BRUNA PRATI

**O PAPEL DA PROTEÍNA TREX1 NA TUMORIGENESE EM CÉLULAS
INFECTADAS PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO**

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

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Enrique Mario Boccardo Pierulivo

Versão original

São Paulo
2020

RESUMO

Prati B. O papel da proteína TREX1 na tumorigenese em células infectadas pelo papilomavírus humano. 2020. 111f. [Tese (Doutorado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2020.

Os papilomavírus humanos (HPV) são vírus de DNA que infectam epitélios em regiões anatômicas específicas. Alguns tipos de HPV, denominados de “alto risco oncogênico”, têm associação etiológica com o câncer do colo do útero. Esses vírus expressam dois oncogenes, *E6* e *E7*, que interagem com vários fatores celulares, alterando o ciclo celular, o programa de diferenciação dessas células e evadindo as vias de sinalização do sistema imunológico do hospedeiro. A nuclease TREX1 desempenha um papel importante no reparo do DNA e na resposta imune inata da célula ao eliminar o acúmulo de DNA nos compartimentos intracelulares e reprimindo a ativação da resposta inflamatória, além de estar envolvida na modulação da atividade antiviral e morte celular programada. Observamos um aumento de TREX1 em linhagens celulares derivadas de tumores da cérvix uterina positivas para HPV (HeLa e SiHa), em culturas organotípicas estabelecidas a partir de queratinócitos que expressam os genes de *E6* e *E7* do HPV 16 ou transfectadas com o genoma completo do HPV16 e HPV18. Interessantemente, o silenciamento de TREX1 em células derivadas de tumores da cérvix uterina reduziu a viabilidade e a capacidade de formação de colônias em ensaio clonogênico e em soft-água das linhagens HeLa, SiHa e C33A. Além disso, HeLa e SiHa exibem uma regulação positiva de p53 e caspase 3 paralela à regulação negativa nos níveis de proteínas associadas à proliferação celular (PCNA, ciclina A, D e CHK2) e ao acúmulo de células em sub G1, após o silenciamento de TREX1. E ainda, queratinócitos expressando *E7* do HPV16 apresentam uma maior redução da viabilidade após o silenciamento de TREX1. Observamos diferenças na expressão de genes envolvidos na via de *toll-like receptor* com a presença de *E6* e *E7* do HPV16 em QPH silenciados para TREX1. Finalmente, em amostras cervicais e em bancos de dados TREX1 está regulado positivamente, correlacionando-se com a progressão da lesão durante o processo de carcinogênese.

Palavras chave: HPV. Câncer do colo do útero. TREX1. Tumorigênese.

Abstract

Prati B. The role of the TREX1 protein in tumorigenesis in cells infected with human papillomavirus. 2020. 111f. [Thesis (PhD in Microbiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2020 .

Human papillomaviruses (HPV) are DNA viruses that infect epithelia in specific anatomical regions. Some types of HPV, called “high oncogenic risk”, have an etiological association with cervical cancer. These viruses express two oncogenes, E6 and E7, which interact with various cellular factors, altering either the cell cycle, differentiation program of these cells and evading as signaling pathways of the host's immune system. A TREX1 nuclease plays an important role in DNA repair and also immune response of the cell by eliminating the accumulating DNA in the intracellular compartments and suppressing the activation of the inflammatory response, besides to being involved in the modulation of antiviral activity and programmed cell death. We observed an TREX1 increase on cell lines derived from cervical cancer positive for HPV (HeLa and SiHa), in organotypic cultures associated with queries of genes expressed in the HPV 16 E6 and E7 genes transfected with the complete HPV16 and HPV18 genome. Interestingly, the silencing of TREX1 in cells derived from tumors of uterine cervixes reduces the viability and the capacity of colony formation in clonogenic and soft-agar assays of the HeLa, SiHa and C33A strains. In addition, HeLa and SiHa exhibit a positive change in p53 and caspase 3 parallel to the negative reduction in the levels of protein related to cell proliferation (PCNA, cyclin A, D and CHK2) and to the increase in cells in sub G1, after TREX1 silencing. Even so, the express orders for E7 the HPV show a greater reduction in viability after silencing the TREX1. Observe differences in the expression of genes involved the toll-like receptor pathway with the presence of E6 and E7 from HPV16 in PHK silencing of TREX1. Finally, in cervical samples and in databases, TREX1 is positively regulated, correlating with the progress of the lesion during the process of carcinogenesis.

