VANESCA DE SOUZA LINO

**Efeito da proteína E6 do papilomavírus humano (HPV)
nas Vias de Regulação da Apoptose**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2016

VANESCA DE SOUZA LINO

**Efeito da proteína E6 do papilomavírus humano (HPV)
nas Vias de Regulação da Apoptose**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Enrique Mario Boccardo Pierulivo

Versão original

São Paulo
2016

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Lino, Vanesca de Souza.

Efeito da proteína E6 de *HPV* nas vias de regulação da apoptose /
Vanesca de Souza Lino. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Prof. Dr. Enrique Mario Boccardo Pierulivo.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de
Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de
concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Mecanismos de
transformação pelo *Papilomavírus* Humano.

Versão do título para o inglês: Effect of E6 protein of *HPV* in the
regulation of apoptois.

1. *HPV* 2. Carcinoma de colo uterino 3. Proteína E6 4. Apoptose 5.
Rapamicina 6. Citocinas I. Pierulivo, Prof. Dr. Enrique Mario
Boccardo II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB032/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Vanesca de Souza Lino.

Título da Dissertação: Efeito da proteína E6 de *HPV* nas vias de regulação da apoptose.

Orientador(a): Prof. Dr. Enrique Mario Boccardo Pierulivo.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

(☐) **Aprovado(a)**

(☐) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8406
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº 622/13 referente ao projeto intitulado: "*Efeito da proteína E6 de HPV nas vias de regulação de apoptose*" sob a responsabilidade de **Vanessa de Souza Lino**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº196 de 1996.

São Paulo, 24 de setembro de 2013.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAULO M.A. ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

DEDICATÓRIAS

Em memória à minha mãe Maria e ao meu pai Antonio, que estariam orgulhosos de mais uma das minhas conquistas.

E ao meu querido companheiro Fabrício... Obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

Em especial à meu amigo, namorado e esposo Fabrício, pelo seu amor, carinho, paciência e apoio em todos os momentos. Sem você eu não teria conseguido! Obrigada também a Eliana e Elisete por sempre me ajudarem em tudo na minha vida, vocês são mais que tias, são minhas irmãs.

Ao meu orientador Professor Enrique Boccardo, por ter confiado e me dado oportunidade de ser sua aluna desde a iniciação científica, por me ensinar quase tudo que eu sei. Por ser não só um professor mais também um amigo!

Aos meus colegas/amigos do Laboratório de Oncovirologia: Suellen, Mirian, Bruna, Walason e Aline. Vocês me ensinaram muito sobre a vida e me ajudaram a superar os imprevistos sempre com alegria e persistência. Em especial a Dra. Tatiane que me ensinou muito quando comecei o mestrado.

Ao grupo do HPV, em especial a Dra. Luisa Lina Villa pela oportunidade e toda contribuição intelectual. À Rafaella e Dra. Lara pelo tempo dedicado a me ensinar a técnica da Imunohistoquímica.

A todos os professores, funcionários e colegas do Departamento de Microbiologia.

À CAPES pelo apóio financeiro.

Em memória de meus queridos pais: Maria e Antonio, que me educaram para ser uma pessoa do bem e me ensinaram a lutar pelos meus sonhos.

*"Que nada nos defina. Que nada nos sujeite. Que a liberdade seja a nossa
própria substância." (Simone de Beauvoir)*

RESUMO

LINO, V. **Efeito da proteína E6 de HPV nas Vias de Regulação de Apoptose**. 2016. 105 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A infecção por tipos de HPV de alto risco oncogênico é o principal fator de risco para o desenvolvimento do carcinoma do colo uterino, uma das neoplasias mais frequentes em mulheres de todo o mundo. Este grupo de vírus também está associados a uma proporção importante de outros cânceres anogenitais e de tumores de cabeça e pescoço. Os HPVs de alto risco expressam duas oncoproteínas, E6 e E7, que agem sobre fatores celulares específicos alterando diferentes vias de sinalização. A oncoproteína E6 é capaz de unir-se à proteína supressora de tumor p53, alterar a sua capacidade funcional e promover sua degradação pela via de proteólise dependente de ubiquitina. Mais ainda, a interação da proteína E6 com várias proteínas celulares por exemplo, E6AP, TNFR1, Bak e caspase 8 confere resistência a apoptose; hADA3, p300, CARM1 e SET7 a remodelação da cromatina; NFX1-91 a ativação da telomerase; STAT-1 e TLR-9 a evasão imune, ATR, BCRA1, MCM7, MGMT. XRCC1 a estabilidade genômica; DLG1, MAGI1-3, SCRIBBLE, paxilina e fibulina a perda de polaridade celular e indução de hiperplasia. No entanto, as consequências de muitas dessas interações não têm sido bem estudadas em queratinócitos primários humanos, a célula alvo natural do HPV. No presente estudo analisamos o efeito da proteína E6 de HPV16 (alto risco) e HPV11 (baixo risco) na expressão e na atividade de fatores envolvidos na regulação/execução de apoptose induzida pelas citocinas TNF e TRAIL e pelo quimioterápico Rapamicina. Através de ensaios de proliferação/viabilidade observamos que as células que expressam E6 de ambos os tipos virais apresentam resistência às citocinas e à rapamicina, quando comparadas a culturas controle. Além disso, observamos que as células que expressam E6 apresentam diferenças no padrão de expressão de proteínas envolvidas na regulação das vias extrínseca e intrínseca da apoptose.

Palavras-chave: HPV. Carcinoma de colo uterino. Proteína E6. Apoptose. Rapamicina. Citocinas.

ABSTRACT

LINO, V. **Effect of HPV E6 protein in Apoptosis Regulation pathways**. 2016. 105 p. Master thesis (Microbiology). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

The infection with oncogenic HPV types is the main risk factor for the development of cervical cancer, one of the most common malignancies in women worldwide. This group of viruses is also associated with a significant proportion of other anogenital cancer and head and neck tumor. High-risk HPV express two oncoproteins, E6 and E7, which act on specific cellular factors altering different signaling pathways. For instance E6 oncoprotein is able to bind the p53 tumor suppressor protein and promote its degradation by the ubiquitin dependent proteolysis pathway. Furthermore, the interaction of E6 with various cellular proteins for example, E6AP, TNFR1, caspase 8, Bak and confers resistance to apoptosis; hADA3, p300, and CARM1 SET7 the reshaping of chromatin; NFX1-91 telomerase activation; STAT-1 and TLR-9 immune evasion, ATR, BCRA1, MCM7, MGMT. XRCC1 genomic stability; Dlg1, MAGI1-3, scribble, paxillin and fibulin loss of cell polarity and hyperplasia of induction. In the present study we analyzed the effect of the E6 protein of HPV (high-risk) and HPV11 (low-risk) on the expression and activity of factors involved in the regulation/execution of apoptosis induced by the cytokines TNF and TRAIL and the chemotherapeutic agent Rapamycin. Using proliferation/viability assays we observed that cells expressing E6 from either viral cytokines and Rapamycin when compared with control cells. Besides, we observed that cells expressing E6 exhibit differences in the expression pattern of protein involved in the regulation of apoptosis extrinsic and intrinsic pathways.

Keywords: HPV. Cervical cancer. E6 protein. Apoptosis. Rapamycin. Cytokines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - O genoma do HPV e seu ciclo de vida.....	18
Figura 2 – Alvos celulares da proteína E6 de HPV.....	22
Figura 3 – A modulação da apoptose pela proteína E6 de HPV.....	25
Figura 4 – Esquema para a obtenção de cultura organotípica.....	35
Figura 5 – Descrição das etapas para a retirada do epitélio obtido com o sistema de cultura organotípica.....	36
Figura 6 – A proteína E6 de HPV induz a degradação de p53.....	45
Figura 7 – Efeito da expressão de E6 de HPV16 na expressão de proteínas envolvidas na regulação/execução de apoptose.....	48
Figura 8 - Efeito da expressão de E6 de HPV11 na expressão de proteínas envolvidas na regulação/execução de apoptose.....	50
Figura 9 – Análise do efeito das citocinas TNF e TRAIL na viabilidade de células que expressam E6 de HPV16.....	52
Figura 10 – Análise do efeito das citocinas TNF e TRAIL na viabilidade de células que expressam E6 de HPV11.....	54
Figura 11 – Análise da Rapamicina na viabilidade de células que expressam E6 de HPV16.....	55
Figura 12 – Análise da Rapamicina na viabilidade de células que expressam E6 de HPV11.....	56
Figura 13 - Determinação dos níveis de PCNA em células que expressam o gene E6 de HPV16 e HPV11.....	58
Figura 14 - Determinação dos níveis de TNFR1 em células que expressam o gene E6 de HPV16 e HPV11.....	60
Figura 15 – Determinação dos níveis de FADD em células que expressam o gene E6 de HPV16 e HPV11.....	62
Figura 16 – Determinação dos níveis de DR5 em células que expressam o gene E6 de HPV16 e HPV11.....	64
Figura 17 – Determinação dos níveis de Survivina em células que expressam o gene E6 de HPV16 e HPV11.....	66
Figura 18 – Determinação dos níveis de SMAC/Diablo em células que expressam o gene E6 de HPV16 e HPV11.....	68

Figura 19 – Determinação dos níveis de Caspase 3 Ativa em células que expressam o gene E6 de HPV16 e HPV11	70
Figura 20 – Determinação dos níveis de XIAP em células que expressam o gene E6 de HPV16 e HPV11.....	72
Figura 21 – Estrutura do epitélio estratificado obtido em sistema de cultura organotípica.....	74
Figura 22 – Análise do efeito de TRAIL na estrutura de culturas organotípicas.....	76
Figura 23 – Análise do efeito de TNF+TRAIL na estrutura de culturas organotípicas.....	77
Figura 24 – Análise do efeito da Rapamicina na estrutura de culturas organotípicas.....	78
Figura 25 - Análise do efeito de TRAIL na proliferação de culturas organotípicas.....	80
Figura 26 – Análise do efeito de TNF+TRAIL na proliferação de culturas organotípicas.....	81
Figura 27 – Análise da Rapamicina na proliferação de culturas organotípicas.....	82
Figura 28 – Efeito da expressão do gene E6 de HPV16 na proliferação de culturas organotípicas.....	83
Figura 29 – Efeito da expressão do gene E6 de HPV11 na proliferação de culturas organotípicas.....	83
Figura 30 – Detecção da proteína Caspase 3 Ativa por imunohistoquímica em culturas organotípicas que expressam o gene E6 de HPV16 e HPV11.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Lista de anticorpos primários presentes na membrana de nitrocelulose do *Kit Human Apoptosis Array*38

Tabela 2 – Lista de Anticorpos utilizados nas reações de *Western blot*.....41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIF – Fator de indução de apoptose

APAF-1- *Apoptose protease activating fator 1*

ATR - *Ataxia telangiectasia and Rad3 related*

BdrU - *5-bromo-2-deoxyuridine*

BIR – *Baculoviral IAP repeat*

CARD – Domínio de recrutamento de caspase

CASPASE – *Cysteine-dependent aspartate-specific proteases*

CEC – Carcinoma de células escamosas

DAB - *Diaminobenzina*

DD – *Death domain*

DED – *Death-effector domain*

DISC – *Death-inducing signaling complex*

DNA - *Ácido desoxirribonucleico*

DR5 - *Death receptor 5*

DHR – Dlg região homóloga

FADD – Domínio de morte associado a Fas

FasL – *Fas ligante*

HPV - Papilomavírus humano

NFkB – *Factor nuclear kappa B*

KSFM – *Keratinocyte Serum Free Medium*

HIF1- α – Fator indutível por hipóxia

HSIL – *High Grade Squamous Intra-Epithelial Lesion*

hTERT- *Human telomerase reverse transcriptase*

hADA3 – Homólogo humano de YADA3

IAPs – Proteínas inibidoras de Apoptose

LCR – Região controladora longa

mTOR – *Mammalian target of Rapamycin*

NK – *Natural Killer*

ORF- *Open reading frame*

PARP – *Poli-ADP-ribose polymerase*

PBS – *Phosphate- buffered saline*

PCNA - *Proliferating cell nuclear antigen*

PIKK – *Phosphatidylinositol-3-kinase-related kinase*

PVDF – Polivinilidene difluoreto

QPH - Queratinócitos primários humanos

RNA_m - Ácido ribonucleico mensageiro

SMAC/DIABLO - *Second mitochondria-derived activator of caspases/ Direct IAP-Binding Protein with Low pI.*

TACE – *TNF-alpha-converting enzyme*

TEMED - *Tetramethylethylenediamine*

TNF – *Tumor necrosis factor*

TNFR1 – *Tumor necrosis factor Receptor 1*

TRADD – Domínio de morte associado ao TNF

TRAIL – *TNF-related apoptosis inducing ligand*

TRAF2 – *TNF receptor associated factor 2*

UBA – Domínio de ligação a ubiquitina

XIAP - *X-linked inhibitor of apoptosis*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 O Papilomavírus Humano.....	17
1.2 A proteína E6 de HPV.....	19
1.3 A modulação da apoptose por E6.....	22
1.4 As citocinas TNF e TRAIL e o quimioterápico Rapamicina.....	26
1.4.1 O Fator de Necrose Tumoral (TNF) e o Ligante Indutor de Apoptose relacionado a TNF (TRAIL).....	26
1.4.2 Rapamicina.....	28
2 OBJETIVO.....	31
2.1 Objetivo geral.....	31
2.2 Objetivos específicos.....	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Cultura de células.....	32
3.1.1 Obtenção das partículas retrovirais para a transdução de queratinócitos humanos.....	32
3.2 Preparação da Cultura Organotípica de Queratinócitos.....	34
3.2.1 Preparação do equivalente dérmico.....	34
3.2.1 Montagem da cultura organotípica.....	34
3.3 Tratamentos com as citocinas e com a Rapamicina.....	36
3.4 Obtenção dos Extratos Proteicos.....	37
3.5 Human Apoptosis array.....	37
3.6 Ensaios de Viabilidade Celular.....	38
3.7 Análise da expressão de proteínas reguladoras de apoptose por Western blot.....	39
3.8 Processamento de amostras para Imunohistoquímica.....	41
3.9 Protocolo para Imunohistoquímica.....	42
3.10 Análise de proliferação em culturas organotípicas.....	43
4 RESULTADOS.....	45
4.1 Confirmação indireta da expressão de E6 de HPV em amostras de culturas organotípicas e de culturas em monocamada.....	45
4.2 Determinação dos níveis de proteína envolvidas na regulação/execução da apoptose.....	46

4.3 Análise do efeito de E6 de HPV na viabilidade celular.....	46
4.4 Análise da Expressão Proteica.....	56
4.4.1 Determinação dos níveis de PCNA.....	56
4.4.2 Determinação dos níveis de TNFR1.....	59
4.4.3 Determinação dos níveis de FADD.....	61
4.4.4 Determinação dos níveis de DR5.....	63
4.4.5 Determinação dos níveis de Survivina.....	65
4.4.6 Determinação dos níveis de SMAC/Diablo.....	67
4.4.7 Determinação dos níveis de Caspase 3 Ativa.....	69
4.4.8 Determinação dos níveis de XIAP.....	72
4.5 Efeitos do TNF, TRAIL e da Rapamicina em células que expressam o gene E6 de HPV16 e HPV11.....	73
5 DISCUSSÃO.....	86
6 CONCLUSÕES.....	96
REFERÊNCIAS	97

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Papilomavírus Humano

Os Papilomavírus Humanos (HPVs) são vírus de DNA de dupla fita, pertencentes à família *Papillomaviridae*, com um genoma de aproximadamente 8000 pares de nucleotídeos. As partículas virais icosaédricas e não envelopadas possuem diâmetro de 55 a 60 nm e são compostas por 72 capsômeros (MCMURRAY et al., 2001; ZHOU et al., 1996).

O genoma do HPV pode ser dividido em três regiões funcionais: uma região reguladora não codificante, denominada upstream regulation (URR) ou região controladora longa (LCR), que modula a replicação do DNA viral e a transcrição de genes; uma região que contém os genes precoces de HPV (E1, E2, E4, E5, E6 e E7), que codificam proteínas para proteínas envolvidas na replicação, transcrição viral e na regulação da proliferação celular e por último uma região tardia composta de dois genes, L1 e L2, que codificam para a proteína principal e a proteína secundária do capsídeo (figura 1A) (MCMURRAY et al., 2001). O ciclo do HPV está intimamente relacionado à diferenciação epitelial. A transmissão do vírus se dá por contato direto com a pele ou mucosa infectada. Os vírus podem penetrar no epitélio através de microabrasões das proteínas do capsídeo viral com receptores específicos da superfície celular. Para estabelecer uma lesão produtiva, estes vírus precisam infectar as células basais dos epitélios escamosos, uma vez que são as únicas que apresentam capacidade proliferativa. Uma vez no interior das células da camada basal do epitélio, o genoma do HPV se estabelece na forma episomal e replica-se simultaneamente com o DNA celular (figura 1B).

De acordo com o local da infecção, os diferentes tipos de HPV podem ser classificados em genitais, não genitais e associados à epidermodisplasia verruciforme (VILLA et al., 1997). Até o momento foram descritos aproximadamente 200 tipos de HPV, dos quais aproximadamente 40 infectam as mucosas do trato anogenital e são classificados como baixo ou alto risco oncogênico de acordo com o tipo de lesão associado à infecção (BOSCH; MUNOZ, 2002, DE VILLIERS, 2001, ZUR HAUSEN, 1996). Os HPVs de baixo risco oncogênico (tipos 6, 11, 42, 43 e 44

entre outros) estão associados a lesões do colo uterino de baixo grau e a verrugas genitais. Por outro lado os HPVs de alto risco oncogênico (tipos 16, 18, 31, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 66 entre outros) estão associados a lesões intraepiteliais de alto grau, carcinomas invasivos do colo uterino e a uma porcentagem significativa de carcinomas anais, de vulva, de pênis e de cabeça e pescoço (BOSCH; MUNOZ, 2002, DE VILLIERS, 2001, ZUR HAUSEN, 1996).

Apesar da alta prevalência, a maior parte das infecções não leva ao aparecimento de lesões visíveis, podendo ser eliminadas pelo sistema imune em um curto período de tempo (IARC WORKING GROUP, 2009). No entanto, em um pequeno número de mulheres estas infecções virais não são eliminadas, podendo permanecer por anos. A infecção persistente por HPV de alto risco oncogênico é considerada o principal fator de risco para o desenvolvimento de lesões precursoras de carcinoma de colo uterino (SCHLECHT et al., 2001).

Figura 1 - O genoma do HPV e o seu ciclo de vida. Representação esquemática do genoma do HPV e suas regiões funcionais: região controladora longa (LCR) e as ORFs que codificam as diferentes proteínas virais (precoces e tardias) (a). O ciclo de vida do HPV. Através de microlesões o HPV é capaz de infectar células da camada basal do epitélio. Ao migrar para as camadas subbasais, os genes virais são ativados, o DNA do vírus é replicado e as proteínas do capsômero são sintetizadas. As partículas virais formadas são liberadas na superfície da mucosa onde podem infectar outras células. (Adaptado de ZUR HAUSEN et al., 2002)

No Brasil, o câncer do colo do útero é o terceiro mais frequente na população feminina, atrás do câncer de mama e do câncer colorretal, e é a quarta causa de morte em mulheres por câncer (Instituto Nacional do Câncer, 2015). A estimativa para neste ano (2016), é de 16.340 novos casos de câncer cervical (Instituto Nacional do Câncer, 2015). Os tipos de tumores de cérvix uterina estão divididos

em carcinomas de células escamosas (CEC, 70% dos casos), adenocarcinomas (25% dos casos) e carcinomas de células adenoescamosas (3 a 5% dos casos) (Instituto Nacional do Câncer, 2014).

