
138. SCHEFFNER, M. *et al.* The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. **Cell**, v. 63, n. 6, p. 1129–1136, 1990.
139. SCHEFFNER, M. *et al.* The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. **Cell**, v. 75, n. 3, p. 495–505, 1993.
140. SCHEFFZEK, K. *et al.* -RESEARCH ARTICLES The Ras-RasGAP Complex : Structural Basis for GTPase Its in Activation and Oncogenic Ras Mutants. **Advancement Of Science**, v. 277, n. 5324, p. 333–338, 2010.
141. SCHUBBERT, S.; SHANNON, K.; BOLLAG, G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 4, p. 295–308, 2007.
142. SHAI, A. *et al.* The Human Papillomavirus E6 Oncogene Dysregulates the Cell Cycle and Contributes to Cervical Carcinogenesis through Two Independent Activities. **Cancer**, v. 67, n. 4, p. 1626–1635, 2007.
143. SHARMA, B. *et al.* BRCA1 mutation spectrum, functions, and therapeutic strategies: The story so far. **Current Problems in Cancer**, 2018.
144. SHIMOMURA, T. *et al.* Hepatocyte Growth Factor Activator Inhibitor , a Novel Kunitz-type Serine Protease Inhibitor *. v. 272, n. 10, p. 6370–6376, 1997.
145. SHIN, M. *et al.* NIH Public Access. v. 69, n. 14, p. 5656–5663, 2010.
146. SIDENIUS, N.; BLASI, F. The urokinase plasminogen activator system in cancer: Recent advances and implication for prognosis and therapy. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 22, n. 2–3, p. 205–222, 2003.
147. SONG, S.; PITOT, H. C.; LAMBERT, P. F. The human papillomavirus type 16 E6 gene alone is sufficient to induce carcinomas in transgenic animals. **Journal of virology**, v. 73, n. 7, p. 5887–93, 1999.
148. SOTERIOU, D.; FUCHS, Y. A Matter of Life and Death: Stem Cell Survival in Tumor Formation and Tissue Regeneration. **Nature Reviews Cancer**, v. In press, 2018.
149. STEEG, P. S. Targeting metastasis. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 4, p. 201–218, 2016.
150. STUBENRAUCH, F.; LIM, H. B.; LAIMINS, L. A. Differential Requirements for Conserved E2 Binding Sites in the Life Cycle of Oncogenic Human Papillomavirus Type 31. **JOURNAL OF VIROLOGY**, v. 72, n. 2, p. 1071–1077, 1998.
151. STURGIS, E. M.; CINCIRIPINI, P. M. Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: An emerging epidemic of human papillomavirus-associated cancers? **Cancer**, v. 110, n. 7, p. 1429–1435, 2007.
152. SUN, P. *et al.* Decreasing the ratio of matriptase/HAI-1 by downregulation of matriptase as a potential adjuvant therapy in ovarian cancer. **Molecular Medicine Reports**, v. 14, n. 2, p. 1465–1474, 2016.
153. SUZUKI, M. *et al.* Inhibition of Tumor Invasion by Genomic Down-regulation of Matriptase through Suppression of Activation of Receptor-bound Pro-urokinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 15, p. 14899–14908, 2004.
154. SZABO, R. *et al.* Matriptase inhibition by hepatocyte growth factor activator inhibitor-1 is essential for placental development. **Oncogene**, v. 26, n. 11, p. 1546–1556, 2007.
155. SZABO, R. *et al.* Loss of Matriptase Suppression Underlies Spint1 Mutation-Associated Ichthyosis and Postnatal Lethality. v. 174, n. 6, p. 2015–2022, 2009.
156. SZABO, R. *et al.* c-Met-induced epithelial carcinogenesis is initiated by the serine protease matriptase. **Oncogene**, v. 30, n. 17, p. 2003–2016, 2011.
157. SZABO, R.; BUGGE, T. H. Membrane-Anchored Serine Proteases in Vertebrate Cell and Developmental Biology. **Annual Review of Cell and**

- Developmental Biology**, v. 27, n. 1, p. 213–235, 2011.
158. TAKEUCHI, T. *et al.* Cellular localization of membrane-type serine protease 1 and identification of protease-activated receptor-2 and single-chain urokinase-type plasminogen activator as substrates. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 34, p. 26333–26342, 2000.
 159. TAKEUCHI, T.; SHUMAN, M. A.; CRAIK, C. S. Reverse biochemistry: use of macromolecular protease inhibitors to dissect complex biological processes and identify a membrane-type serine protease in epithelial cancer and normal tissue. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 20, p. 11054–61, 1999.
 160. TALMADGE, J. E.; FIDLER, I. J. AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective. **Cancer Research**, v. 70, n. 14, p. 5649–5669, 2010.
 161. TAYLOR, R. C.; CULLEN, S. P.; MARTIN, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 3, p. 231–241, 2008.
 162. TURK, B. Targeting proteases: Successes, failures and future prospects. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 9, p. 785–799, 2006.
 163. UHLAND, K. Matriptase and its putative role in cancer. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, n. 24, p. 2968–2978, 2006.
 164. VALENTINO, K.; PORONSKY, C. B. Human Papillomavirus Infection and Vaccination. **Journal of Pediatric Nursing**, v. 31, n. 2, p. e155–e166, 2016.
 165. VIGNESWARAN, N.; WILLIAMS, M. Epidemiological Trends in Head and Neck Cancer and Aids in Diagnosis. **Oral Maxillofac Surg Clin North Am.**, v. 26, n. 2, p. 126–141, 2014.
 166. VILLIERS, E. M. DE *et al.* Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17–27, 2004.
 167. VILLUNGER, A. *et al.* p53- and Drug-Induced Apoptotic Responses Mediated by BH3-Only Proteins Puma and Noxa. **Science**, v. 302, n. 5647, p. 1036–1038, 2003.
 168. VOUSDEN, K. H.; LANE, D. P. P53 in Health and Disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 4, p. 275–283, 2007.
 169. WEINBERG, R. A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. **Cell**, v. 81, n. 3, p. 323–330, 1995.
 170. WESTPHAL, D. *et al.* Molecular biology of Bax and Bak activation and action. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1813, n. 4, p. 521–531, 2011.
 171. ZHENG, Q. *et al.* Hepatocyte growth factor activator inhibitor type-1 in cancer: Advances and perspectives (Review). **Molecular Medicine Reports**, v. 10, n. 6, p. 2779–2785, 2014.
 172. ZWERGER, M.; HO, C. Y.; LAMMERDING, J. **Nuclear Mechanics in Disease**. [s.l: s.n.]. v. 13
 173. OMS, 2017 – Fact sheets on cancer – Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
 174. Ministério da Saúde, 2015 – Informe técnico Vacina HPV 2015 – Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/PDF/2015/junho/26/Informe-Tecnico-Vacina-HPV-2015-FINAL.PDF>
 175. INCA, 2018 – Estimativas Câncer 2018 – Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/estimativa-2018.pdf>