Keywords: HPV. Cervical cancer. TREX1. Tumorigenesis.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Os Papilomavírus Humanos e o Câncer.

Os papilomavírus humanos (HPV) pertencem à família *Papillomaviridae*. São vírus não envelopados com capsídeo icosaédrico com um diâmetro de 50 a 60 nm. O seu genoma é composto por DNA de fita dupla circular e contém cerca de 8.000 pares de bases. Esses vírus apresentam tropismo por queratinócitos de epitélios escamosos da pele e de mucosas e dependem da diferenciação epitelial para a conclusão do seu ciclo de vida, figura 1 (Doorbar, 2005; McMurray *et al.*, 2001).

Mais de 200 tipos de HPV estão descritos na literatura, dos quais, aproximadamente, 40 tipos infectam a mucosa anogenital. Esses vírus são classificados como de baixo ou alto risco oncogênico, associado a infecção em função ao tipo de lesão (Bosch e Munoz, 2002; IARC, 2012.). A infecção persistente por alguns tipos de HPV é o principal fator de risco para o câncer do colo do útero com a presença desse vírus sendo detectada em quase a totalidade dos carcinomas. Mais ainda, os HPV de alto risco estão associados, a uma porcentagem significativa de carcinomas anais, vulva, pênis, orofaringe, cabeça e pescoço (zur Hausen, 2002; IARC, 2007; INCA, 2020).

No contexto da infecção pelo HPV em mulheres, os HPV6 e HPV11, por exemplo, são classificados como de baixo risco oncogênico e estão associados a lesões de baixo grau e verrugas genitais. Entretanto, estudos epidemiológicos e evidências mecanísticas levaram à classificação dos tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59 como carcinogênicos e HPV68 como provavelmente carcinogênico, esses tipos são chamados de alto risco e estão associados a lesões de alto grau e ao câncer do colo do útero. Os tipos 16 e 18 estão presentes em 70% dos casos de câncer do colo do útero (IARC, 2012; INCA, 2020).

Aparentemente, a célula alvo do HPV, no colo uterino, é derivada de uma discreta população de células que se localiza na região da junção escamo-colunar podendo originar sua patologia (Herfs *et al.*, 2012). Sendo assim, o câncer do colo do útero pode ser dividido histologicamente em dois tipos principais: carcinoma de células escamosas, o qual surge na ectocérvice e na junção escamo-colunar e adenocarcinoma, o qual surge no epitélio glandular da endocérvice (IARC, 2012).

A infecção genital por esse vírus é muito frequente e não causa doença na maioria das vezes. Sendo assim, a infecção pelo HPV é um fator necessário, mas não suficiente, para o desenvolvimento do câncer e muitos anos transcorrem desde a infecção inicial, alterações celulares importantes até o aparecimento de lesões e, posteriormente, ao câncer. Além disso, outros fatores parecem influenciar os mecanismos incertos que determinam a progressão das lesões, como: imunidade, genética, hormônios, comportamento sexual e estilo de vida (Bosch *et al.*, 2002; Louie *et al.*, 2009; IARC, 2012).

Estima-se que aproximadamente 291 milhões de mulheres estão infectadas por HPV genitais no mundo todo. A cada ano, cerca de 500 mil novos casos de câncer do colo do útero são diagnosticados e aproximadamente, 270 mil mulheres morrem por causa desta doença. É importante salientar que a grande maioria dos casos (86%) e das mortes (88%) ocorre em países em desenvolvimento. No Brasil, o carcinoma do colo do útero é o segundo tipo de tumor mais comum entre as mulheres, com a estimativa de 16.590 novos casos em 2020 e a quarta causa de morte (6.385 em 2017) (GLOBOCAN, 2018; INCA, 2020). Em 2014, o ministério da saúde implementou no calendário vacinal, a vacina tetravalente contra o HPV para meninas de 9 a 13 anos. A partir de 2017, o Ministério estendeu a vacina para meninas de 9 a 14 anos e meninos de 11 a 14 anos. Essa vacina protege contra os tipos 6, 11, 16 e 18 do HPV (INCA, 2020).