O HPV16 é o tipo mais prevalente sendo encontrado em aproximadamente 3% a 5% das mulheres infectadas com citologia normal (BAUER et al., 1991; VAN DEN BRULE et al., 1990). Além disso, este tipo viral é encontrado em 50% de todos os cânceres de colo uterino e lesões intraepiteliais de baixo alto grau (BOSCH et al., 1995; KULASINGAM et al., 2002) e em 25 % das lesões intraepiteliais de baixo grau (ALTS-GROUP, 2000).

A infecção por HPV de alto risco é um fator necessário, mas não suficiente, para o desenvolvimento do câncer. Fatores ligados à imunidade, genética, hormônios, comportamento sexual, entre outros, parecem influenciar os mecanismos, ainda incertos, que determinam a regressão ou a persistência da infecção pelo HPV, além da progressão para lesões precursoras e ao câncer. Normalmente, muitos anos transcorrem desde a infecção inicial até o aparecimento do câncer invasivo.

1.2 A proteína E6 de HPV

A proteína E6 é composta por 150 aminoácidos e apresenta 4 motivos Cys-X-X-Cys que formam 2 dedos de zinco. Estes domínios estruturais são fundamentais para a atividade de E6 e têm sido relacionados a diversas funções como ativação transcricional, interação com fatores celulares, imortalização e transformação celular (CROOK et al., 1991, LECHNER et al., 1992).

A proteína E6 é uma das duas oncoproteínas codificadas pelos HPVs de alto e baixo risco oncogênico. Esta proteína é capaz de alterar a atividade de diversos fatores celulares através de mecanismos diretos e indiretos. A propriedade mais estudada de E6 é a sua capacidade de interagir com a proteína supressora de tumor p53 e induzir sua degradação via de proteólise dependente de ubiquitina (HUIBREGSTE et al., 1993).

Em condições normais os níveis de p53 são regulados pela E3 ubiquitina-ligase MDM2, que pela sua vez é regulada por p53 estabelecendo um ciclo de feedback negativo. No entanto, a degradação de p53 mediada por MDM2 é inibida durante situações especiais como infecções virais e em outras condições de estresse, permitindo a estabilização dos níveis da proteína, o aumento de seus níveis e a sua subsequente ativação (HUIBREGSTE et al., 1993). Assim, muitos vírus desenvolveram mecanismos para evitar que a célula hospedeira entre em apoptose e garantir a progressão do ciclo viral. Estudos moleculares mostraram que E6 liga-se a p53 e a outra proteína E3 ubiquitina-ligase conhecida como E6AP (HUIBREGSTE et al., 1991). A formação desse complexo resulta na ubiquitinação de p53 e sua subsequente degradação. Isso leva a uma redução da meia vida de p53 de muitas horas para menos de 20 minutos em queratinócitos (HUIBREGSTE et al., 1993).

E6AP é uma ubiquitina-ligase da família E3 de aproximadamente 100 KDa. Esta enzima é codificada pelo gene *UBE3A* e em humanos e está envolvida no direcionamento de proteínas para a degradação via de proteólise dependente de ubiquitina. Normalmente E6AP é incapaz de se ligar a p53 e induzir a sua degradação. No entanto, E6 se liga ao domínio de reconhecimento de substrato no N-terminal de E6AP e redireciona este fator para se ligar a p53 formando um complexo trimérico. Isto resulta na marcação e posterior degradação da proteína p53 via ubiquitina-proteossoma (HUIBREGSTE et al., 1993; TALIS et al., 1998).

E6 ainda é capaz de induzir a immortalização de células epiteliais de mama (Liu et al., 1999). Um dos possíveis mecanismos envolvidos neste processo inclui a capacidade da oncoproteína E6 de ativar a expressão da subunidade catalítica da telomerase hTERT (KLINGELHUTZ et al., 1996). Através de análises de mutantes de E6 que são incapazes de induzir a degradação de p53 foi possível constatar que a capacidade de E6 de induzir a expressão de hTERT é mais importante para a indução de immortalização que a própria degradação de p53 (VELDMAN et al., 2003).

A proteína E6 de HPV16 também é capaz de interagir com as histonas acetiltransferase p300 (proteína de ligação E1A) e hADA3 (*homólogo humano do YADA3*) e com a proteína CBP (proteína de ligação *CREB*), inibindo a transcrição de

genes responsivos a p53. (WANG et al., 2001). E6 de HPV de alto risco também se liga a oito proteínas PDZ (PSD95, DlgA e ZO-1) também chamadas de proteínas com domínios DHR (*Dlg região homóloga*) sendo elas: hDlg1, hDlg4, hScrib, MUPP1, MAGI1, MAGI2, MAGI3 e PTPN3 através do motivo PBM (Motivo de Ligação PDZ) localizado na extremidade C-terminal (-X-T-X-V) promovendo a sua degradação via proteólise dependente de ubiquitina. (JING et al., 2007; LEE; LAIMINS, 2004). Essa degradação mediada por E6 a proteínas PDZ, leva a perda da polaridade celular e indução de hiperplasia (CHOI et al., 2014).

E6 também interage com a proteína de adesão paxilina e a proteína de matriz extracelular fibulina, impedindo que ocorra anoikis e permitindo o crescimento celular na ausência de ligação a matriz extracelular (DU et al., 2002; JIANG et al., 2014; TONG et al., 1997; WALLACE; GALLOWAY, 2015).

Além das interações descritas acima as oncoproteína E6 de HPV de alto risco oncogênico são capazes de interagir e alterar a função de outras proteínas celulares (figura 3). Dentre estas podemos citar: ERC55, E6-BP, E6TP1, Bak, tuberina, TNFR-1, FADD, caspase-8, MCM7, XRCC1, MGMT, NFX1-91, TLR9, BRCA1, ATR, MAML1, CARM1, SET7, STAT-1 todas elas envolvidas na transdução de sinais, apoptose e regulação da transcrição (HEBNER et al., 2006; HOWIE et al., 2009; WALLACE; GALLOWAY, 2015).

Alvos moleculares da proteína E6 de HPV

Figura 2 – Alvos celulares da proteína E6 de HPV. A proteína E6 altera numerosas vias celulares e interage com proteínas envolvidas na regulação da transcrição gênica, na inibição da apoptose, evasão imune, na ativação da Telomerase, na organização epitelial, diferenciação celular, adesão e manutenção da polaridade celular.

1.3 A Modulação da Apoptose por E6

A apoptose é um processo geneticamente programado de morte celular indispensável para o desenvolvimento normal e para a homeostase de organismos multicelulares (NAGATA et al., 1997). A apoptose é caracterizada por vesiculação da membrana plasmática, condensação e fragmentação de células e núcleos e a degradação do DNA cromossômico em unidades nucleossomais (NAGATA et al., 1997). A apoptose está relacionada com a manutenção da homeostase e com a regulação fisiológica do tamanho dos tecidos, mas, pode também ser causada por um estímulo patológicos, como lesão no DNA celular (GRIVICICH et al., 2007). Na morte celular por apoptose ocorre a eliminação de células que não são mais

necessárias ou potencialmente perigosas devido à ativação de oncogenes, por estímulos como radiação ou infecções virais.

A apoptose ocorre por duas vias distintas: a via intrínseca e a via extrínseca. Na via intrínseca os sinais que podem ativar a apoptose são gerados no interior da célula a partir da detecção de dano no DNA, indução descoordenada do ciclo celular ou perturbações do metabolismo celular. Esta via envolve a mitocôndria e mais especificamente o citocromo c, uma proteína localizada na membrana mitocondrial interna e no espaço inter-membranas (VAN CRUCHTEN et al., 2002). Durante a apoptose desencadeada pela via intrínseca o citocromo c é liberado no citosol e em conjunto com Apaf-1 (*Apoptose protease activating factor 1*) e a procaspase 9, formam um complexo chamado apoptossomo, ativando assim a caspase 9 e promovendo a ativação da caspase 3 e de toda a cascata proteolítica (LI; WANG, 1997). Sinais pró-apoptóticos pode também ser desencadeados externamente desde que os receptores de morte de superfície adequados sejam ativados por ligantes específicos. A via extrínseca é desencadeada pela ativação de receptores da família do receptor do fator de necrose tumoral (TNFR) e incluem o receptor TNF 1 (TNFR1), Fas/CD95 e os receptores do ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL) DR4 e DR5 (GEWIES, 2003).

Um exemplo representativo desta via é a ativação dos receptores com domínios de morte pela ligação a Fas. A ligação de Fas promove o recrutamento de proteínas adaptadoras intracelulares, que recrutam pró-caspases iniciadoras, como a pró-caspase 8 e a pró-caspase 10, formando um complexo de sinalização indutor de morte (DISC, *death-inducing signaling complex*). Uma vez ativadas por DISC, caspases iniciadoras ativam caspases executoras para induzirem a apoptose (VAN CRUCHTEN et al., 2002). Este modelo é chamado tipo I, e sua característica é a forte ligação da caspase 8 que resulta na formação de um complexo DISC “resistente”. No modelo tipo II a formação do DISC é fraca e a amplificação do sinal de morte através da via mitocondrial é necessária para ocorre a apoptose (WANG et al., 2001). Nesse contexto a caspase 8 cliva a proteína pró-apoptótica Bid, provocando despolarização da membrana mitocondrial e liberação do citocromo c e de todos eventos que compõem a cascata proteolítica (WANG et al., 2001).

Muitos vírus, incluindo o HPV desenvolveram várias estratégias para bloquear a apoptose mediada pelo hospedeiro. A capacidade do HPV de persistir no hospedeiro por longos períodos de tempo sem ser eliminado atesta a sofisticação dos seus mecanismos de evasão. Com isso, o HPV é capaz de regular a sobrevivência das células infectadas de modo a facilitar o seu ciclo de vida, assegurando a produção e propagação da sua descendência (HEBNER et al, 2006).

Uma das principais consequências da degradação de p53 mediada por E6 é a inibição de vias de sinalização ativadoras de apoptose que são importantes na eliminação de células infectadas por HPV. Estudos anteriores em camundongos p53^{-/-} mostraram que E6 é capaz de bloquear a apoptose por mecanismos independentes a p53 (LECHNER et al., 1992). Além disso, estudos realizados em diferentes tipos celulares mostram que a expressão de E6 é capaz de inibir a morte por apoptose desencadeada pela ativação tanto da via extrínseca quanto da via intrínseca (GARNETT et al., 2006).

A proteína E6 de HPV16 mostrou-se ligar diretamente ao receptor de morte TNFR1 (*Receptor 1 do Fator de Necrose Tumoral*) e essa interação foi capaz de inibir a associação entre TNFR1 e a molécula adaptadora TRADD (*Domínio de morte associado ao TNF*), bloqueando o TNFR1 ao DD (domínio de morte) (GARNETT et al., 2006; FILLIPOVA et al., 2002). Além da via de TNF, também têm sido demonstrado que E6 de HPV16 é capaz de inibir a apoptose estimulada por Fas e por TRAIL (FILLIPOVA et al., 2004; DUERKSEN-HUGHES et al., 2004; GARNETT et al., 2006). Esta inibição é mediada pela ligação de E6 a Fas e pela degradação via de proteólise dependente de ubiquitina da molécula adaptadora FADD (*Domínio de morte associado a Fas*) e da caspase 8 (FILLIPOVA et al., 2004; DUERKSEN-HUGHES et al., 2004; GARNETT et al., 2006).

Por outro lado, a via intrínseca está envolvida na detecção de sinais apoptóticos de origem intracelular como dano ao DNA, estresse oxidativo, falta de nutrientes ou efeitos causados por agentes quimioterápicos (KAUFMANN; EARNSHAW, 2000; WANG et al., 2001). Nestes casos, as proteínas E6 de HPV de alto risco oncogênico bloqueiam o estímulo pró-apoptótico através de sua interação com a proteína Bak (MAGAL et al., 2005,).

A degradação das proteínas pró-apoptóticas Bak e Bax por E6 de HPV alto risco, se dá através da formação de um complexo entre E6/E6AP Bak ou Bax, e a posterior degradação dessas proteínas via proteólise dependente de ubiquitina. Dessa maneira E6 consegue impedir a liberação de proteínas da membrana mitocondrial interna, tais como o citocromo c, o fator de indução de apoptose (AIF), a endonuclease G, SMAC/Diablo e Htr/Omi para o citosol (THOMAS; BANKS, 1998). Além disso, a proteína E6 também é capaz de induzir a expressão das IAPs (*inhibitors of apoptosis*), bloqueando assim o apoptossomo e as clivagens das caspases executoras (BORBELY et al., 2006) Um esquema simplificado é apresentado na figura 3.

Figura 3 – A modulação da apoptose pela proteína E6 de HPV. A proteína E6 de HPV inibe a apoptose pela sua interação direta com receptores de morte da família do fator de necrose tumoral TNF e também pela degradação de proteínas pró-apoptóticas como a Bax e Bak. E6 também estimula a expressão das IAPs com a c-IAP e a Survivina. (Adaptado de JIANG et al., 2014)

1.4 As citocinas TNF e TRAIL e o quimioterápico Rapamicina

1.4.1 O Fator de Necrose Tumoral (TNF) e o Ligante indutor de apoptose relacionado ao Fator de Necrose Tumoral (TRAIL)

O TNF é uma citocina pró-inflamatória com efeitos pleiotrópicos, que possui importantes funções, tais como a indução de outras citocinas e mediadores lipídicos da inflamação, regulação da proliferação, diferenciação celular e da apoptose (TOGBE et al., 2007). O TNF é uma proteína de 17 KDa, que é induzida por vários estímulos, incluindo micro-organismos, complexos imunes e células tumorais (TRACEY et al., 2008).

Existem três diferentes classes de TNF: o TNF- α , a linfotóxina (LT α) e a linfotóxina (LT β). O TNF- α existe em duas formas, solúvel e ligado à membrana celular. A forma solúvel é liberada das células após clivagem enzimática do seu precursor ligado a membrana. A enzima responsável por esse processo é a *TACE* (*TNF-alpha-converting enzyme*), ambas as formas são biologicamente ativas (TOGBE et al., 2007). As células que expressam na membrana ou secretam o TNF são principalmente os macrófagos, monócitos ativados, linfócitos, mastócitos, granulócitos, fibroblastos, células NK (*Natural Killer*) e células epiteliais (TRACEY et al., 2008).

As atividades biológicas do TNF são mediadas pela sua interação com seus receptores específicos, os quais fazem parte de uma super família de proteínas. O TNF pode exercer seus efeitos pela interação com dois subtipos de receptores (TNFR), que são o TNFR1 (p55 ou CD120a), constitutivamente expresso em todas as células com exceção dos eritrócitos, e o TNFR2 (p75 ou CD120b) que é geralmente induzido e preferencialmente expresso em células endoteliais e hematopoéticas (TRACEY et al., 2008).

Esses receptores são proteínas transmembrânicas tipo I, com um a cinco motivos ricos em cisteína no seu domínio extracelular e também possuem um domínio de morte intracitoplasmático, porém o TNFR2 não possui esse domínio de morte (GUPTA et al., 2002). A interação do TNF com o TNFR levar à ativação do

fator de transcrição NFkB, que controla a expressão de genes de mediadores inflamatórios ou à ativação de uma via de caspases, causando a apoptose (GUPTA et al., 2002). Assim, a sinalização via TNFR1 pode levar a ativação celular ou apoptose, enquanto a sinalização via TNFR2 não leva diretamente a apoptose, mas, pode cooperar com TNFR1 para induzi-la (GUPTA et al., 2002).

O TRAIL é uma proteína transmembranar do tipo II, que pertence à família do TNF. Entre os membros dessa família, TRAIL exibe maior homologia com o ligante de Fas (FasL), o qual também é um ligante indutor de apoptose (PAN et al., 1997). Estudos anteriores mostraram que TRAIL têm uma potente capacidade para desencadear a apoptose numa variedade de linhagens de células tumorais, mas, não em células normais, destacando assim, a sua potencial aplicação terapêutica no tratamento contra o câncer (SCHMALTZ et al., 2002).

Em contraste com outros membros da família do TNF, cuja expressão ao nível de mRNA é estritamente regulada, o mRNA de TRAIL é constitutivamente expresso em uma variedade de tecidos (SCHMALTZ et al., 2002). A ligação de TRAIL aos seus receptores DR4 e DR5 resulta da trimerização dos receptores e no agrupamento do domínio de morte intracelular (DD), levando ao recrutamento da molécula adaptadora FADD e formação do complexo de sinalização DISC e subsequente ligação e ativação das caspases iniciadoras 8 e 10, que promovem a clivagem da caspase efetora 3, que por sua vez leva a clivagem dos substratos de morte (SCHMALTZ et al., 2002).

TRAIL induz a apoptose através da sua interação com seus receptores. Até agora quatro receptores humanos homólogos a TRAIL foram identificados, sendo eles: TRAIL-R1 (DR4), TRAIL-R2 (DR5), os receptores decoy TRAIL-R3 (Dcr1), TRAIL-R4 (Dcr2) e um quinto receptor solúvel chamado de osteoprotegerina (OPC) (EMERY et al., 1998). Os receptores de morte DR4 e DR5 possuem um domínio de morte (DD) bem conservado em sua região intracelular, que é essencial para a ativação da apoptose. Os outros três receptores parecem atuar como receptores decoy, pelas suas capacidades de inibir a apoptose induzida por TRAIL hiper expresso (EMERY et al., 1998).

TRAIL induz apoptose numa variedade de linhagens celulares tumorais independentemente do estado de p53, e portanto, pode ser uma boa estratégia terapêutica, particularmente em células em que a via de reposta de p53 foi inativada (SCHMALTZ et al., 2002).

Algumas das interações entre estas citocinas e o HPV já foram descritas na literatura por diferentes estudos, entre eles, um grupo mostrou que o tratamento com TNF induz parada do ciclo celular em G1 em queratinócitos normais e imortalizados com HPV16 (VIEIRA et al., 1996; VILLA et al., 1992). Mas, este mesmo efeito não foi observado em linhagens imortalizadas por HPV18 ou transformadas por HPV16 ou HPV18 (BOCCARDO et al., 2004). Este mesmo estudo também demonstrou que culturas organotípicas de queratinócitos transduzidos com o genoma completo de HPV18 são resistentes ao efeito antiproliferativo do TNF e que culturas organotípicas transduzidas com o gene E7 apresentam resistência moderada ao TNF (BOCCARDO et al., 2004). Fillipova e colaboradores (2005) mostraram que células U2OS transduzidas com o gene E6 de HPV16 produziram linhagens sensíveis e também resistentes ao efeito antiproliferativo do TNF e que E6 pode tanto sensibilizar as células como pode proteger do TNF, dependendo da quantidade expressa dessa proteína. Um outro estudo com queratinócitos transduzidos com o gene E7 de HPV16 tratados com TNF ou TRAIL, mostrou diminuição da proliferação e da diferenciação nessas células, e que esses tratamentos em combinação com o inibidor de síntese proteica cicloheximida conseguiu induzir apoptose (BASILE et al., 2001).

1.4.2 Rapamicina

A rapamicina também conhecida como Sirolimus, é uma droga que foi descoberta nos anos setenta na ilha de Rapa Nui, produzida pela bactéria de solo *Streptomyces hygroscopicus*. A droga tem capacidade imunossupressora e é também utilizada como agente antifúngico, anti-inflamatório e anti-tumoral (SEGHAL et al., 2003).

A rapamicina normalmente apresenta efeito citostático, induzindo a parada do ciclo celular na fase G1. Em algumas linhagens derivadas de tumores como: neuroblastomas, gliomas, osteosarcoma, carcinomas de mama e próstata, esta droga também pode induzir a apoptose (SEGHAL et al., 2003).

A via de mTOR foi descoberta através de estudos realizados na tentativa de se avaliar e conhecer melhor o mecanismo de ação da Rapamicina (DULONP et al., 2009). A proteína mTOR (*Mammalian target of rapamycin*), é uma serina/treonina quinase, membro da família PIKK (*Phosphoinositide-3-kinase-related kinase*), com tamanho de 300 KDa, que se apresenta em dois complexos distintos, o primeiro mTORC1, está relacionado ao controle de síntese proteica e crescimento celular em resposta a estímulos externos, é também responsável pela indução a autofagia em resposta a inanição, sendo este afetado pela rapamicina (DOWLING et al., 2010) Já mTORC2 está relacionado ao controle da dinâmica do citoesqueleto de actina, está envolvido na regulação da fosforilação e ativação da via de AKT/PKB, e também age como regulador negativo da autofagia, mas, este não é afetado pela rapamicina (DOWLING et al., 2010).

A rapamicina se une intracelularmente a proteína FKBP-12, e esse complexo se liga ao domínio FRB da proteína mTOR (*Mammalian target of rapamycin*), atuando como inibidor da sua via. A inibição da fosforilação dessa proteína pela rapamicina bloqueia a ativação da proteína ribossomal S6K1 e do fator de transcrição 4EBP, isso leva a redução da tradução de mRNAs que codificam componentes essenciais da síntese proteica como: fatores de crescimento e reguladores do ciclo celular, levando as células a uma parada em G1, provocando efeito anti-proliferativo e induzindo a apoptose em diversos tipos de tumores (DULONP et al., 2009).

Em um estudo anterior foi mostrado que a proteína E6 de HPV é capaz de induzir a degradação da proteína TSC-2, um dos reguladores negativos da atividade de mTOR. (LEVINE et al., 2006). Outro grupo mostrou que p53 e p21 podem influenciar a sensibilidade à rapamicina (HORTON et al., 2002). Além disso, outro estudo mostrou que a ativação do gene p53 é capaz de inibir a atividade de mTOR (HORTON et al., 2002). Assim, o fato de E6 de HPV ser capaz de induzir a

degradação de p53 pode permitir não só que a via de mTOR permaneça ativada, mas, também conferir maior sensibilidade das células que a expressam à ação citotóxica da rapamicina.

Os dados descritos acima mostram claramente a interferência da proteína E6 de HPV na resposta a estímulos pró-apoptóticos em diferentes modelos. Essas observações mostram a importância da expressão contínua de E6 durante o ciclo viral e seu papel determinante na transformação celular mediada por HPV. No entanto o efeito de E6 de diferentes tipos de HPV de alto e baixo risco na resistência a apoptose em culturas em monocamada e organotípicas de queratinócitos humanos primários, alvo natural da infecção por HPV, não têm sido satisfatoriamente explorado. No presente estudo analisamos o efeito da proteína E6 de HPV11 (baixo risco oncogênico) e HPV16 (alto risco oncogênico) na expressão de 35 proteínas envolvidas nas vias de regulação/execução da apoptose. Além disso, estudamos os efeitos do Fator de Necrose Tumoral (TNF), do ligante indutor de apoptose associado ao TNF (TRAIL) e do agente quimioterápico Rapamicina na expressão desses fatores e na viabilidade celular.

2 OBJETIVO

2.1 *Objetivo geral*

Analisar e comparar o efeito da oncoproteína E6 de HPV de alto e baixo risco oncogênico nas vias de regulação de apoptose em culturas celulares em monocamada e organotípicas.

2.2 *Objetivos específicos*

Em culturas de queratinócitos que expressam a proteína E6 de HPV de alto ou baixo risco oncogênico:

- Avaliar a expressão de fatores envolvidos na regulação/execução de apoptose.
- Avaliar o efeito da oncoproteína viral na resposta a citocinas (TNF e TRAIL) e o agente quimioterápico (rapamicina) através da análise da viabilidade/proliferação celular e dos níveis de apoptose.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultura de células

No presente estudo foram utilizados queratinócitos primários humanos (QPH) obtidos à partir de prepúcio de recém-nascidos e disponíveis comercialmente (#cc-2507, Lonza, Basel, Switzerland). Os QPHs foram cultivados em meio KSFM (*Keratinocyte Serum Free Medium*, Life Technologies®, USA) e suplementados com fator de crescimento epidérmico (5 ng/ml) e extrato de pituitária bovina (50 µg/ml), mantido em estufa úmida à 37 °C com atmosfera de 5% CO₂. As células das linhagens Bosc23 (derivada de células 293) (ATCC® CCL-11270™), J2 (fibroblastos de camundongo derivados de NIH3T3) e AM12 (fibroblastos de camundongo derivados de NIH 3T3) foram cultivadas em meio DMEM (Gibco, Thermo Fischer Scientific, Life Technologies®, USA), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (Cultilab, Campinas, Brazil) e incubadas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂.

3.1.1 Obtenção de partículas retrovirais para a transdução de queratinócitos humanos.

Os vetores retrovirais pLXSN e pLXSN16 E6, contendo o gene E6 de HPV16 (GEWIN; GALLOWAY, 2001) foram gentilmente cedidos pela Dra. Denise Galloway (Human Biology Division and Public Health Sciences at Fred Hutchinson Cancer Research Center in Seattle, WA, U.S.A.). Já os vetores (pBabe e pBabe11 E6) contendo o gene E6 de HPV11 (GUESS; MCCANCE, 2005) foram cedidos pelo Dr. Dennis McCance (Center for Cancer Research na Cell Biology, Queen's University, England) e estão devidamente caracterizados (GUESS; MCCANCE, 2005).

Os plasmídeos recebidos em papel filtro foram crescidos em bactérias competentes DH5-α e inoculados em tubos de cultura contendo meio LB suplementados com o antibiótico de seleção. As bactérias foram incubadas a 37 °C sob agitação por 24 horas e os plasmídeos foram purificados utilizando o *PureYield™ Plasmid Midiprep System* (Promega, Madison, WI), conforme instruções do fabricante.

Para a obtenção de queratinócitos que expressam os vetores retrovirais contendo os oncogenes E6 de HPV16 e HPV11, os plasmídeos foram introduzidos em células da linhagem ecotrófica Bosc23 (ATCC® CCL-11270) por eletroporação. Em seguida, as células foram transferidas para placas de Petri de 100 mm com 7 ml de meio DMEM (Gibco, Thermo Fischer Scientific, Life Technologies®, USA) com 10% de Soro Fetal Bovino (D10) e incubadas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂.

Após 48 horas, 5 ml do sobrenadante das células Bosc23 foi aspirado com uma seringa e acoplada a um filtro de 0,45 µm e gotejado na linhagem anfitriã de fibroblastos de camundongo Am12 (Markowitz, 1988), mantidas em cultura em placas de Petri de 100 mm em uma confluência de 20%. Em seguida foram adicionados 10 µL/ml de polibreno (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), que minimiza a repulsão eletrostática entre a membrana celular e o envelope viral. Após 8 horas foram adicionados 10 ml de D10 fresco. Após 48 horas o meio foi substituído por meio D10 com 500 µg/ml Geneticina (G418, Gibco, Thermo Fischer Scientific, Life Technologies®, USA) ou 2,5 µg/ml de Puomicina (Puromycin Dihydrochloride Gibco®, Life Technologies), para os plasmídeos pLXSN e pBABE, respectivamente.

Após uma semana de seleção, momento em que todas as células controle estavam mortas o sobrenadante das células Am12 foi utilizado para infectar os PHKs que foram mantidos em cultura em placas de Petri de 60 mm em uma confluência de 10% a 15%. Para isso o meio das células Am12 descritas acima foi aspirado com uma seringa de 5 ml e utilizando um filtro de 0,45 µm e gotejado sobre os PHKs. Em seguida foi adicionando 4 µg/ml de polibreno (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) em cada placa. Após 45 minutos da adição do meio D10 com as partículas retrovirais foram acrescidos 5 ml de meio KSFM (*Keratinocyte Serum Free Medium*, Thermo Fischer Scientific, Life Technologies®, USA) para minimizar os efeitos do soro sobre os queratinócitos. Após 4 horas do início da infecção o meio foi substituído por KSFM fresco. Dois dias depois o meio foi aspirado e os queratinócitos foram selecionados com 250 µg/ml de G418 por 48 horas para os vetores pLXSN e 2µg/ml de puomicina por 48 horas para os vetores pBABE. Finalmente, as células foram mantidas em meio KSFM sem antibióticos.

3.2 Preparação da Cultura Organotípica de Queratinócitos

3.2.1 Preparação do equivalente dérmico

As culturas organotípicas foram realizadas conforme descrito anteriormente (CHOW; BROKER, 1997). Culturas de células J2 com 60-70% de confluência foram tripsinizadas. O número de células necessário foi determinado para obter uma concentração final de 1×10^5 células/ 0,75ml de equivalente dérmico (por exemplo, para 7,5 ml de equivalente dérmico são necessárias 1×10^6 células J2). Logo após a centrifugação as células J2 foram ressuspensas em um volume de SFB (Soro Fetal Bovino) igual a 1/20 do volume total de equivalente dérmico a ser preparado (por exemplo, 500 µl de SFB para 10 ml de equivalente dérmico). Paralelamente, em um tubo estéril foram misturados um volume equivalente a 1/10 do volume final de equivalente dérmico a ser preparado de meio Ham's F12 10 X (Thermo Fischer Scientific, Life Technologies® USA), um volume igual de tampão de reconstituição 10 X (2,2% NaHCO_3 , NaOH 0,05 M, HEPES 200 mM) e um volume de colágeno tipo I de cauda de rato (Corning, Discovery Labware, Inc. MA, USA) correspondente a 8/10 do volume total de equivalente dérmico a ser preparado. Em seguida foram adicionadas as células e a suspensão foi misturada por inversão evitando fazer bolhas e transferida para uma placa de 24 poços (0,75 ml/poço). Após a gelificação a temperatura ambiente, por 40 minutos, adicionou-se 1 ml de meio D10 suplementado a cada poço e a placa foi mantida a 37 °C, em atmosfera de 5% de CO_2 até a adição dos queratinócitos.

3.2.2 Montagem da cultura organotípica

Os queratinócitos que receberam os vetores retrovirais foram cultivados conforme descrito acima até atingir uma confluência de 80-90%. Em seguida, foram tripsinizados, contados, ressuspensos em KSFM (2×10^5 células/ml) e colocados sobre o equivalente dérmico em uma densidade de 1×10^5 células/poço em uma placa de 24 poços. Logo após foi adicionado 0,5 ml de meio para cultura organotípica em cada poço e a placa foi colocada a 37 °C e 5% CO_2 . No dia seguinte, o meio foi substituído por 1 ml de meio para cultura organotípica fresco e a

matriz de colágeno de cada poço foi descolada da placa utilizando-se uma espátula. Após quatro horas cada matriz de colágeno, com a superfície coberta por queratinócitos, foi transferida para uma grade de aço colocada em uma placa de Petri de 60 mm. Posteriormente, foram adicionados 5 ml de meio para cultura organotípica por placa e as mesmas foram mantidas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. A cada 48 horas foi realizada uma troca de meio. As culturas foram mantidas na interface meio-ar por 11 dias (incluindo as 72 horas com os tratamentos e as últimas 12 horas na presença de BrdU), no décimo dia foi adicionado ao meio 100 µg/ml BrdU (5-Bromo-2-Deoxyuridine) (Thermo Fischer Scientific, Life Technologies® USA). As etapas necessárias para obter culturas organotípicas que expressem genes transduzidos por retrovírus estão esquematizadas na figura 4 e 5.

Figura 4 – Esquema para a obtenção de cultura organotípica. Cultura organotípica de queratinócitos contendo portadores de genes de HPV16 e HPV11. Fonte: Boccardo (p. 84)²³.

Figura 5 – Descrição das etapas para a retirada do epitélio obtido pelo sistema de cultura organotípica. Após 11 dias em interface meio-ar o epitélio foi separado do equivalente dérmico com auxílio de um bisturi e então devidamente acondicionado para experimentos futuros.

3.3 Tratamentos com as citocinas e com a Rapamicina

Para os ensaios de viabilidade celular em monocamada 5×10^3 células/ poço das linhagens pLXSN (controle de HPV16), pLXSN16 E6 (vetor que expressa o gene E6 de HPV16), pBabe (controle de HPV11) e pBabe11 E6 (vetor que expressa o gene E6 de HPV11) foram semeadas em placas de 96 poços. No dia seguinte o meio KSFM (*Keratinocyte Serum Free Medium*, Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) foi aspirado e substituído por meio fresco com os seguintes tratamentos: 50 ng/μl de TRAIL (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*) (Enzo, Life Sciences, NY, USA); 2 nM de TNF (*Tumor necrosis fator*) (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany), TNF+TRAIL e 100 ng/ml de Rapamicina para cada vetor. Os tratamentos foram mantidos por 60 ou 120 horas.

No caso das culturas organotípicas, após 8 dias na interface meio-ar as culturas organotípicas foram tratadas por 72 horas conforme descrito abaixo:

- 50 ng/ml de TRAIL (Enzo, Life Sciences, NY, USA);
- 2 nM de TNF (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany)
- 2 nM de TNF + 50ng/μl de TRAIL ;
- 100 ng/ml de Rapamicina (Sigma – Aldrich, St. Louis, USA).

3.4 Obtenção de extratos proteicos

Após 11 dias na interface ar-meio (incluindo 72 horas com os tratamentos) as culturas organotípicas foram lavadas com PBS pH 7,4. A camada de células epidérmicas foi separada da matriz de colágeno utilizando pinça e bisturi. Para a obtenção dos extratos proteicos foram adicionados 400 μl de tampão de lise (50 mM HEPES pH 7, 1 mM DTT, 200 mM NaCl, 4 mM EDTA, 10 mM ZnCl₂ e 0,5% de NP-40) na presença de inibidores de proteases (Complete Mini, Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany) onde as culturas organotípicas foram homogeneizadas por maceração. Após centrifugação por 15 minutos a 12.000 RPM por 4 °C, os sobrenadantes foram aspirados e então conservados a – 80 °C. A obtenção de extratos proteicos para o *Kit Human Apoptosis Array* (R&D Systems, Proteome Profiler™, Minneapolis, USA) foi realizada utilizando um tampão de lise incluído no kit conforme instruções do fabricante. A concentração proteica foi determinada pelo método de Bradford para as amostras de *Western blot* e pelo *Kit Pierce® BCA Protein Assay* (Thermo Fischer Scientific, Life Technologies® USA) para as amostras de array.

3.5 Human Apoptosis array

O *Kit Human Apoptosis Array* (R&D Systems, Proteome Profiler™, Minneapolis, USA) apresenta anticorpos específicos para fatores envolvidos na regulação/execução de apoptose fixados em uma membrana de nitrocelulose. Este kit permite detectar simultaneamente a expressão de 35 proteínas relacionadas a este processo.

Os extratos celulares (200 ug/ ml) foram diluídos e incubados na membrana por 24 horas a temperatura de 4 °C. No dia seguinte a membrana foi lavada para remover as proteínas não ligadas. Finalmente a membrana foi incubada com um cocktail de anticorpos de detecção biotinilados conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Lista de anticorpos primários presentes na membrana de nitrocelulose do *Kit Human Apoptosis Array* (R&D Systems, Proteome Profiler™, Minneapolis, USA).

Bad	TRAIL R1/DR4	PON2
Bax	TRAIL R2/DR5	p21/CIP1/CDKN1A
Bcl-2	FADD	p27/Kip1
Bcl-x	Fas/TNFRSF6/CD95	Phospho-p53 (S15)
Pro-Caspase-3	HIF-1 alpha	Phospho-p53 (S46)
Cleaved Caspase-3	HO-1/HMOX1/HSP32	Phospho-p53 (S392)
Catalase	HO-2/HMOX2	Phospho-Rad17 (S635)
cIAP-1	HSP27	SMAC/Diablo
cIAP-2	HSP60	Survivin
Claspín	HSP70	TNF RI/TNFRSF1A
Clusterin	HTRA2/Omi	XIAP
Cytochrome c	Livin	

A detecção dos anticorpos foi realizada seguindo as instruções do fabricante. Após a revelação os filmes foram escaneados e analisados pelo programa de quantificação de imagem ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

3.6 Ensaios de Viabilidade Celular

No primeiro dia foram plaqueadas aproximadamente 5×10^3 células por poço em octuplicata, em placas de 96 poços com as linhagens: pLXSN (controle de HPV16), pLXSN16E6 (vetor que expressa o gene E6 de HPV16), pBABE (controle de HPV11) e pBABE11 E6 (vetor que expressa o gene de E6 de HPV11). No segundo dia o meio foi aspirado e foram colocados os tratamentos diluídos ao meio fresco KSFM (Keratinocyte Serum Free Medium, Life Technologies) conforme descrito anteriormente em tratamentos.

Após 60 e/ou 120 horas foi realizado o ensaio de viabilidade celular mediante medição da redução de Resazurina (Alamar Blue, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), uma substância de cor azul, que é reduzida na presença de células viáveis à resofurina, substância de coloração vermelha. A leitura da placa foi realizada após a adição do reagente, seguindo hora após hora até completar 8 leituras. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 560 nm (cor azul) e 600 nm (cor vermelha) e a viabilidade calculada pela reação 560/600 nm. Os resultados apresentados são representativos de 3 experimentos independentes.

3.7 Análise da expressão de proteínas por Western blot

. As amostras de proteínas foram submetidas a eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida 10% ou 12% utilizando o sistema mini-Protean II Cell (Bio-Rad). Para o preparo de 5 ml do gel de separação de 10 % de acrilamida foram utilizados: 1,97 ml de H₂O Milli-Q, 1,25 ml de *lower buffer* (Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, SDS 0,4%), 1,65 ml de acrilamida-bisacrilamida (29:1) 30%, 100 µl de persulfato de amônio 10% (APS) e 1,5 µl de TEMED (Tretamethylethylenediamine) (Sigma – Aldrich, St. Louis, USA). Na porção superior do gel de separação foi aplicado um gel de *stacking* 4% composto por: 3,6 ml de H₂O Milli-Q, 625 µl de *upper buffer* (Tris-HCl 1,0 M pH 6,8, SDS 0,4%), 665 µl de acrilamida-bisacrilamida (29:1) 30%, 100 µl de APS 10% e 1,5 µl de TEMED (Sigma – Aldrich, St. Louis, USA) para um volume final de 5 mL.

As amostras foram preparadas colocando-se 30 µg de proteína em tampão de amostra v/v (Tris-HCl 240 mM pH 6,8, SDS 0,8%, β-mercaptoetanol 200 mM, glicerol 40% e azul de bromofenol 0,02%), desnaturadas a 95 °C durante 10 minutos e mantidas no gelo por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram aplicadas no gel e submetidas a eletroforese a 80-120 V em tampão de corrida (glicina 192 mM, Tris 25mM, SDS 0,1%). Finalmente as amostras foram eletrotransferidas (Mini Trans-Blot Cell, BIO-RAD) para uma membrana de polivinilidene difluoreto (PVDF) (Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech) a 250 mA em tampão de transferência (glicina 200

mM, Tris 25 mM, metanol 20% v/v (Merck) durante 1h a 4 °C. A transferência foi conferida através da coloração com Ponceau (Sigma – Aldrich, St. Louis, USA) 0,1% em ácido acético 1%. As membranas foram analisadas na presença dos anticorpos específicos descritos na Tabela 2. Inicialmente, as membranas foram bloqueadas com PBS-T (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄, pH 7,4, Tween-20 0,05%) cotendo 5% de leite em pó durante 1 hora. Em seguida, as membranas foram lavadas (2x) durante 3 a 5 minutos com PBS-T e incubadas durante 1 hora na presença de um dos anticorpos específicos descritos acima.

Os anticorpos descritos na Tabela 2 foram diluídos em PBS-T nas concentrações sugeridas pelo fabricante. Posteriormente, as membranas foram lavadas (4x) com PBS-T durante 5 minutos e incubadas durante 1 hora na presença de proteína conjugada à peroxidase (Sigma – Aldrich, St. Louis, USA) diluída 1:5000 em PBS-T. Finalmente, as membranas foram lavadas (4x) com PBS-T e (2x) com TBS (Tris 20 mM pH 7,6, NaCl 137 mM) durante 5 minutos e reveladas utilizando o *Kit Amersham ECL Prime Western Blotting Detection* (GE Healthcare life Sciences, USA).

Os anticorpos descritos na Tabela 2 foram diluídos em PBS-T nas concentrações sugeridas pelo fabricante. Posteriormente, as membranas foram lavadas (4 x) com PBS-T durante 5 minutos e incubadas durante 1 hora na presença de proteín conjugada à peroxidase (Sigma – Aldrich, St. Louis, USA) diluída 1:5000 em PBS-T. Finalmente, as membranas foram lavadas (4 x) com PBS-T e (2 x) com TBS (Tris 20 mM pH 7,6, NaCl 137 mM) durante 5 minutos e reveladas utilizando o *Kit Amersham ECL Prime Western Blotting Detection* (GE Healthcare life Sciences, USA).

Tabela 2. Lista de Anticorpos utilizados nas reações de *Western Blot*.

Anticorpo	Origem	Diluição	Comercializado
Anti-p53	Camundongo	1 / 500	Novocastra Inc
Anti-PCNA	Camundongo	1 / 500	Invitrogen
Anti-Tubulina	Camundongo	1 / 10000	Novocastra Inc
Anti-SMAC/Diablo	Coelho	1 / 3000	Abcam
Anti-DR5	Coelho	1 / 3000	Abcam
Anti-Suivina	Coelho	1 / 5000	Abcam
Anti-TNFR1	Coelho	1 / 1000	Abcam
Anti-Caspase 3	Coelho	1 / 1000	Abcam
Anti-FADD	Coelho	1 / 1000	Abcam
Anti-XIAP	Camundongo	1 / 500	Abcam
Anti-UBE3A	Coelho	1 / 500	Abcam
Anti-BrdU	Camundongo	1 / 800	Invitrogen

3.8 Processamento de amostras para Imunohistoquímica

Após 11 dias na interface meio-ar, incluindo as 72 horas de tratamentos e as 12 últimas horas na presença de BrdU (5-Bromo-2-Deoxyuridine), as culturas organotípicas foram lavadas com PBS pH 7.4 e fixadas por 1 hora em formaldeído a 10% e depois armazenadas em etanol 70% para posterior parafinização. Os tecidos foram então seccionados em cortes de 4 µm e dispostos em lâminas revestidas com silano (Superfrost Plus, Erviegas Instrumental Cirúrgico Ltda, Brasil) que promove melhor aderência do tecido. A coloração com hematoxilina e eosina (HE) foi utilizada para melhor avaliação morfológica do tecido (JUNQUEIRA, 1983).

3.9 Protocolo de Imunohistoquímica

As lâminas com as secções a partir das culturas organotípicas foram desparafinifadas em estufa à 65 °C durante uma hora. Em seguida ocorreu a re-hidratação das lâminas com as seguintes etapas:

- Duas lavagens de xilol por 10 minutos;
- Uma lavagem com etanol 100% por 10 minutos;
- Uma lavagem com etanol 95% por 5 minutos;
- Uma lavagem com etanol 70% por 5 minutos,
- Duas lavagens com água destilada por 5 minutos.

Após as lavagens foi realizada a recuperação antigênica das secções, que foram incubadas por 10 minutos em tampão de citrato de sódio 10 mM (pH 6), à 95 °C no banho-maria. Em seguida foram feitas lavagens (10 passagens) em água destilada. Após essa etapa foi feita a neutralização com *Peroxidade block* (peróxido de hidrogênio a 3-4%) por 5 minutos proveniente do Kit (Novolink™ Polymer DetectionSystems, Leica Biosystems), as lâminas foram enxaguadas em PBS (pH 7,4) duas vezes por 5 minutos. Depois dessa etapa foi feito o bloqueio com *Protein block* (Caseína a 0,4% em soro com tampão fosfato e produtos estabilizadores e surfactantes, bem como Bronidox L a 0,2% como produto conservante), para reduzir a ligação não específica dos anticorpos primários e do polímero. Em seguida foram feitas mais duas lavagens com PBS (pH 7,4) por 5 minutos e logo após a incubação com o anticorpo primário BrDU (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA) (1:800) / Caspase 3 Ativa (Abcam, Cambridge, Reino Unido) (1:1000), que foi diluído na solução diluente de anticorpos proveniente do Kit (Novolink™ Polymer DetectionSystems, Leica Biosystems), após a incubação as lâminas foram colocadas em câmara úmida na geladeira por 24 horas. No dia seguinte, as lâminas foram enxaguadas em PBS (pH 7,4), duas vezes por 5 minutos, e foi colocado por 30 minutos o reagente do bloqueio pós-primário Post Primary (IgG de coelho anti-camundongo), que é utilizado para a detecção de anticorpos anti-camundongo. Houve mais duas lavagens de 5 minutos das lâminas em PBS (pH 7,4) e então a incubação com o Polímero Novo Polymer™ que reconhece as imunoglobulinas de coelho e detecta os anticorpos pós-primários e quaisquer anticorpos de coelho ligados as tecidos. Após a incubação foram feitas duas lavagens com PBS (pH 7,4) por 5 minutos com agitação leve em gangorra. Em seguida as lâminas foram

incubadas com o substrato/cromogéneo 3,3' – diaminobenzina (DAB) e um produto em combinação de DAB (DAB Chromogen com Novolink™ DAB Substrate Buffer), essa reação com a peroxidase produziu um precipitado visível de cor castanha no local do antígeno. As lâminas foram reveladas por 1 minuto e 30 segundos, com a ajuda do microscópio para ver a intensidade da coloração.

Após a revelação as lâminas foram lavadas em água destilada por 5 minutos e foi feita a contra-coloração com Hematoxilina (Hematoxilina Harris, Merck, Darmastald Germany), por 2 minutos. As lâminas foram enxaguadas em água corrente, para posterior desidratação nas seguintes etapas:

- 10 passagens em etanol 70%;
- 10 passagens em etanol 95%;
- 10 passagens em etanol 100%
- 3 passagens em xilol.

Por último foram feitas as montagens das lâminas, utilizando 1 gota de Permount (Fisher Chemical™ Permount™ Mounting Medium, USA) e colocando uma lamínula por cima de cada lâmina. As imagens foram obtidas a partir do microscópio Axio Imager A2 Zeiss com câmera Axio cam MRC Zeiss e software Zen Imaging 2012.

3.10 Análise de proliferação em culturas organotípicas

Após feitas as imunohistoquímicas para anti-BrdU (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, USA), foram realizadas as contagens de todos os núcleos, tanto positivos como negativos para BrdU a partir das lâminas com cortes obtidos através das culturas organotípicas feitas com as células que expressam o gene E6 de HPV16 e HPV11 e seus controles, com e sem os tratamentos já descritos anteriormente. A contagem foi realizada através das imagens obtidas das lâminas a partir do microscópio Axio Imager A2 Zeiss com câmera Axio cam MRC Zeiss e software Zen Imaging 2012, numa média de 30 campos fotografados por lâmina. As imagens dos campos foram analisadas pelo programa ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>) , onde os núcleos positivos para BrdU (corados com marrom) foram contados um a um, e os núcleos negativos para BrdU (corados apenas com a Hematoxilina) também foram contados. Ao final foi feita a porcentagem de núcleos positivos para BrdU (Por exemplo, total de núcleos positivos para BrdU x 100, dividido pelo número total de núcleos).

4 RESULTADOS

4.1 Confirmação indireta da expressão de E6 de HPV em amostras de culturas organotípicas e de culturas em monocamada

Antes de dar início a nossos estudos baseados nas propriedades da proteína E6 de HPV foi necessário confirmar a expressão da mesma nas culturas utilizadas. Uma vez que não existem bons anticorpos contra esta proteína viral e sua expressão foi determinada mediante a análise da expressão de proteína p53, um dos principais alvos celulares de E6 de alto risco oncogênico (HUIBREGSTE et al., 1991). Para isto, foi realizado o ensaio de *Western blot*, para a confirmação da degradação de p53 em extratos proteicos totais das células transduzidas com vetores retrovirais e utilizadas nos diferentes ensaios. O resultado é apresentado na figura 6.

Figura 6 – A proteína E6 de HPV16 induz a degradação de p53. Os níveis de p53 foram determinados por *Western blot* em extratos totais de culturas em monocamada e organotípicas. Foram utilizados 30µg de extratos proteicos totais obtidos a partir de culturas que expressam ou não E6 de HPV16 (A) e HPV11 (B), as proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida e transferidas para uma membrana de PVDF e depois analisadas na presença do anticorpo anti-p53. A reação foi revelada pelo método de quimioluminescência e a quantificação das bandas foi realizada utilizando o programa Image J.

4.2 Determinação dos níveis de proteínas envolvidas na regulação/execução de apoptose

Os níveis de proteínas envolvidas na regulação/execução de apoptose foram determinados a partir de extratos proteicos totais de culturas organotípicas que expressam ou não a proteína E6 de HPV16 ou HPV 11 utilizando o *Kit Human Apoptosis Array* (Proteome Profiler, R&D Systems, Minneapolis, USA) após diferentes tratamentos.

Ao analisarmos as culturas que expressam E6 de HPV16 não observamos diferenças significativas dos níveis das proteínas analisadas quando comparados aos detectados em culturas de células controle (figura 7A). Um resultado semelhante foi observado ao analisarmos extratos proteicos de culturas tratadas com a citocina TRAIL ou o quimioterápico Rapamicina (figura 7B e 7D).

Por outro lado, observamos diferenças nos níveis de expressão dos fatores como pró-caspase 3, FADD e HIF1- α entre outros, em extratos de culturas que foram tratadas simultaneamente com as citocinas TNF e TRAIL. Os resultados apresentados na figura 7C, mostram que existem diferenças nos níveis de expressão de proteínas envolvidas na regulação/execução de apoptose ao comparar células que expressam a proteína E6 de HPV16 (pLXSN16 E6) com células controle após tratamento com TNF e TRAIL. De maneira geral, observamos que as culturas estabelecidas a partir de queratinócitos transduzidos com o vetor vazio pLXSN mostram maior expressão de proteínas pró-apoptóticas quando comparadas às culturas que expressam o gene E6 de HPV16. Nessas culturas observamos o aumento na expressão da proteína Bad, uma proteína pró-apoptótica que está envolvida com a permeabilidade da membrana mitocondrial durante a apoptose. Além disso detectamos níveis aumentados de pró-caspase 3 que está relacionada ao início de apoptose e começo da cascata proteolítica. Também observamos níveis maiores do receptor de morte Fas e da sua molécula adaptadora FADD que estão relacionados com a formação do complexo DISC como parte da via extrínseca de apoptose. Além disso, observamos alterações nos níveis do fator indutível por hipóxia 1-alpha (HIF1- α) cuja hiperexpressão têm sido associada ao desenvolvimento de diferentes tumores e da serina peptidase mitocondrial

HtrA2/Omi que é liberada pela mitocôndria junto com o citocromo c e SMAC/DIABLO durante a apoptose. Interessantemente, detectamos níveis aumentados da proteína XIAP que se liga às caspases 3 e 7 para inibir a apoptose.

A)

B)

C)

D)

Figura 7 – Efeito da expressão de E6 de HPV16 na expressão de proteínas envolvidas na regulação/execução de apoptose. A expressão de 35 proteínas envolvidas na regulação/execução de apoptose foi avaliada em 200ug de extratos proteicos totais obtidos de culturas organotípicas estabelecidas a partir de QPHs transduzidos com o vetor vazio (pLXSN) ou que expressam a proteína E6 de HPV16 (pLXSN16 E6) antes (A) e após tratamento com 50 ng/ml de TRAIL (B), com 50 ng/ml de TRAIL em combinação com 2 nM de TNF (C) e com 100 ng/ml de Rapamicina (D) por 72 horas. O ensaio foi realizado utilizando o *Kit Human Apoptosis Array* (R&D Systems) e os resultados foram analisados utilizando o programa ImageJ. O resultado apresentado é a média de 2 experimentos independentes.

Diferentemente ao observado para células que expressam E6 de HPV16, não observamos alterações significativas entre os níveis das proteínas analisadas ao compararmos culturas que expressam E6 de HPV11 com células controle (figura 8A). Um resultado semelhante foi observado ao analisarmos extratos proteicos de culturas tratadas com a citocina TRAIL (figura 8B). Por outro lado os resultados apresentados na figura 8C, mostram a existência de níveis maiores do receptor de

morte Fas, dos indutores de apoptose, Bad, HtrA2/Omi e SMAC/DIABLO e do inibidor de apoptose XIAP em células que expressam o gene E6 de HPV11 (pBabe11 E6) após tratamento com TNF e TRAIL (figura 8C).

Foi observado também um aumento de expressão da proteína pró-apoptótica Bad em células que expressam E6 de HPV11 após tratamento com a Rapamicina (figura 8D).

A)

B)

C)

D)

Figura 8 – Efeito da expressão de E6 de HPV11 na expressão de proteínas envolvidas na regulação/execução de apoptose. A expressão de 35 proteínas envolvidas na regulação/execução de apoptose foi avaliada em 200µg de extratos proteicos totais obtidos de culturas organotípicas estabelecidas a partir de QPHs transduzidos com o vetor vazio (pBabe) ou que expressam a proteína E6 de HPV11 (pBabe E6) antes (A) e após tratamento com 50 ng/ml de TRAIL (B), com 50 ng/ml de TRAIL em combinação com 2 nM de TNF (C) e com 100 ng/ml de Rapamicina (D). O ensaio foi realizado utilizando o *Kit Human Apoptosis Array* (R&D Systems) e os resultados foram analisados utilizando o programa ImageJ. O resultado apresentado é a média de 2 experimentos independentes.

4.3 Análise do efeito de E6 de HPV na Viabilidade Celular

Os resultados apresentados acima indicam que existem diferenças nos níveis de proteínas envolvidas na regulação da morte celular programada entre as culturas controle e as expressam as proteínas E6 de HPV16 ou HPV11 após

tratamento com citocinas ou rapamicina por 72 horas. Portanto, resolvemos analisar a existência de diferenças no potencial proliferativo entre as células que expressam E6 e as células controle. Assim, para cada condição foram realizados três experimentos independentes com QPHs da mesma passagem, mas, resultantes de infecções diferentes. Cada ensaio foi realizado em octuplicata. Os tratamentos foram realizados nas mesmas condições descritas acima com tempos de 60 e 120 horas.

Para determinar o efeito da expressão de E6 de HPV e dos diferentes tratamentos na viabilidade celular utilizamos o Alamar Blue® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), que é um indicador de viabilidade celular que utiliza o poder redutor natural de células vivas para converter resazurina para uma molécula fluorescente, resofurina (GOEGAN et al., 1995). A resazurina de cor roxa é convertida em resofurina de cor vermelha luminosa e essa reação acontece através da redução por células metabolicamente ativas. Assim, intensidade da cor vermelha é proporcional ao número de células vivas (GOEGAN et al., 1995). Após adição do reagente foram feitas leituras em espectrofotômetro em dois comprimentos de onda, 560nm e 600nm, assim recomendado pelo fabricante. As leituras foram feitas no momento da adição do reagente e depois a cada hora seguinte, com um total de 8 leituras.

Os resultados obtidos apresentados na figura 9, mostram uma redução dos níveis de proliferação/viabilidade entre as células que expressam o vetor pLXSN (vazio) tratadas por 60 e 120 horas com as citocinas TNF, TRAIL e TNF+TRAIL maior do que nas células que expressam o gene E6 de HPV16 (pLXSN16 E6). Este efeito sobre a viabilidade/proliferação celular foi claramente maior após o tratamento com TNF+TRAIL (figura 9C).

A)

B)

C)

Figura 9 – Análise do efeito das citocinas TNF e TRAIL na viabilidade de células que expressam E6 de HPV16. Queratinócitos que expressam E6 de HPV16 foram semeados em placas de 96 poços (5000 células/poço) e após 24 horas foram tratados 2 nM de TNF (A) 50 ng/μl de TRAIL (B) ou com TNF + TRAIL (C). Todos os tratamentos foram realizados em octuplicata. Após 60 ou 120 horas de tratamento foram acrescentados 10 μL de Alamar Blue e sua redução foi monitorada em um espectrofotômetro mediante medição da absorvância a 570 e 600 nm. Os resultados apresentados são representativos de 3 experimentos independentes.

Os resultados descritos acima mostram que células que expressam E6 de HPV16 são mais resistentes ao efeito do TNF e/ou TRAIL do que células controle. Com o intuito de determinar se este efeito responde a uma propriedade geral das proteínas E6 dos diferentes tipos de HPV ou se é uma característica exclusiva de HPV de alto risco oncogênico realizamos ensaios semelhantes em queratinócitos transduzidos com E6 de HPV11, um vírus de baixo risco oncogênico. Os resultados obtidos são apresentados na figura 10. De maneira semelhante ao descrito para E6 de HPV16 observamos que células que expressam E6 de HPV11 são mais resistentes ao efeito individual ou combinado das citocinas TNF ou TRAIL do que células transduzidas com o vetor vazio pBabe (figura 10A-C). Novamente, observamos que o tratamento combinando ambas as citocinas foi o que produziu efeitos mais marcados (figura 10C)

Os dados descritos acima mostram que a expressão de E6 de HPV de alto e baixo risco oncogênico afeta a resposta de queratinócitos a citocinas com conhecido efeito antiproliferativo sobre estas células (VIEIRA et al., 1996). Portanto decidimos analisar o efeito de E6 de HPV na resposta ao agente quimioterápico Rapamicina que também afeta a proliferação de queratinócitos normais, mas, por um mecanismo diferente ao descrito para as citocinas (LEVINE et al., 2006).

Os resultados obtidos analisando células transduzidas com os vetores pLXSN e pLXSN16 E6 são representados na figura 11. Os dados mostram que após 60 e 120 horas de tratamento com a Rapamicina as células apresentaram uma redução na proliferação/viabilidade em comparação às células não tratadas. Esta redução foi mais evidente nas células transduzidas com o vetor pLXSN (vazio) do que naquelas que expressam o gene E6 de HPV16.

A)

B)

C)

Figura 10 – Análise do efeito das citocinas TNF e TRAIL na viabilidade de células que expressam E6 de HPV11. Queratinócitos que expressam E6 de HPV11 foram semeados em placas de 96 poços (5000 células/poço) e após 24 horas foram tratados 2 nM de TNF (A) 50ng/ μ l de TRAIL (B) ou com TNF + TRAIL (C). Todos os tratamentos foram realizados em octuplicata. Após 60 ou 120 horas de tratamento foram acrescentados 10 μ l de Alamar Blue e sua redução foi monitorada em um espectrofotômetro mediante medição da absorvância a 570 e 600 nm. Os resultados apresentados são representativos de 3 experimentos independentes.

Figura 11 – Análise da Rapamicina na viabilidade de células que expressam E6 de HPV16. Queratinócitos que expressam E6 de HPV16 foram semeados em placas de 96 poços (5000 células/poço) e após 24 horas foram tratadas com 100 ng/mL de Rapamicina. Todos os tratamentos foram realizados em octuplicata. Após 60 ou 120 horas foram acrescentados 10 µL de Alamar Blue e a sua redução foi monitorada em um espectrofotômetro mediante medição da absorvância a 570 e 600 nm. Os resultados apresentados são representativos de 3 experimentos independentes.

Novamente, resolvemos determinar se a resistência à Rapamicina induzida pela expressão de E6 de HPV16 podia ser conferida pela expressão da proteína E6 de HPV de baixo risco oncogênico. Portanto os resultados obtidos analisando células transduzidas com os vetores pBabe e pBabe11 E6 são representados na figura 12, Os dados mostram que após 60 e 120 horas de tratamento com a Rapamicina as células apresentaram uma redução na proliferação/viabilidade em comparação às células não tratadas. Esta redução foi mais evidente nas células transduzidas com o vetor pBabe (vazio) do que naquelas que expressam o gene E6 de HPV11.

Figura 12 – Análise do efeito da Rapamicina na viabilidade de células que expressam E6 de HPV11. Queratinócitos que expressam E6 de HPV11 foram semeados em placas de 96 poços (5000 células/poço) e após 24 horas foram tratadas com 100 ng/mL de Rapamicina. Todos os tratamentos foram realizados em octuplicata. Após 60 ou 120 horas foram acrescentados 10 µL de Alamar Blue e a sua redução foi monitorada em um espectrofotômetro mediante medição da absorvância a 570 e 600 nm. Os resultados apresentados são representativos de 3 experimentos independentes.

4.4 Análise da Expressão Proteica

4.4.1 Determinação dos níveis do Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA)

O Antígeno Nuclear de Proliferação Celular é uma proteína de 36 KDa, auxiliar da DNA polimerase delta e sua expressão está relacionada com o estado proliferativo das células (HALL et al., 1990).

Os níveis de PCNA podem manter-se elevados quando induzidos por fatores de crescimento, como resultado de danos ao DNA (MIGHELL et al., 1995). A sua expressão pode também estar desregulada em tecidos próximo a tumores, em decorrência de fatores de crescimento autócrinos, que regulam a estabilidade e a expressão do mRNA da proteína (HALL et al., 1990).

Os resultados apresentados na figura 13, mostram a presença de altos níveis de PCNA nos extratos proteicos derivados de todas as culturas organotípicas que expressam o gene E6 de HPV16 independentemente do tratamento. Por outro lado, observamos uma queda evidente nos níveis desse fator em culturas organotípicas

estabelecidas a partir de queratinócitos transduzidos com o vetor vazio (pLXSN) após tratamento com TNF+TRAIL e Rapamicina (figura 13A, colunas 5 e 7 respectivamente).

Resultados diferentes foram obtidos ao analisarmos os níveis de PCNA em culturas que expressam E6 de HPV11. Neste caso, observamos tanto culturas controle como culturas que expressam E6 de HPV11 apresentaram uma diminuição nos níveis de PCNA após tratamento com TNF+TRAIL ou Rapamicina. Estes dados indicam diferenças de proliferação entre células que expressam E6 de HPV11 e E6 de HPV16 (figura 13B).

A)

B)

Figura 13- Determinação dos níveis de PCNA em células que expressam o gene E6 de HPV16 e HPV11. Os níveis de PCNA foram determinados por *Western blot* utilizando 30 µg de extratos proteicos totais obtidos a partir de culturas organotípicas que expressam ou não E6 de HPV16 (A) e E6 de HPV11(B). As proteínas foram separadas em gel de poliácridamida e transferidas para uma membrana de PVDF e depois analisadas na presença do anticorpo anti-PCNA. A reação foi revelada pelo método de quimioluminescência e a quantificação das bandas foi realizada utilizando o programa Image J.

4.4.2 Determinação dos níveis de TNFR1 (Tumor necrosis fator receptor 1)

O fator de necrose tumoral (TNF) é uma citocina potente produzida por diversos tipos celulares, incluindo macrófagos, monócitos, linfócitos, queratinócitos e fibroblastos, em resposta a inflamação e infecção (BAUD et al., 2001). O TNF induz respostas celulares que vão desde a proliferação celular, diferenciação e a apoptose (BAUD et al., 2001).

O TNF exerce seus efeitos através de dois receptores distintos, o TNFR1 e o TNFR2. A ligação de TNF com o TNFR1 induz a trimerização do receptor e o recrutamento da proteína de domínio de morte associada a TNFR1 (TRADD), que serve como uma plataforma para recrutar pelo menos três mediadores adicionais, que são: a proteína de interação com o receptor 1 (RIP1), a proteína do domínio de morte Fas-associado (FADD) e o fator de TNF-2 associada ao receptor (TRAF2). (DEVIN et al., 2000). A proteína adaptadora transmite um sinal de ativação do receptor ativado TNFR1 para a cascata de sinalização dependente de caspases. (BAUD et al., 2001).

O recrutamento de FADD e RIPK por TRADD resulta na ativação da cascata de caspases, resultando na apoptose. As proteínas adaptadoras FADD e TRADD participam da ativação das caspases iniciadoras como a caspase 2, 8 e 10, pelo receptor ativado de TNFR1. As caspases efetoras como a 3, 6 e 7 são as responsáveis pela clivagem proteolítica de largo espectro de alvos celulares que acabam por conduzir à morte celular (BAUD et al., 2001).

Os resultados apresentados na figura 14, mostram que os níveis da proteína TNFR1 aumentam em culturas que expressam a proteína E6 de HPV11 ou HPV16 quando comparadas as culturas transduzidas com o vetores vazios. Interessantemente, observamos um claro aumento desta proteína após o tratamento com TNF e TRAIL. No entanto, este aumento foi maior nas culturas controle do que nas culturas que expressam a proteína E6 dos dois tipos virais estudados. Resultados diferentes foram obtidos após tratamento com Rapamicina, onde foi

observada uma redução nos níveis de TNFR1 tanto nas células transduzidas com E6 de HPV16 como E6 de HPV11.

A)

B)

Figura 14-Determinação dos níveis de TNFR1 em células que expressam o gene E6 de HPV16 e HPV11. Os níveis de TNFR1 foram determinados por *Western blot* utilizando 30 µg de extratos proteicos totais obtidos a partir de culturas organotípicas que expressam ou não E6 de HPV16 (A) e E6 de HPV11(B). As proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida e transferidas para uma membrana de PVDF e depois analisadas na presença do anticorpo anti-TNFR1. A reação foi revelada pelo método de quimioluminescência e a quantificação das bandas foi realizada utilizando o programa Image J.

4.4.3 Determinação dos níveis de FADD (*Fas-associated death domain*)

O receptor de morte Fas pertence à superfamília de receptores de morte do fator de necrose tumoral (TNF), da qual também fazem parte o TNFR1 e 2, TRAIL-R1 e 2 e seus respectivos ligantes FasL (*Fas ligant*), TNF- α e TRAIL (CURTIN et al., 2003).

Fas recruta uma proteína adaptadora citosólica, FADD (*Fas-associated death domain*), através da interação entre os domínios de morte (DD), presentes tanto nesta molécula quanto no receptor. Além disso, há também o recrutamento da pró-caspase 8 que interage com FADD, através de outro domínio, o DED (*death-effector domain*), formando um complexo que é denominado DISC (*death-inducing signaling complex*) (KISCHKEL et al., 1995). Este complexo resulta na ativação e autoclivagem da caspase 8 e posteriormente a ativação de toda cascata de sinalização intracelular. Já foi descrito em estudos anteriores que a caspase 10 também é capaz de se associar a FADD no complexo DISC, possuindo também o domínio DED (BARNHART et al., 2003).

Os resultados apresentados na figura 15, mostram que os níveis da proteína FADD aumentaram nas células transduzidas com o vetor vazio e com E6 de HPV16, com e sem o tratamento com TRAIL. Além disso, observamos que os níveis desse fator diminuíram após os tratamentos com TNF em combinação com TRAIL e também com a Rapamicina. Já nas células transduzidas com E6 de HPV11, ocorreu diminuição dos níveis da proteína FADD quando tratada com TRAIL ou Rapamicina.

A)

B)

Figura 15-Determinação dos níveis de FADD em células que expressam o gene E6 de HPV16 e HPV11. Os níveis de FADD foram determinados por *Western blot* utilizando 30 µg de extratos proteicos totais obtidos a partir de culturas organotípicas que expressam ou não E6 de HPV16 (A) e E6 de HPV11(B). As proteínas foram separadas em gel de poliácridamida e transferidas para uma membrana de PVDF e depois analisadas na presença do anticorpo anti-FADD. A reação foi revelada pelo método de quimioluminescência e a quantificação das bandas foi realizada utilizando o programa Image J.

4.4.4 Determinação dos níveis de DR5 (Death receptor 5)

O receptor de morte 5 (DR5) é também conhecido como receptor de TRAIL 2 (TRAILR2). Ele é um membro da superfamília de receptores de morte do fator de necrose tumoral (TNF). O ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL) pode interagir com cinco receptores diferentes, sendo que dois deles, o DR4 (TRAIL-R1) e o DR5 (TRAIL-R2) possuem domínios de morte (DD), que desencadeiam uma resposta apoptótica após a estimulação pelo ligante. Já DcR1 (TRAIL-R3), DcR2 (TRAIL-R4) e a osteoprotegerina parecem atuar como receptores *decoy* (GONZALVEZ et al., 2010). A ligação entre TRAIL e seus receptores de morte leva ao recrutamento de FADD e a clivagem da caspase 8 e subsequente desencadeamento da apoptose de maneira semelhante ao de FasL (SEDDER et al., 1999).

Os resultados apresentados na figura 16, mostram que os níveis da proteína DR5 foram maiores nas células que expressam E6 de HPV16 sem tratamento e na células controle pLXSN tratada com Rapamicina. (figura 16A). Nas células que expressam E6 de HPV11 observamos uma redução dessa proteína quando comparadas as células controle pBabe e um aumento quando o controle foi tratado com a Rapamicina (figura 16B).

A)

B)

Figura 16-Determinação dos níveis de DR5 em células que expressam o gene E6 de HPV16 e HPV11. Os níveis de DR5 foram determinados por *Western blot* utilizando 30 µg de extratos proteicos totais obtidos a partir de culturas organotípicas que expressam ou não E6 de HPV16 (A) e E6 de HPV11(B). As proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida e transferidas para uma membrana de PVDF e depois analisadas na presença do anticorpo anti-DR5. A reação foi revelada pelo método de quimioluminescência e a quantificação das bandas foi realizada utilizando o programa Image J.

4.4.5 Determinação dos níveis de Survivina

A survivina também conhecida como BIRC5, é uma proteína membro da família dos inibidores de apoptose (IAPs). As IAPs são uma classe de proteínas reguladoras que exercem seu papel anti-apoptótico através da capacidade de inibir a atividade das caspases efetoras 3 e 7 e da caspase iniciadora 9, e também de modularem o fator de transcrição NF- κ B. As IAPs foram primeiramente isoladas do genoma de baculovírus (SHI et al., 2002). Atualmente são conhecidos nove membros dessa família, sendo eles: XIAP, cIAP1, cIAP2, proteína neuronal inibidora de apoptose (NAIP), IAP melanoma, IAP-like protein2, livin, apollon e survivina (LIF; AMBROSINI, 1998). A survivina é o menor membro da família de IAPs, possui 142 aminoácidos e funciona como um regulador chave da mitose e da apoptose.

Nos resultados apresentados na figura 17, mostram que os níveis da proteína Survivina aumentaram nas células que expressam a proteína E6 de HPV16 não tratada e com os tratamentos TRAIL, TNF+TRAIL e Rapamicina; e também nas células transduzidas com os vetores vazios tratados com TNF+TRAIL e Rapamicina. No nosso estudo pode-se observar que mesmo com os tratamentos as células que expressam E6 de HPV16, conseguiram uma maior expressão da survivina quando comparadas as células transduzidas com E6 de HPV11, sendo que os tratamentos com TNF e TRAIL e com Rapamicina foram os que mais reduziram o nível da proteína survivina (figura 17B).

A)

B)

Figura 17-Determinação dos níveis de Survivina em células que expressam o gene E6 de HPV16 e HPV11. Os níveis de Survivina foram determinados por *Western blot* utilizando 30 µg de extratos proteicos totais obtidos a partir de culturas organotípicas que expressam ou não E6 de HPV16 (A) e E6 de HPV11(B). As proteínas foram separadas em gel de poliácridamida e transferidas para uma membrana de PVDF e depois analisadas na presença do anticorpo anti-Survivina. A reação foi revelada pelo método de quimioluminescência e a quantificação das bandas foi realizada utilizando o programa Image J.

4.4.6 Determinação dos níveis de Smac/Diablo (*Second mitochondria-derived activator of caspases/ Direct IAP-Binding Protein with Low pI*).

SMAC (Segundo ativador mitocôndrial de caspase) também conhecido como Diablo (Proteína de Ligação-IAP Direta com baixo pI), é uma proteína mitocondrial com 239 aminoácidos, de função pró-apoptótica (DU et al., 2000).

Quando as proteínas pró-apoptóticas da família BH3 tornam-se ativas, anulando a função das proteínas anti-apoptóticas ocorre a formação de poros na membrana mitocondrial pelas proteínas BAK e BAX, com esse evento a SMAC/Diablo é liberada do espaço intermembrana para o citoplasma, juntamente com o citocromo c que liga-se à APAF-1 (*Apoptotic protease-activating factor 1*), forma o apoptossomo e ativa diretamente a caspase 9. SMAC/Diablo liga-se as proteínas inibidoras de apoptose (IAPs) e remove as IAPs da sua ligação inibitória com as caspases (DU et al, 2000).

Os resultados apresentados na figura 18, mostram que os níveis da proteína SMAC/DIABLO foi maior nas células que expressam a proteína E6 de HPV16 sem tratamento (figura 18A), o mesmo ocorreu com a proteína survivina, sugerindo que nas células com E6 de HPV16 há um balanço entre essas duas proteínas, uma pró-apoptótica SMAC e outra anti-apoptótica Survivina, e esse equilíbrio entre as duas possa dar estabilidade a essas células. Para ocorrer a apoptose seria necessário a diminuição de uma e o aumento da outra. Nas células transduzidas com o vetor vazio e com E6 de HPV11 houve uma maior expressão da proteína SMAC/DIABLO nas células tratadas com TRAILn TNF+TRAIL em combinação.

A)

B)

Figura 18- Determinação dos níveis de SMAC/Diablo em células que expressam o gene E6 de HPV16 e HPV11. Os níveis de SMAC/Diablo foram determinados por *Western blot* utilizando 30 µg de extratos proteicos totais obtidos a partir de culturas organotípicas que expressam ou não E6 de HPV16 (A) e E6 de HPV11(B). As proteínas foram separadas em gel de poliácridamida e transferidas para uma membrana de PVDF e depois analisadas na presença do anticorpo anti-SMAC/Diablo. A reação foi revelada pelo método de quimioluminescência e a quantificação das bandas foi realizada utilizando o programa Image J.

4.4.7 Determinação dos níveis de Caspase 3 Ativa

As caspases (*cyteine-dependent aspartate-specific proteases*) pertencem à família das cisteínas proteases (que possuem uma cisteína no sítio ativo), que têm a capacidade de reconhecer e clivar substratos que possuem resíduos de aspartato (NICHOLSON et al., 1997).

Na apoptose, as caspases são divididas em dois tipos: caspases iniciadoras e caspases efetoras. As iniciadoras como por exemplo a caspases 8 e caspase 9, clivam pró-formas inativas das caspases efetoras, como por exemplo, a caspase 3 e a caspase 7, ativando-as. As efetoras por sua vez clivam outros substratos proteicos da célula resultando no processo apoptótico. Diferentes caspases têm diferentes domínios de interação proteína-proteína em seus pró-domínios, permitindo-lhes formar um complexo com diferentes adaptadores. Como por exemplo, a caspase 1, 2, 4, 5, e 9 contêm um domínio de recrutamento de caspase (CARD), enquanto que a caspase 8 e 10 têm um domínio efetor de morte (DED) (TAYLOR et al., 2008).

Os resultados apresentados na figura 19, mostram que os níveis da proteína Caspase 3 Ativa tiveram um claro aumento nas células que expressam a proteína E6 de HPV16 ou HPV11 e nos seus controles, após tratamento com as citocinas TNF e TRAIL. Interessantemente este aumento foi maior nas células controle do que nas células que expressam a proteína E6 dos dois tipos virais.

A)

B)

Figura 16-Determinação dos níveis de Caspase 3 Ativa em células que expressam o gene E6 de HPV16 e HPV11. Os níveis de Caspase 3 Ativa foram determinados por *Western blot* utilizando 30 µg de extratos proteicos totais obtidos a partir de culturas organotípicas que expressam ou não E6 de HPV16 (A) e E6 de HPV11(B). As proteínas foram separadas em gel de poliácridamida e transferidas para uma membrana de PVDF e depois analisadas na presença do anticorpo anti-Caspase 3 Ativa. A reação foi revelada pelo método de quimioluminescência e a quantificação das bandas foi realizada utilizando o programa Image J.

4.4.8 Determinação dos níveis de XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis*)

XIAP é um membro da família das proteínas inibidoras de apoptose (IAPs), e possui três domínios BIR (*Baculoviral IAP repeat*), também possui um domínio de ligação a ubiquitina (UBA) e um domínio de ligação a zinco (*Ring domain*) (DUCKETT et al., 1998). Na apoptose XIAP liga-se e inibe as caspases 3, 7 e 9. Seu domínio BIR2 inibe a caspase 3 ativa e a caspase 7, e o seu domínio BIR3 inibe a caspase 9. O domínio de ligação a zinco (*Ring domain*) tem atividade de uma E3 ubiquitina ligase e permite a XIAP catalisar sua autoubiquitinação e também a ubiquitinação da caspase 3 na sua forma ativa por via proteossômica (DEVERAUX et al., 1999). No entanto, mutações que afetam o *Ring domain* não afetam significativamente a apoptose, indicando que os domínios BIR são suficientes para a proteína exercer a sua função (DEVERAUX et al., 1999).

Nos resultados apresentados na figura 20, mostram que a proteína XIAP foi expressa nas células controle e nas células que expressam E6 de HPV16 e E6 de HPV11. Houve um pequeno aumento da proteína XIAP nas células tratadas com TRAIL e com Rapamicina (figura 20A). Nas células transduzidas com vetor vazio pBabe houve um aumento quando foram tratadas com o quimioterápico Rapamicina; houve também uma discreta diminuição nas células que expressam E6 de HPV11 tratadas com TNF+TRAIL e Rapamicina (figura 20B).

A)

B)

Figura 20-Determinação dos níveis de XIAP em células que expressam o gene E6 de HPV16 e HPV11. Os níveis de XIAP foram determinados por *Western blot* utilizando 30 µg de extratos proteicos totais obtidos a partir de culturas organotípicas que expressam ou não E6 de HPV16 (A) e E6 de HPV11(B). As proteínas foram separadas em gel de poliácridamida e transferidas para uma membrana de PVDF e depois analisadas na presença do anticorpo anti-XIAP. A reação foi revelada pelo método de quimioluminescência e a quantificação das bandas foi realizada utilizando o programa Image J.

4.5 Efeitos do TNF, TRAIL e da Rapamicina em culturas organotípicas que expressam o gene E6 de HPV16 e HPV11.

O modelo de cultura celular em monocamada oferece capacidade limitada de proliferação e diferenciação, enquanto o modelo tridimensional da cultura organotípica permite que as células sejam capazes de gerar um epitélio escamoso estratificado com uma estrutura muito semelhante ao observado em um tecido biológico (BOCCARDO et al., 2004), conforme esquematizado na figura 21. Estes sistemas têm sido utilizados para visualizar a base celular da morfogênese epitelial, para testar o papel de genes específicos na regulação do comportamento das células dentro dos tecidos epiteliais e também para elucidar a contribuição de fatores do micro-ambiente celular nos processos normais e patológicos (Revisado por SHAMIR; EWALD, 2014).

Este sistema de cultura celular pode ser utilizado em substituição a tecidos humanos, pois podem utilizar células derivadas de órgãos, além de permitirem que possam ser usados diferentes testes e também novas abordagens terapêuticas (Revisado por Shamir e Ewald, 2014). Sendo assim, o sistema de cultura organotípica é um sistema ideal para o estudo da história natural de células que expressam genes do HPV, pois estes vírus dependem de fatores celulares que só serão expressos em diferentes etapas do processo de diferenciação dos queratinócitos (BOCCARDO et al., 2004).

Para estudar os efeitos causados pelas citocinas TNF e TRAIL e o quimioterápico Rapamicina em queratinócitos que expressam o gene E6 de HPV16 e HPV11, foram utilizadas culturas organotípicas de queratinócitos primários humanos (QPHs) transduzidos com vetores vazios pLXSN e pBabe, respectivamente e também com os vetores que expressam o gene E6 de HPV16 e HPV11. Estas culturas foram tratadas por 72 horas separadamente em grupos que receberam 50 ng/μl de TRAIL, TNF em combinação com TRAIL: 2 nM de TNF + 50 ng/μl de TRAIL e 100 ng/mL de Rapamicina.

Estrutura do epitélio estratificado obtido em sistema de cultura organotípica

Figura 21- Estrutura do epitélio estratificado obtido em sistema de cultura organotípica. Imagens de um corte transversal de uma cultura organotípica mostrando as diferentes camadas da epiderme.

Observaram-se alterações morfológicas entre os tecidos epiteliais que expressam a proteína E6 de HPV16 e HPV11 com e sem tratamentos em comparação as estruturas dos tecidos epiteliais que expressam os vetores vazios.

As culturas organotípicas obtidas a partir de queratinócitos transduzidos com o gene E6 sem tratamento, apresentam um maior número das camadas celulares no extrato espinhoso (acantose) e na camada de transição. Além disso, essas culturas apresentam núcleos maiores e mais arredondados assim como uma maior número de núcleos que incorporaram BrdU nas camadas basal e supra basal. Essas alterações morfológicas e de proliferação foram consistentemente observadas em todas as culturas organotípicas analisadas quando comparadas as culturas controle ou que expressam o gene E6 de HPV11. Após o tratamento com TRAIL os rafts transduzidos com vetores vazios, pLXSN e pBabe ou com E6 de HPV11

apresentaram núcleos mais achatados em todas as camadas celulares. Por outro lado, não observamos alterações significativas na morfologia das culturas organotípicas que expressam E6 de HPV16 após o tratamento com essa citocina (figuras 22a-22h).

Ao analisarmos o efeito do tratamento de TNF em combinação com TRAIL, observamos alterações morfológicas mais evidentes, tanto nas culturas que expressam o gene E6 de HPV16 e HPV11 como em seus respectivos controles. Estas alterações eram caracterizadas pelo achatamento das células da camada basal, espinhosa e granular. Além disso, observamos a diminuição no número de camadas celulares que compõem os extratos espinhoso e granular (figuras 23b, 23d, 23f e 23h).

Nas culturas tratadas com a Rapamicina também foram observadas alterações morfológicas evidentes, como a diminuição das camadas espinhosa e granular, também apresentaram um grande estreitamento dessas camadas e achatamento e diminuição dos núcleos dos vetores vazios pLXSN e pBabe (figuras 24b e 24f). Com exceção para as células transduzidas com E6 de HPV16 e HPV11 que não foram afetadas pelo tratamento com este quimioterápico (figura 24d e 24h).

Figura 22- Análise do efeito de TRAIL na estrutura de culturas organotípicas. Após oito dias na interface meio-ar cultura organotípicas obtidas a partir de queratinócitos que expressam o gene E6 de HPV16 e/ou HPV11 foram tratadas com 50 ng/μl de TRAIL por 72 horas. No décimo primeiro dia as culturas foram fixadas em formaldeído por 1 hora e depois processadas para análise histológica. Aumento de 400x.

Figura 23- Análise do efeito de TNF+TRAIL na estrutura de culturas organotípicas. Após oito dias na interface meio-ar cultura organotípicas obtidas a partir de queratinócitos que expressam o gene E6 de HPV16 e/ou HPV11 foram tratadas com 2 nM de TNF e 50 ng/µl de TRAIL por 72 horas. No décimo primeiro dia as culturas foram fixadas em formaldeído por 1 hora e depois processadas para análise histológica. Aumento de 400x.

Figura 24- Análise do efeito da Rapamicina na estrutura de culturas organotípicas. Após oito dias na interface meio-ar cultura organotípicas obtidas a partir de queratinócitos que expressam o gene E6 de HPV16 e/ou HPV11 foram tratadas com 100 ng/ml de Rapamicina por 72 horas. No décimo primeiro dia as culturas foram fixadas em formaldeído por 1 hora e depois processadas para análise histológica. Aumento de 400x.

Os efeitos de TRAIL, TNF+TRAIL e Rapamicina sobre a proliferação dos queratinócitos nas culturas organotípicas foram avaliados pela incorporação de BrdU (5-bromodesoxiuridina). Observamos que o tratamento com TRAIL não apresentou um efeito significativo no número de núcleos marcados com BrdU em nenhuma das condições analisadas (figuras 25a-25h).

Por outro lado, observamos que as culturas organotípicas que foram transduzidas com os vetores controle ou que expressam E6 de HPV16 ou HPV11 apresentam uma marcada inibição da proliferação após tratamento com as citocinas TNF+TRAIL. Isto é indicado pela diminuição no número de células das camadas basal e parabasal que incorporaram BrdU (figuras 26a-26h). É importante salientar que culturas que expressam E6 de HPV16 parecem ser mais resistentes à ação conjunta das citocinas do que as culturas controle ou que expressam E6 de HPV de HPV11 (figuras 26a-26h, 28 e 29).

Finalmente, observamos que as culturas organotípicas de queratinócitos transduzidos com os vetores controle foram muito mais sensíveis ao tratamento com a Rapamicina (figuras 27a-27h). Por outro lado as culturas que expressam a proteína E6 de HPV16 ou HPV11 foram resistentes à ação deste agente (figuras 27a-27h, 28 e 29).

Figura 25- Análise do efeito de TRAIL na proliferação de culturas organotípicas. Após 72 horas do tratamento com TRAIL, foi adicionado 100µl de BrdU no meio das culturas organotípicas. As setas indicam as células que incorporaram BrdU e foram detectadas por IHQ. Aumento de 400x.

Figura 26- Análise do efeito de TNF+TRAIL na proliferação de culturas organotípicas. Após 72 horas do tratamento com TNF+TRAIL, foi adicionado 100µl de BrdU no meio das culturas organotípicas. As setas indicam as células que incorporaram BrdU e foram detectadas por IHQ. Aumento de 400x.

Figura 27- Análise do efeito da Rapamicina na proliferação de culturas organotípicas. Após 72 horas do tratamento com a Rapamicina, foi adicionado 100µl de BrdU no meio das culturas organotípicas. As setas indicam as células que incorporaram BrdU e foram detectadas por IHQ. Aumento de 400x.

Figura 28- Efeito da expressão do gene E6 de HPV16 na proliferação de culturas organotípicas. Queratinócitos primários humanos que foram transduzidos com vetores retrovirais controle e que expressam o gene E6 de HPV16 foram utilizados para semear culturas organotípicas. Após oito dias na interface meio-ar as culturas foram tratadas com 50 ng/μl de TRAIL, 2 nM de TNF+TRAIL ou com 100 ng/mL de Rapamicina por 72 horas, nas últimas 12 horas foi adicionado 100 μg/mL de BrdU. Os núcleos foram detectados por IHQ e analisados pelo programa ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

Figura 29- - Efeito da expressão do gene E6 de HPV11 na proliferação de culturas organotípicas. Queratinócitos primários humanos que foram transduzidos com vetores retrovirais controle e que expressam o gene E6 de HPV11 foram utilizados para semear culturas organotípicas. Após oito dias na interface meio-ar as culturas foram tratadas com 50 ng/μl de TRAIL, 2 nM de TNF+TRAIL ou com 100 ng/mL de Rapamicina, nas últimas 12 horas foi adicionado 100 μg/mL de BrdU. Os núcleos foram detectados por IHQ e analisados pelo programa ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

As células que expressam o gene E6 de HPV16 e HPV11 e os controle pLXSN e pBabe tratados com as citocinas TNF+TRAIL mostraram diferenças nos ensaios de viabilidade celular, na expressão de proteínas envolvidas na regulação/execução da apoptose e por ultimo na morfologia e proliferação. A partir desses resultados foram realizados ensaios de imunohistoquímica para verificar poderia haver marcação da caspase 3 ativa também nos tecidos obtidos a partir dessas culturas.

Observamos que as células que expressam E6 de HPV16 e HPV11 apresentaram pouca marcação positiva para caspase 3 quando comparadas as células tratadas (figuras 30c-30d, 30g-30h). Nas células que não receberam o tratamento com TNF+TRAIL a marcação para caspase 3 ativa foi mais observada na camada basal (figuras 30A, 30C, 30D e 30G). Enquanto que nas células tratadas os corpúsculos apoptóticos eram mais evidentes e presentes nas camadas basal, estratificada e granular (figura 30B, 30D, 30F e 30H).

Figura 30- Detecção da proteína Caspase 3 Ativa por imunohistoquímica em culturas organotípicas que expressam o gene E6 de HPV16 e HPV11. Culturas de queratinócitos transduzidos com o gene E6 de HPV16 e HPV11 e tratados com TNF+TRAIL. As setas indicam corpúsculos apoptóticos. Aumento de 400x.

5 DISCUSSÃO

Para persistir e se replicar, os vírus têm desenvolvido diversos meios para escapar do sistema imune do hospedeiro, incluindo alterar mecanismos que inibam a apoptose em células infectadas (BENTO et al., 2003). A via de sinalização apoptótica extrínseca por ser induzida durante a infecção viral como parte da resposta do hospedeiro, e é desencadeada por sinais extracelulares que induzem a ativação de receptores de morte na superfície celular (GEWIES, 2003). Já a via de sinalização apoptótica intrínseca está envolvida na percepção de sinais apoptóticos que se originam dentro da célula, tais como dano do DNA e estresse oxidativo. Quando a célula detecta tensão intrínseca somente as proteínas pró-apoptóticas (Bax, Bad, Bak e Bok, entre outras), da família Bcl-2, tornam-se ativas, anulando a função das proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL, e Bcl-w, entre outras) (GEWIES, 2003).

Diversos estudos mostram que a proteína E6 de HPV por interferir tanto com a via extrínseca quanto com a via intrínseca de apoptose. Por exemplo, foi observado que a proteína E6 de HPV inibe a apoptose mediada pelo TNF (*Tumor Necrosis Fator*) através da sua ligação ao TNFR1 (Receptor 1 de TNF), prevenindo sua interação com TRADD (TNFR1 – associated death domain) (DUERKSEN-HUGHES et al., 2004; FILLIPOVA et al., 2002; GARNETT et al., 2006). Além disso, E6 de HPV16 é também capaz de inibir a apoptose estimulada por Fas e por TRAIL através da ligação de E6 a Fas e pela degradação da molécula adaptadora FADD (DUERKSEN-HUGHES et al., 2004; FILLIPOVA et al., 2004; GARNETT et al., 2006). Considerando a via intrínseca foi mostrado que E6 de HPV de baixo e alto risco oncogênico podem regular positivamente a expressão de duas proteínas inibidoras de apoptose (IAPs), sendo elas a c-IAP2 e a Survivina (BORBELY et al., 2006). Além disso, foi observado que a proteína E6 de HPV de alto risco oncogênico é capaz de bloquear a sinalização apoptótica intrínseca através da sua interação com a proteína pró-apoptótica Bak, induzindo a sua degradação via proteólise dependente de ubiquitina através da interação com E6AP (MAGAL et al., 2005; THOMAS; BANKS, 1998). Enquanto E6AP têm mostrado desempenhar um papel importante na degradação de Bak, também já foi proposto em estudos anteriores que este pode

não ser um mecanismo universal para todos os outros tipos de HPV (HUIBREGSTE et al., 1993). No entanto, o impacto da expressão de E6 de HPV de baixo e alto risco oncogênico em muitas proteínas envolvidas na morte celular programada não têm sido caracterizado em detalhe. No presente estudo analisamos o efeito de TNF, TRAIL, TNF+TRAIL e Rapamicina na proliferação celular e na expressão de 35 proteínas envolvidas na regulação/execução de apoptose em células que expressam a proteína E6 de HPV16 e HPV11.

O TNF é uma citocina pró-inflamatória que possui importantes funções na regulação da inflamação, proliferação, diferenciação celular e apoptose (TOGBE et al., 2007). Esta citocina é produzida por células T citotóxicas, macrófagos e queratinócitos sendo considerado um importante mediador da resposta imune contra infecções virais. O tratamento com TNF induz a parada na fase G1 do ciclo celular em queratinócitos normais. No entanto, células transformadas por HPV são resistentes ao efeito antiproliferativo desta citocina (VIEIRA et al., 1996; VILLA et al., 1992;). Diversos estudos têm mostrado que as oncoproteínas de HPV podem alterar a resposta ao TNF. Por exemplo, foi observado que a proteína E7 de HPV16 e 18 confere resistência ao efeito citostático do TNF em um mecanismo que depende da degradação de pRB (BASILE et al., 2001; BOCCARDO et al., 2004, 2010). Paradoxalmente a transfecção de E6 em células humanas nem sempre resultou em proteção contra a apoptose mediada por TNF. Por exemplo, um estudo mostrou que clones com um elevado nível de expressão de E6 foram mais sensíveis a apoptose induzida por TNF do que clones com baixo nível de E6 (FILLIPOVA et al., 2005).

De maneira semelhante, diversos estudos mostram a interferência de proteínas de HPV na resposta a TRAIL. Por exemplo, foi observado que E6 protege células da apoptose mediada por TRAIL através da aceleração da degradação de FADD e caspase 8 (FILLIPOVA et al., 2004). Além disso, foi observado que a proteína E5 de HPV16 é capaz de induzir resistência à apoptose desencadeada por TRAIL (KABSCH; ALONSO, 2002). Por outro lado, outro estudo mostrou que queratinócitos transduzidos com o gene E7 de HPV16 tratados com TNF ou TRAIL apresentaram uma diminuição da proliferação e da diferenciação e que esses tratamentos em combinação com o inibidor de síntese proteica cicloheximida conseguiu induzir apoptose nessas células (BASILE et al., 2001).

Nossos resultados mostram que células que expressam E6 de HPV16 e HPV11 proliferam mais e são mais resistentes ao tratamento com as citocinas TNF, TRAIL, TNF+TRAIL (figuras 9A-C, 10A-C, 11 e 12). Interessantemente, ao analisar o efeito dos tratamentos em culturas organotípicas observamos que E6 de HPV16 é capaz de induzir resistência ao efeito de TNF+TRAIL conforme determinado através da quantificação da incorporação de BrdU. Isto não foi observado para culturas que expressam E6 de HPV11. Estas observações sugerem que a proteína E6 pode colaborar com outras proteínas virais na indução de resistência ao efeito de diferentes componentes da resposta contra a infecção viral. Ainda mais, sugerem que alguns dos efeitos observados podem ser generalizados a tipos de HPV de alto e baixo risco oncogênico ao tempo que outros mostram a existência de diferenças na atividade de E6 de diferentes tipos virais

Ao analisarmos o efeito dos tratamentos descritos na expressão de proteínas envolvidas no processo apoptótico observamos que culturas que expressam o gene E6 de HPV16 não apresentaram alterações significativas na expressão dos fatores envolvidos na regulação/execução de apoptose quando comparadas as células controle. Estes resultados estão de acordo com os obtidos em um estudo que examinou os níveis de NOXA, PUMA, Bcl-x, Mcl-1, Bcl-2 e Bax e não detectou alterações na expressão desses fatores em células que expressam E6 de HPV16 e HPV18 (UNDERBRINK et al., 2008). Por outro lado, um estudo realizado por DU e colaboradores (2004), mostrou que a expressão da proteína E6 de HPV16 induz o aumento da proteína anti-apoptótica Bcl-2. Além disso, foi observado que E6 de HPV16 pode inibir a expressão de Bax em queratinócitos humanos (MAGAL et al., 2005). Em conjunto, esses resultados mostram que os efeitos da proteína viral na expressão de fatores reguladores de apoptose podem variar segundo os modelos experimentais utilizados. Portanto, variáveis tais como o tipo celular e as condições de crescimento celular utilizadas devem ser consideradas. Interessantemente, o tratamento com a citocina TRAIL não mudou de maneira significativa o padrão de expressão de proteínas associadas à regulação de apoptose em células que expressam E6 de HPV de baixo e alto risco oncogênico.

No presente estudo resolvemos utilizar o tratamento conjunto com TNF e TRAIL assumindo que na resposta à infecção viral deve existir a ação simultânea de diversos mediadores inflamatórios. Interessantemente, o tratamento com TNF+TRAIL foi o que gerou maiores efeitos nas células que expressam E6 e mudanças mais evidentes no padrão de expressão de proteínas associadas à regulação/execução de apoptose. Ao analisarmos o perfil de expressão dessas proteínas observamos que fatores pró-apoptóticos tais como Bad, pró-caspase 3, Fas, FADD e HtrA/Omi encontram-se aumentados em células controle quando comparadas com células que expressam o gene E6 de HPV16. Por outro lado, observamos que células que expressam o gene E6 de HPV11 apresentam um aumento no nível de expressão das proteínas Bad, Fas, SMAC/Diablo e XIAP após o tratamento com TNF+TRAIL quando comparadas culturas controle. Estas observações indicam claramente a existência de diferenças funcionais entre as proteínas E6 de HPV 11 e HPV16 e sugerem que E6 de HPV16 apresenta uma maior atividade anti-apoptótica.

Em nosso estudo também foi analisado o efeito da expressão de E6 na resposta à Rapamicina, um agente quimioterápico que se une intracelularmente à proteína FKBP-12, e esse complexo se liga ao domínio FRB da proteína mTOR (*Mammalian target of rapamycin*) inibindo esta proteína (SEGHAL et al., 2003). Dessa maneira a Rapamicina bloqueia a ativação da proteína ribossomal S6K1 e do fator de transcrição 4EBP levando a redução da tradução de mRNAs que codificam componentes essenciais como: fatores de crescimento e reguladores do ciclo celular. Isto leva as células à parada em G1, provocando efeito anti-proliferativo e induzindo a apoptose em diversos tipos de tumores (DULONP et al., 2009). Como todos os vírus o HPV depende da maquinaria celular para traduzir suas proteínas e induzir alterações que levam a ativação da proteína mTOR. Estas alterações podem ser induzidas tanto pela proteína E6, quanto pela proteína E7 (LU et al., 2004). Foi mostrado em estudos anteriores que E6 é capaz de induzir a degradação da proteína TSC-2, um dos reguladores negativos da atividade de mTOR (LU et al., 2004).

Em nosso estudo o tratamento com a Rapamicina não mudou de maneira significativa o padrão de expressão de proteínas associadas à regulação/execução

de apoptose em células que expressam o gene E6 de HPV16 e HPV11. Por outro lado, observamos que culturas em monocamada e organotípicas que expressam E6 tanto de HPV11 como de HPV16 apresentaram resistência ao efeito antiproliferativo da Rapamicina (figuras 7D, 8D, 11 e 12). Além disso, observamos que as culturas organotípicas com as células controles pLXSN e pBabe tratadas com Rapamicina apresentaram nitidamente um achatamento em todas as camadas do epitélio quando comparadas aos controles que não receberam tratamento (figuras 27A, 27B, 27E e 27F) ou com as células que expressam a proteína E6 de HPV16 e HPV11 tratada ou não com este agente (figuras 27C, 27D, 27G, 27F 28 e 29). Isso pode indicar que a rapamicina ao inibir a síntese proteica seira capaz de reduzir o tamanho celular, contribuindo assim para o achatamento geral dos epitélios. Esses resultados estão de acordo com um estudo que mostrou que o tamanho celular é controlado pela proteína mTOR através da atividade de seus alvos efetores S6K1 e 4EBP/eIF4E (FINGAR et al., 2002). Também foi observado que o tratamento com a Rapamicina não afetou a morfologia dos epitélios e nem a proliferação de células que expressam E6 de HPV16 e HPV11 (figuras 27C, 27D, 27G, 27F 28 e 29). Este resultado indica que a proteína E6 de HPV16 e HPV11 é capaz de induzir resistência ao efeito antiproliferativo da rapamicina. Interessantemente, a proteína E6 é capaz de induzir a degradação da proteína TSC-2, um regulador negativo de mTOR (LU et al., 2004). É possível que o aumento do tamanho celular observado após a expressão da proteína E6 nas culturas organotípicas, esteja relacionado à maior atividade da proteína mTOR, já que o seu regulador negativo não encontra-se presente nas células contendo essa proteína viral. Por outro lado, um estudo anterior mostrou que a rapamicina pode promover apoptose em células que não apresentam p53 e p21 funcionais (HAUNG et al., 2001). E pelo fato de E6 de HPV de alto risco ser capaz de induzir a degradação de p53, este evento poderia permitir não só que a via de mTOR permanecesse ativada, mas, também poderia conferir maior sensibilidade as células que expressam E6 a ação citotóxica da rapamicina, evento este que não foi observado em nosso estudo.

Alguns dos resultados obtidos na análise da expressão de proteínas envolvidas no processo de apoptose foram confirmados através de ensaios de *Western blot*. Primeiramente, foi feita a análise de expressão proteica para a proteína PCNA. O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) é um marcador

de atividade proliferativa e pode ser usado como um indicador útil do comportamento biológico de alguns tumores. A concentração do PCNA é variável durante as etapas do ciclo celular, sendo maior na fase G1 tardia, com picos na fase G1/S, estando praticamente ausente na fase G2 e M (HALL et al., 1990).

Nossos resultados mostram que os níveis dessa proteína em células que expressam E6 de HPV16 (pLXSN16 E6) não foi alterado pelo tratamento com as citocinas ou Rapamicina. Por outro lado, os níveis de PCNA foram drasticamente reduzidos em células transduzidas com o vetor vazio (pLXSN) ou em células que expressam E6 de HPV11 tratadas com TNF+TRAIL e Rapamicina (figuras 13A e 13B). Esses resultados indicam a existência de diferenças na atividade das proteínas E6 de HPV de alto e baixo risco oncogênico. É importante salientar que as diferenças dos efeitos observados entre as células que expressam E6 de HPV16 ou HPV11 parecem depender do modelo utilizado. Por exemplo, observamos que tanto E6 de HPV11 com E6 de HPV16 conferem resistência a TNF+TRAIL em culturas em monocamada (figuras 10C e 12). No entanto, apenas E6 de HPV16 teve esse efeito em cultura organotípica (figura 13A).

Seguidamente analisamos a expressão dos receptores de morte da família do fator de necrose tumoral (TNF), TNFR1 e DR5 e da proteína adaptadora FADD que estão envolvidos diretamente na via extrínseca da apoptose. Além disso, determinamos os níveis de Survivina e XIAP que são IAPs, uma classe de proteínas reguladoras que exercem seu papel anti-apoptótico através da capacidade de inibir a atividade das caspases efetoras. Ainda mais, verificamos a expressão da SMAC/Diablo, uma proteína mitocondrial com função pró-apoptótica que exerce sua função como uma inibidora de IAPs. Finalmente, estudamos a expressão da proteína Caspase 3 ativa (clivada) que é a proteína chave para o processo de ativação da cascata proteolítica que acontece durante a apoptose (BAUD et al., 2001; DU et al., 2000; GONZALVEZ et al., 2010; KISCHKEI et al., 1995; PORTER et al., 1999; SHI et al., 2002).

Estudos anteriores mostraram que a proteína E6 de HPV16 é capaz de interagir com o receptor TNFR1, inibindo a sinalização apoptótica desencadeada pela ativação da via extrínseca. Além disso, já foi observado que E6 de HPV16 se

liga diretamente ao receptor 1 do fator de necrose tumoral (TNFR1). Essa interação inibe a associação de TNFR1 com a molécula adaptadora TRADD, bloqueando o receptor TNFR1 ao domínio de morte (DD) (DUERKSEN-HUGHES et al., 1999; FILLIPOVA et al., 2002). Interessantemente, foi observado em nosso estudo que as células expressam o gene E6 de HPV16 e HPV11 apresentam maior expressão de TNFR1 quando comparadas as células controle (figuras 14A-B). Esta observação parece incompatível com os resultados obtidos nas análises de proliferação que mostram que E6 de HPV16 induz resistência ao efeito antiproliferativo de TNF e TRAIL. Duas explicações que não são mutualmente excludentes podem ser consideradas. Primeiro é possível que este receptor não esteja funcional devido à interação física com a proteína E6 (DUERKSEN-HUGHES et al., 1999; FILLIPOVA et al., 2002). Além disso dados recentes de nosso laboratório mostram que o TNFR1 está localizado em vesículas intracelulares em queratinócitos que expressam E6 e E7 de HPV16, sugerindo que as proteínas virais podem alterar a localização do mesmo. Novos estudos são necessários para determinar o papel das oncoproteínas de HPV na atividade de TNFR1 (figuras 14A-B).

Nesse estudo também analisamos a expressão proteica de um dos receptores da via de TRAIL, o DR5, que mostrou um padrão semelhante ao TNFR1 em células que expressam E6 de HPV16, onde observamos um aumento da expressão dessa proteína quando comparadas as células controle (pLXSN) (figura 16 A). Já nas células que expressam E6 de HPV11 observamos uma redução dessa proteína quando comparadas as células controle (pBabe) (figura 16B).

Analisamos também a proteína inibidora de apoptose survivina que além de ser uma IAP também funciona como um regulador chave da mitose e da apoptose. Na mitose a survivina é um componente essencial para a segregação dos cromossomos, atuando também na citocinese. Ela também está diretamente associada com a tubulina polimerizada e ainda contribui para a regulação da dinâmica dos microtúbulos. (LIF; AMBROSINI, 1998). Na apoptose a survivina pode inibir a caspase 9 ativa e com isso ela ocupa uma posição central no equilíbrio dinâmico dos fatores pró-apoptóticos e anti-apoptóticos (DOHI et al., 2004) Sua função é inibida pela proteína SMAC/Diablo.

Observamos em nossos resultados que os níveis dessa proteína são maiores nas células que expressam o gene E6 de HPV16 tratadas ou não, quando comparados aos níveis das células controles. Já se sabe de estudos anteriores que E6 de HPV 16 pode regular positivamente a survivina (BORBELY., 2006). Em nosso estudo esse dado foi confirmado. Além disso pode-se observar que mesmo com os tratamentos, as células que expressam E6 de HPV16, apresentaram uma maior expressão da survivina quando comparadas as células que expressam o gene com E6 de HPV11. Pode observar também que os tratamentos com as citocinas TNF+TRAIL e a Rapamicina foram os que mais reduziram o nível da proteína survivina nas células que expressam E6 de HPV11 (figura 17B). A expressão do gene da survivina é transcricionalmente reprimida pelo supressor tumoral p53, e pode ser desregulada por vários mecanismos, incluindo a amplificação dos genes, hipometilação, aumento da atividade do promotor e perda da função de p53. O aumento da expressão da survivina em pacientes com câncer é um marcador de prognóstico desfavorável, correlacionado com a diminuição da sobrevivência (DOHI et al., 2004).

A atividade da survivina é regulada pela proteína pró-apoptótica SMAC/Diablo. Quando a célula detecta tensão intrínseca somente as proteínas pró-apoptóticas da família BH3 tornam-se ativas, anulando a função das proteínas anti-apoptóticas (DU et al, 2000). Isso permite a formação de poros na membrana mitocondrial pelas proteínas Bak e Bax. Esse evento permite a liberação de SMAC/Diablo do espaço intermembrana para o citoplasma. Ali SMAC/Diablo se liga as proteínas inibidoras de apoptose (IAPs). Dessa maneira, SMAC/Diablo impede que as IAPs se liguem às caspases e bloqueiem a apoptose (DU et al, 2000). Assim, a hiper expressão de SMAC/Diablo resulta em um aumento da sensibilidade celular a estímulos apoptóticos (VERHAGEN et al., 2000). Mudanças nos níveis de expressão de SMAC/Diablo foram encontrados em vários tipos de cânceres humano, incluindo melanoma, câncer de ovário e próstata (VERHAGEN et al., 2000).

Em nosso estudo observamos que SMAC/Diablo é mais expressa em células transduzidas com o gene E6 de HPV16 (figura 18A) quando comparadas ao seu controle. Observamos também que nas células que expressam o gene E6 de HPV11 e seu controle (pBabe) houve um aumento da expressão da proteína SMAC/Diablo

apenas quando essas células foram tratadas com TRAIL ou TNF+TRAIL (figura 18B). O padrão de expressão de SMAC/Diablo observado em células que expressam E6 de HPV16 é semelhante ao observado para a proteína survivina. Isto sugere que nas células que expressam E6 de HPV16 existe um balanço entre essas duas proteínas, e que o equilíbrio entre as mesmas pode evitar que ocorra a apoptose. Além disso, estudos anteriores mostraram que a proteína E6 de alto risco oncogênico é capaz de bloquear a apoptose através da sua interação com a proteína pró-apoptótica Bak. E6 de HPV de alto risco liga-se a Bak e induz a sua degradação via ubiquitina-proteossoma (MAGAL et al., 2005; THOMAS; BANKS, 1998). Conforme descrito acima, a inibição de Bak pode bloquear a liberação de SMAC/Diablo. Portanto, seria interessante determinar a localização intracelular deste fator nas células em estudo.

Analizamos também a expressão da proteína caspase 3 ativa, a proteína chave para a indução de toda cascata proteolítica, sendo ela responsável pela clivagem e ativação das demais caspases executoras como as caspases 6 e 7 (PORTER et al., 1999). As caspases sinalizam para a apoptose e clivam substratos levando a condensação e fragmentação nuclear, externalização de fosfolípidios de membrana que irão sinalizar para que estas células sejam fagocitadas por macrófagos (NICHOLSON et al., 1997). Algumas caspases atuam no sistema imune, promovendo a maturação de citocinas pró-inflamatórias e também na ativação da resposta imune inata (BOATRRIGHT et al., 2003). São conhecidas 14 caspases humanas, sendo seis: caspase 3, 6, 7, 8, 9 e 10, participam da apoptose, enquanto as caspases 1, 4, 5, 11, 12, 13 e 14, estão envolvidas na maturação de citocinas (BOATRRIGHT et al., 2003). Observamos que os níveis da proteína caspase 3 ativa tiveram um claro aumento após o tratamento com TNF+TRAIL (figuras 16A e 16B). Interessantemente, este aumento foi maior nas culturas controle do que nas culturas que expressam a proteína E6 de HPV 16 e HPV11. Esses resultados sugerem que as proteínas E6 de HPV de alto e baixo risco oncogênico conferem resistência ao efeito pró-apoptótico desencadeado pelo tratamento com TNF+TRAIL.

A última proteína que teve sua expressão proteica analisada nesse estudo, foi a inibidora de apoptose XIAP, que pode ser induzida por infecção viral ou por um aumento da produção de caspases. Sua inibição é regulada por duas proteínas

mitocondriais: SMAC/DIABLO e HTRA2 (DUCKETT et al., 1998). Um estudo anterior mostrou que a proteína XIAP diferencia-se de outros IAPs humanos, por que é capaz de prevenir eficazmente a morte celular provocada por TNF, Fas, luz UV e alguns agentes genotóxicos (DEVERAUX et al., 1999). Além disso, a sua desregulação está envolvida em doenças neurodegenerativas, cânceres e doenças auto-imunes (DEVERAUX et al., 1999). Em nossos resultados observamos que os níveis de expressão da proteína XIAP foram semelhantes nas células que expressam a proteína E6 de HPV16 e HPV11 e também em seus controles (pLXSN e pBabe) (figuras 20A e 20B). Além disso, observamos que houve uma diminuição dessa proteína nas células que expressam a proteína E6 de HPV11 quando tratadas com as citocinas TNF+TRAIL e com a Rapamicina (figura 20B).

A partir desses resultados, avaliamos também a expressão da caspase 3 ativa nos tecidos obtidos a partir das culturas organotípicas que expressam E6 de HPV16 e HPV11. A ativação da proteína caspase 3 é um dos mecanismos centrais que regulam o processo apoptótico (TYAS et al., 2000). Através de sua ativação, a caspase 3 é capaz de induzir a clivagem proteolítica de várias proteínas celulares e induzir a apoptose de maneira irreversível (TYAS et al., 2000). A detecção da caspase 3 ativada pelo método de imunohistoquímica é amplamente utilizada para a detecção de apoptose (OLNEY et al., 2002). E foi utilizada nos cortes obtidos através das culturas organotípicas de queratinócitos que expressam a proteína E6 de HPV16 e HPV11 e seus controles.

Observamos a marcação para caspase 3 ativa nas culturas organotípicas com as células que expressam E6 de HPV16 e HPV11 e seus controles pLXSN e pBabe, antes e após o tratamento com as citocinas TNF+TRAIL. Através da identificação de corpúsculos apoptóticos foi possível evidenciar que o tratamento simultâneo com as citocinas TNF+TRAIL não promoveu apoptose nas culturas organotípicas controle (figuras 30A, 30B, 30E e 30F). Além disso, a expressão da proteína E6 de HPV16 e HPV11 também não tornou os queratinócitos mais sensíveis a possível ação citotóxica das citocinas (figuras 30C, 30D, 30G e 30H). Interessantemente, nas células que expressam E6 de HPV11 não observamos aumento do número de corpúsculos apoptóticos quando comparado a as células controle pBabe e também as células que expressam E6 de HPV16; apesar dessas células não conseguirem

degradar p53. Sabe-se que a proteína p53 estável favorece a indução de apoptose (JONES et al., 1997). Uma explicação para este resultado seria que mesmo sem conseguir degradar p53, a proteína E6 de baixo risco consegue através de outras vias bloquear a apoptose. Um estudo recente mostrou que E6 de HPV6 e HPV11 é capaz de degradar a proteína pró-apoptótica Bak via proteólise dependente de ubiquitina (UNDERBRINK et al., 2016) e assim, bloquear a sua função de despolarização da membrana mitocondrial, impedindo que proteínas como o citocromo c saia para o citoplasma e formem com APAF1 e pró-caspase 9 o apoptossomo que clivaria a caspase 3 e ativaria toda a cascata proteolítica.

Mostramos neste estudo que as células que expressam o gene E6 de HPV16 e HPV11 apresentaram maior viabilidade após os tratamentos com as citocinas TNF, TRAIL e com a Rapamicina e foram também mais resistentes ao efeito simultâneo das citocinas TNF+TRAIL quando comparadas as células controle. Além disso, mostramos que células que expressam E6 dos dois tipos virais apresentam alterações no perfil de expressão de proteínas envolvidas na regulação da apoptose. Particularmente, observamos que a proteína E6 de HPV16 interfere com a indução de diversos fatores pró-apoptóticos na presença de citocinas. Finalmente mostramos que as culturas organotípicas transduzidas com E6 apresentam epitélios maiores e com maior proliferação de células da camada basal quando comparados às culturas controle. Por último, mostramos que a marcação com caspase 3 ativa não revelou indução de apoptose em nenhuma dessas linhagens celulares, mostrando que as proteínas E6 de HPV16 e HPV11 conferem resistência aos queratinócitos transduzidos com esses genes. Esta informações podem ser exploradas para ajudar na compreensão das diversas interações que a proteína E6 de HPV possui com as vias de sinalização da apoptose.

6 CONCLUSÕES

Células que expressam o gene E6 de HPV16 e E6 de HPV11 foram mais resistentes ao efeito antiproliferativo de TNF, TRAIL e da Rapamicina em culturas em monocamada.

A proteína E6 de HPV16 interfere com a indução dos fatores pró-apoptóticos com Bad, pró-caspase 3, Fas, FADD e HtrA/Omi em resposta ao tratamento com TNF+TRAIL.

As células que expressam E6 de HPV16 e HPV11 apresentam níveis aumentados das proteínas TNFR1 e DR5 (receptores de morte), Survivina e XIAP (inibidores de apoptose), e da proteína pró-apoptótica SMAC/Diablo.

Os epitélios das culturas organotípicas que expressam a proteína E6 de HPV16 e E6 de HPV11 são claramente maiores e apresentaram maior proliferação na camada basal. Ambas as proteínas virais induzem resistência ao efeito antiproliferativo da Rapamicina. Por outro lado, apenas E6 de HPV16 induz resistência ao tratamento com TNF+TRAIL.

REFERÊNCIAS*

ALTS GROUP – THE ATYPICAL SQUAMOUS CELL OF UNDETERMINED SIGNIFICANCE/LOW-GRADE SQUAMOUS INTRAEPITHELIAL LESIONS TRIAGE STUDY. Human Papillomavirus testing for triage of women with cytology evidence of low-grade squamous intraepithelial lesions: Baseline data from a randomized trial. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 92, p. 397-402, 2000.

BARNHART, B.C.; LEE, J.C.; ALAPPT, E.C.; PETER, M.E. The death effector domain protein family. **Oncogene**, v. 22, p. 8634-8644, 2003.

BASILE, J.R.; ZACNY, V.; MÜNGER, K. The cytokines tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and TNF-related apoptosis-inducing ligand differentially modulate proliferation and apoptotic pathways in human keratinocytes expressing the human papillomavirus-16 E7 oncoprotein. **J Bio Chem.** v. 22, p. 22522-22528, 2001.

BAUD, V.; KARIN, M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. **Trends in Cell Biology**, v. 11, p. 327-334, 2001.

BAUER, H.M.; TING, Y.; GREER, C.E.; CHAMBERS, J.C.; TASHIRO, C.J.; CHIMERA, J.; REINGOLD, A.; MANOS, M.M. Genital human papillomavirus infection in students as determined by a PCR-based method. **JAMA**, v. 265, p. 472-477, 1991.

BEEVERS, C.; Li, F.; Liu, L.; Huang, S. Curcumin inhibits the mammalian target of rapamycin-mediated signaling pathways in cancer cells". **Int J Cancer**, v. 119, p. 757-764, 2006

BENTO, C. A.; BANKS, T. A.; WARE, C.F. Death and survival viral regulation of TNF Signaling pathways. **Opin Immunol**, v. 15, p. 59-65, 2003.

BOATHIGHT, K.M.; SALVESEN, G.S. Mechanisms of caspase activation. **Curr Opin Cell Biol**, v. 15, p. 725-31, 2003.

BOCCARDO, E. **Efeito do Fator de Necrose Tumoral-Alfa (TNF- α) sobre Células Imortalizadas por Papilomavírus Humano (HPV)**. 2002 Tese de Doutorado – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

BOCCARDO, E.; NOYA, F.; BROKER, T.R.; CHOW, L.T.; VILLA, L.L. Resistance to TNF- α mediated cell proliferation arrest and dna synthesis inhibition by hpv-18 oncoproteins in organotypic cultures of primary human keratinocytes. **Virology**, v. 328, p. 233-243. 2004.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BOCCARDO, E.; LEPIQUE A.P.; VILLA, L.L. The role of inflammation in HPV carcinogenesis. **Carcinogenesis**. V.31, p.1905-1912, 2010.

BORBELY, A.A.; MURVAI, H.; KONYA, J.; BECK, Z.; GERGELY, G.; LI, F.; VERESS, L. Effects of papillomavirus type 16 oncoproteins on surviving gene expression. **J Gen Virol**. V.87,p.287-294.

BOSCH, X.F.; MANOS, M.M.; MUNÓZ, N.; SHERMAN, M.; JANSEN, A.M.; PETO, J.; SHIFFMAN, M.H.; MORENO, K.R.; SHAH. K. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 87, p. 796-802, 1995.

BROWN, D.R.; FIFE, K.H. Human papillomavirus infections of the genital tract. **Med. Clin. North Am.**, v. 74, p. 1455-1485, 1990.

CHOW, L.T.; BROKER, T.R. In vitro experimental systems for HPV: epithelial raft cultures for investigations of viral reproductions and pathogenesis and for genetic analyses of viral proteins and regulatory sequences. **Clin Dermatol.**, v.15, p. 217-227,1997.

CHOI, M.; LEE, S.; CHOI, T.; LEE, C. Roles of the PDZ domain-binding motif of the human papillomavirus type 16 E6 on the immortalization and differentiation of primary human foreskin keratinocytes. **Virus Genes.**, v.48, p. 224-232, 2014.

CROOK, T.; TIDY, J.A.; VOUSDEN, K.H. Degradation of p53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and trans-activation. **Cell.**, v. 67, p.547-556, 1991.

CURTIN, J.F.; COTLER, T.G. Live and let die: regulatory mechanisms in FAS-mediated apoptosis. **Cellular Signalling**, v.15, p. 983-992, 2003.

DEVERAUX, Q.L.; REED, J.C. IAP family proteins suppressors of apoptosis. **Genes Dev.**, v.13,p. 239-252, 1999.

DEVIN, A.; LIN, Y.; YAMAOKA, S.;LI, Z.;KARIN, M.; LIU Z.G. The alpha and beta subunits of IKappa B Kinase (IKK) mediate Traf12-dependent IKK recruitment to tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 in response to TNF. **Molecular and Cellular Biology**,v. 21, p. 3986-3994, 2000.

DE VILLIERS, E.M. Taxonomic classification of human papillomavirus. **Papillomavirus Report.**, v.12,p. 57-63, 2001.

DILLING, M.B.; DIAS, P.; SHAPIRO, D.N.; GERMAIN, G.S.; JOHNSON, R.K.; HOUGHTON, P.J. Rapamycin selectively inhibits the growth of childhood rhabdomyosarcoma cells through inhibition of signaling via the type I insulin-like growth factor receptor. **Cancer Res.**, v.15, p. 903-907, 1994

DOHI, T.; BELTRANI, E.; WALL, N.R.; PLESCIA, J.; ALTIERI, D.C. Mitochondrial Survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenes. **J Clin Invest.**,v.114, p.1117-1127, 2004.

DOWLING, R.J.; TOPISIROVIC, I.; FONSECA, B.D.; SONENBERG. N. Dissecting the role of mTOR: lessons from mTOR inhibitors. **Biochim Biophys Acta.**, v.1804, p.433-439, 2010.

DUERKSEN-HUGHES, P.J., YANG, J., SCHWARTZ, S.B.HPV 16 E6 blocks TNF-mediated apoptosis in mouse fibroblast LM cells. **Virology.**, v. 264, p. 55–65, 2004.

DU, C.; FANG, M.; LI, Y.;WANG, X. SMAC a mitochondrial protein that promotes cytochrome c –dependent caspase activation during apoptosis. **Cell.**, v.102, p.33-42, 2000.

DU, M.; FAN, X.; HONG, E.; CHEN, J.J. Interaction of oncogenic papillomavirus E6 proteins with fibulin-1. **Biochem Biophys Res Commum.**, v.30., p. 962-969, 2002.

DUCKETT, C.S.; LI, F.; WANG, Y.; TOMASELLI, K.J.; THOMPSON, C.B.; ARMSTRONG, R.C. Human IAP-like protein regulates programmed cell death downstream of Bcl-xL and cytochrome c. **Mol Cell Biol.**, v.18, p. 608-615, 1998.

DULONG, E.A.; TEE, A.R. Mammalian target of rapamycin complex 1 :signaling inputs substrates and feedback mechanisms. **Cell Signal.**, v.21, p.827-835, 2009.

EMERY, J.G.; MCDONNELL, P.; BURKE, M.B.; DEEN, K. C.; LYN, S.; SILVERMAN, C.; DUL, E.; APPELBAUM, E.R.; EICHMAN, C.; DIPRINZIO, R.; DODDS, R.A.; JAMES, I.E.; ROSENBERG, M.; LEE, J.C.; YOUNG, P.R. Osteoprogenin is a receptor for cytotoxix ligand TRAIL. **J Biol Chem.** v. 5, p. 14363 -14367, 1998.

FILIPPOVA, M.; SONG, H.; CONNOLLY, J.L.; DERMODY, T.S.; DUERKSEN-HUGHES, P.J; The human papillomavirus 16 E6 protein binds to tumor necrosis factor (TNF) R1 and protects cells from TNF-induced apoptosis. **J Biol Chem.**, v.277, p.21730-21739, 2002.

FILIPPOVA, M.; PARKHURST, L.; DUERKSEN-HUGHES, P.J. The human papillomavirus 16 E6 proteins binds to Fas-associated death domain and protects cells from Fas-triggered apoptosis. **J. Biol. Chem.** v.279, p.25729-25744, 2004.

FILLIPOVA, M.; BROWN-BRYAN, T.A.; CASIANO, C.A.; DUERKSEN-HUGUES, P.J. The human papillomavirus 16 E6 protein protect or further sensitize cells to TNF:effect of dose. **Cell Death Differ.**, v.12, p.1622-1635, 2005.

FINGAR, D.C.; SALAMA, S.; TSOU, C.; HARLOW, E.; BLENIS, J. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. **Genes Dev.** v.15, p. 1472-1487, 2002.

GARNETT, T, O.; FILIPPOVA, M.; DUERKSEN-HUGHES, P.J. Accelerated degradation of FADD and procaspase 8 in cells expressing human papillomavirus 16 E6 impairs TRAIL-mediated apoptosis. **Cell Death Differ.**, v.13, p.1915-1926, 2006.

- GEWIN, L.; GALLOWAY, D. A.; E box-dependent activation of telomerase by human papillomavirus type 16E6 does not require induction of c-myc. **J Virol.**, v. 75, p. 7198-7201, 2001.
- GEWIES, A. Introduction to Apoptosis. **Apo Review** 2003.
- GIODINI, A.; KALLIO, M.J.; WALL, N.R. Regulation of microtubule stability and mitotic progression by Survivin. **Cancer Res.**, v. 62, p. 2462-2467, 2002.
- GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, B. A. Apoptosis: Programmed Cell Death. **Revista Brasileira de Cancerologia.**, v.53, p. 335-343, 2007.
- GUESS, J.C.; McCANCE, D.J. Decreased migration of Langerhans precursor-like cells in response to human keratinocytes expressing human papillomavirus type 16 E6/E7 is related to reduced macrophage inflammatory protein-3 α production. **J Virol.**, v.79, p.14852-14862, 2005.
- GOEGAN, P.; JOHNSON, G.; VINCENT, R. Effects of Serum Protein and Colloid on the Alamar Blue Assay in Cells Cultures. **Toxic In Vitro.**, v. 9, p.257-266, 1995.
- GONZAVEZ, F.; ASHKENAZI, A. New insights into apoptosis signaling by APO2L/TRAIL. **Oncogene.**, v. 29, p.4752-4765, 2010.
- GUPTA, S. A decision between life and death during TNF α -induced signaling. **J Clin Immunol.**, v.22, p. 185-194, 2002.
- HALL, P.A.. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. **J Pathol**, v.162, p.285-294, 1990.
- HEBNER, C.M.; LAIMINS, L.A. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. **Rev Med Virol.**, v.16, p.83-97, 2006.
Human papillomaviruses: ba
- HORTON, L.E.; BUSHELL, M.; BARTH-BAUS, D.; TILLERAY, V.J.; CLEMENS, M.J.; HENSOLD, J.O. p53 activation results in rapid dephosphorylation of the eIF4E-binding protein 4E-BP1, inhibition of ribosomal protein S6 kinase and inhibition of translation initiation. **Oncogene.**, v. 21, p.5325-5334, 2002.
- HOWLEY, P.M.; LOWY, D.R. Papillomaviruses. In: KNIPE, D.M.; FIELDS, B.N.; HOWLEY, P. M.; **Fields Virology** . 15rd ed. Philadelphia: Lippincott-Wilkins, 2007. p. 2299-2354.
- HUANG, Y.; PARQUE, Y.C.; RICH, R.L.; SEGAL, D.; MYSZKA, D.G.; WU, H. Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain. **Cell**. 104(5): 781-90, 2001.
- HUIBREGSTE, 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. **EMBO J.**, v.10, p.4129-4135, 1991.

HUIBREGSTE, J.M.; SCHEFFNER, M.; HOWLEY, P. M. Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins. **Mol Cell Biol.**, v.13, p.4918-4927, 1993.

IARC – INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Human papillomavirus, Lyon: IARC; (Monographos on the Evaluation of Carcinogenic Risks to humans, 2009.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil, Rio de Janeiro, 2016.

JIANG, P.; YUE, Y. Human papillomavirus oncoproteins and apoptosis. **Exp Ther Med.** v.7, p.3-7,2014.

JONES, D.L.; MUNGER, K. Analysis of the p53-mediated G1 growth arrest pathway in cells expressing the human papillomavirus types 16E7 oncoprotein. **J Virol.** v.71, p. 2905-12, 1997.

JUNQUEIRA, L.C.U. Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo: Livraria Editora Santos, 1983. (100 p.)

KABSCH, K.; ALONSO, A. The human papillomavirus type 16 E5 protein impairs TRAIL-and FasL-mediated apoptosis in HaCaT cells by diferente mechanisms. **J Virol.** v.76, p.12162-12172, 2002.

KAUFMANN, S.H., EARNSHAW, W. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. **Exp. Cell Res.** v.1, p. 42–49, 2000.

KLINGELHUTZ, A.J.; FOSTER, S.A.; MCDUGALL, J.K. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. **Nature.**, v.380, p. 379-381, 1996.

KISCHKEL, F.C.; HELLBARDT, S.; BEHRMANN, I.; GERMER, M., PAWLITA., M.; KRAMER, P.H. Cytotoxicity-dependent APO-1 (FAS/CD95) associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. **The EMBO Journal.**, v.14, p.5579-5588, 1995.

KULASINGAM, S.L.; HUGUES, J.P.; KIVIAT, N.B.; MAO, C.; WEISS, N.S.; KUYPERS, J, M.; KOUTSKY, L.A. Evaluation of human papillomavirus testing in primary screening for cervical abnormalities: comparison of sensitivity, specificity And frequency of referral. **JAMA.** v. 9, p.1749-1757, 2002.

LE BLANC, H.N.; ASHKENAZI, A. Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. **Cell Death Differ**, v.10, p. 66-75, 2003.

LECHNER, M.S.; MARCK, D.H.; FINICLE, A.B.; CROOK, T.; VOUSDEN, K.H.; LAIMINS, L.A. Human papillomavirus E6 proteins bind p53 in vivo and abrogate p53-mediated repression of transcription. **EMBO J.**, v.11, p.3045-3052, 1992

- LEVINE, A.J.; FENG, Z.; MAK, T.W.; YOU, H.; JIN, S. Coordination and communication between the p53 and IGF-1-AKT-TOR signal transduction pathways. **Genes Dev.** v.20, p. 267-275, 2006.
- LI P, NIJHAWAN D, BUDIHARDJO I, SRINIVASULA SM, AHMAD M, ALNEMRI ES, WANG X. Citocromo c e dATP dependente formação de Apaf-1 / caspase-9 complexo inicia uma protease cascata apoptótica. **Cell.**, v. 91, p. 479-489, 1991.
- LI, F.; AMBROSINI, G.; CHU, E.Y. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by Survivin. **Nature.**, v.396, p.:580-584, 1998.
- LU, Z.; HU, X.; LI, Y.; ZHENG, L.; ZHOU, Y.; JIANG, H.; NING, T.; BAZANG, Z.; ZHANG, C.; KE, Y. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein interferences with insulin signaling pathway by binding to tuberin. **J Biol Chem.**, v. 279, p.35664-35670, 2004.
- MAGAL, S.S.; JACKMAN, A.; ISH-SHALOM, S.; BOTZER, L.E.; SCHLEGEL, R.; SHERMAN, L. Downregulation of Bax mRNA expression an protein stability by the E6 protein of human papillomavirus 16. **J Gen Virol.** v.86, p. 6116-21, 2005.
- MARKOWITZ, D.; GOFF, S.; BANK, A. Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line. **Virology.**, v.167, p.400-406, 1988.
- McMURRAY, H.R.; NGUYEN, D.; WESTBROOR, T.F.; MCANCE, D.J. Biology of human papillomavirus. **Int J Exp Pathol.** v. 82, p.15-33, 2001.
- McMURRAY, H. R.; McCANCE, D. J. Human Papillomavirus Type 16 E6 Activates TERT Gene Transcription through Induction of c-Myc and Release of USF-Mediated Repression. **J Virol.** v. 77, p. 9852–9861, 2003.
- MIGHEL, A. PCNA and p53. **Eur. J. Cancer B. Oral Oncol.**, v.31, p. 403-04, 1995.
- NAGATA S. Apoptose por fator de morte celular; **J Chem.**, v.88, p. 355-365. 1997.
- NICHOLSON, D.W.; THORNBERRY, N.A. Caspases: Killer proteases. **Thends Biochem Sci.**, v. 22, p.299-306, 1997.
- OLNEY, J.W.; TENKOVA, T.; DIKRANIAN, K.; MUGLIA, J.; JERMAKOWICZ, W.J.; D'SA, C.; ROTH, K.A. Ethanol-induced caspase-3 activation in the in vivo developing mouse brain. **Neurobiol Dis.** v.9, p. 205-219, 2002.
- PAN, G.; ROUKE, K.; CHINNAIYAN A.M.; GENTZ, R.; EBNER, R.; NI, J.; DIXIT V.M. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. **Science.**, v.276, p. 111-113, 1997.
- PORTER, A.G.; JANICKE, R.U. Emerging roles of caspase 3 in apoptosis. **Cell Death Differ**, v.6, p. 99-104, 1999.
- SEDDER, L.M.; SHOWS, D.M.; BLATON, R.A.; PESCHON, J.J.; GOODWIN, R.G.; COSMAN, D. IFN-gama mediates a novel antiviral activity thought dynamic modulation of TRAIL receptor expression. **J Immunol.**, v.163, p. 920-926,1999.

SEGHAL, S.N. Sirolimus: its discovery, biological properties and mechanism of action. **Transplant Proc.**, v.35, p. 7S-14S, 2003.

SCHLECHT, N.F.; KULAGA, S.; ROBITAILLE, J.; FERREIRA, S.; SANTOS, M.; MIYAMURA, R.A.; DUARTE-FRANCO, E.; ROHAN, T.E.; FERENCZY, A.; VILLA, L.L.; FRANCO, E.L. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. **JAMA**, Vol., v. 286, p. 3106-3114, 2001.

SCHMALTZ, C.; ALPDOGAN, O.; KAPPEL, B.J.; ROTOLO, J.A.; ONGCHIN, J.; WILLIS, L.M, GREENBERG, A.S.; ENG, J.M.; CRAWFORD, J.M.; MURPHY, G.F.; YAGITA, H.; WALCZAK, H.; PESCHON, J.J.; VAN DER BRINK M.R. T cells require TRAIL for optimal grat-versus-tumor activity. **Nat Med. Dec.**, v. 8, p. 1433-1437, 2002.

SHAMIR, E.R.; EWALD, A.J. Three-dimensional organotypic culture: experimental models of mammalian biology and disease. **Nat Rev Mol Cell Biol.**,v.15, p.647-64, 2014.

SHI, Y. Mechanisms of caspases activation an inhibition during apoptosis. **Moll Cell.**, v.9, p.459-470, 2002.

STELLER, M.A., ZOU, Z., SCHILLER, J.T., BASERGA, R. Transformation by human papillomavirus 16 E6 and E7: role of the insulin-like growth factor 1 receptor. **Cancer Res.** v.56, p. 5087–5091, 1996.

TALIS, A.L.; HUIBREGTSE, J.M.; HOWLEY, P. M. The role of E6AP in the regulation of p53 protein levels in human papillomavirus (HPV)-positive and HPV-negative cells. **J Bio Chem.**, v.273, p. 6439-6445, 1998.

TAYLOR, R.C.; CULLEN, S.P.; MARTIN, S.J. Apoptosis controlled demolition at the cellular level. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v.9, p.231-241, 2008.

TOGBE, D.; SCHYDER-CANDRIAN, S.; SCHNYDER, B.; DOZ, E.; NOULIN, N.; JANOT, L.; SECHER, T.; GASSE, P.; LIMA, C.; COELHO, F.R.;VASSEUR, V.;ERARD, F.; RUFFEL, B.; COUILLIN, I.; MOSER, R. Toll-like receptor and tumor necrosis factor dependent endotoxin-induced acute lung injury. **Int J Exp Pathol.**, v. 88, p. 387-391, 2007.

TONG, X.; HOWLEY, P.M. The bovine papillomavirus E6 oncoprotein interacts with paxillin and disrupts the actin cytoskeleton. **Proc Natl Acad Sci.**, v.94, p. 4412-4417,1997.

TRACEY, D.; KLARESKOG, L.; SASSO, E.R.; SALFED, J.G.; TAK, P.P. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: **A comprehensive rewien. Pharmacol Ther.**, v.117, p. 244-279, 2008.

TYAS, L.; BROPHY, V.A.; POPE, A.; RIVETT, A.J.; TAVARE, J.M. Rapid caspase-3 activation during apoptosis revealed using fluorescence-resonance energy transfer. **EMBO Rep.**, v.3, p. 266-270, 2000.

UNDERBRINK, M.P.; HOWIE, H.L.; BEDARD, K.M.; GALLOWAY, D.A. E6 proteins from multiple human betapapillomavirus types degrade Bak and protect keratinocytes from apoptosis after UVB irradiation. **J Virol.**, v.82, p.10408-10417, 2008.

UNDERBRINK, M.P.; DUPUIS, C.; TYRING, S.K. E6 Proteins from Low Risk Human Papillomavirus Types 6 and 11 are able to protect Keratinocytes from Apoptosis via Bak degradation. **J Gen Virol.**, v.97, p.715-724, 2016.

WALLACE, N.A.; GALLOWAY D.A. Novel Functions of the Human Papillomavirus E6 Oncoproteins. **Annu Rev Virol.**, v.2, p. 403-423, 2015.

WANG, X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. **Genes Dev.**, v.22, p.2922–2933, 2001.

VAN CRUCHTEN S, VAN DEN BROECK W. Aspectos morfológicos e bioquímicos de apoptose, oncosis e necrose. **Anat Histol Embryol.**, v. 31, p.214-223, 2002.

VAN DER BRULE, A.; MEIJER, C.; BARKELS, V., KENEMANS, P.; WALBOOMERS, J. Rapid detection of human papillomavirus in cervical scrapes by combined general primer-mediated and type-specific polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol.**, v. 28, p.2739-2743, 1990.

VELDMAN, T.; LIU, X.; YUAN, H.; SCHLEGEL, R. Human papillomavirus E6 and Myc protein associate in vivo and bind to and cooperatively active the telomerase reverse transcriptase promotor. **Proc Natl Acad Sci.** v.100, p. 8211-8216, 2003.

VERHAGEN, A.M.; EKRET, P.G.; PAKUSCH, M.; SILKE, J.; CONNOLLY, L.M.; REIDGE E. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. **Cell.**, v.102, p.43-53, 2000.

VILLA, L.L.; VIEIRA, K.B.L.; PEI, X.; SCHLEGEL, R. Differential effect of tumor necrosis factor on proliferation of primary human keratinocytes on cell lines containing human papillomavirus types 16 and 18. **Molec Carcinog.**, v. 6, p. 5-9, 1992.

VILLA, L.L. Human papillomavirus and cervical cancer. **Adv. Cancer Res.**, v.71, p. 321-341, 1997.

VIEIRA, K.B.L.; GOLDSTEIN, D.V.; VILLA, L.L. Tumor necrosis factor α interferes with the cell cycle of normal and papillomavirus immortalized human keratinocytes. **Cancer Res.**, v.56, p.2452-2457, 1996.

ZHOU, J.; FRAZER, I.H. Papovaviridae: capsid structure and capsid protein function. In: LACEY, C. editor. Papillomavirus: current research on papillomavirus. **London: Leeds University Press**; v.10, p. 93-100, 1996.

ZUR HAUSEN, H. Papillomavirus infections: a major cause of human cancer. **Biochim Biophys Acta.** v.1288, p.55-78, 1996.

ZUR HAUSEM, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nat Rev Cancer**, v. 2, p.342-350, 2002.