Além disso, aproximadamente 90% dos cânceres anais e uma proporção relevante de outros carcinomas (orofaringe, pênis, vagina e vulva) são atribuídos à infecção por este vírus. Em conjunto, a infecção por HPV é responsável por 4,5% dos tumores que afetam a população humana no mundo (Tota *et al.*, 2011; Martel, *et al.* 2017).

O genoma do HPV pode ser dividido em três regiões funcionais: (A) uma região reguladora não codificante, denominada região reguladora *upstream* (URR do inglês *upstream regulatory region*) ou região controladora longa (LCR), que modula a replicação do genoma viral e a transcrição de genes virais; (B) uma região que contém os genes precoces de HPV (E1, E2, E4, E5, E6, E7), que codificam para proteínas envolvidas na persistência, na replicação e na transcrição do genoma viral e na regulação da proliferação celular; e (C) uma região tardia compostas de dois

genes, L1 e L2, que codificam para a proteína principal e a proteína secundária do capsídeo, respectivamente, figura 1 (Howley e Lowy, 2007; McMurray *et al.*, 2001).

Os genes precoces E1 e E2 do HPV codificam para as proteínas que estão envolvidas na replicação do epissoma viral recrutando a maquinaria de replicação celular para a origem de replicação. Além disso, a proteína E1 tem atividade de helicase e a proteína E2 também atua na atividade transcricional regulando a região LCR. A proteína E4 está envolvida com a maturação viral e a proteína E5 estimula a proliferação, mediada pelo fator de crescimento EGF, e a evasão da resposta imune, sendo considerada sua atividade transformante (DiMaio *et al.*, 2013; Howley e Lowy, 2007). As proteínas E6 e E7 regulam a proliferação e a progressão do ciclo celular, principalmente, interagindo com as proteínas supressoras de tumor p53 e pRb, respectivamente (McMurray *et al.*, 2001; Doorbar, 2005).

O ciclo de vida do HPV depende do processo de diferenciação celular para a regulação da replicação de seu genoma e para a expressão de proteínas virais. Essas proteínas virais apresentam funções tanto na replicação do genoma viral quanto na regulação do ciclo da célula hospedeira, permitindo superar diferentes pontos de controle do ciclo celular e possibilitando divisão celular contínua, mesmo em células que iniciaram o processo de diferenciação (zur Hausen, 2002).

Figura 1 – O genoma do HPV e seu ciclo de vida **A)** O ciclo de vida do HPV e a expressão das proteínas virais ao longo da diferenciação do epitélio estratificado escamoso. A infecção inicial do HPV ocorre nas células da camada basal através de microlesões no epitélio. O seu genoma é mantido na forma de epissoma e em baixo número de cópias, onde o ciclo viral segue conforme a diferenciação do epitélio até a formação de novos vírus com a descamação da camada córnea. **B)** Representação esquemática do genoma do HPV16 e suas regiões funcionais representação das ORFs que codificam as diferentes proteínas virais (precoces e tardias) região controladora longa (LCR) Fonte: (FRAZER, 2004)

1.2 As proteínas do HPV e o ciclo celular.

O HPV não codifica proteínas capazes de replicar seu genoma. Portanto, deve induzir à célula hospedeira a reentrar na fase S do ciclo celular para utilizar sua maquinaria de replicação e duplicar seu DNA. Isso se dá através da ação de proteínas virais específicas sobre vários fatores envolvidos na regulação levando a progressão do ciclo celular. As principais proteínas envolvidas nesse processo são as codificadas pelos genes E6 e E7.

Os produtos dos genes E6 e E7 são proteínas relativamente pequenas, com um comprimento de aproximadamente 150 e 100 aminoácidos, respectivamente, e

são capazes de interagir com vários fatores celulares. Entre essas interações, destaca-se a capacidade da proteína E6 em ligar à ubiquitina ligase celular E6AP levando a um deslocamento conformacional, que permite a formação de um complexo trimérico E6/E6AP/p53, promovendo a degradação da proteína supressora de tumor p53 pela via de proteólise dependente de ubiquitina (Scheffner *et al.*, 1990; Crook *et al.*, 1991; Lechner *et al.*, 1992). A proteína E6 também pode ativar a expressão de subunidade catalítica da telomerase (hTERT) em células primárias, impedindo a senescência celular (Van Doorslaer, 2012).

A proteína E7 é capaz de unir-se e inativar, uma das principais proteínas supressoras de tumor, a proteína do retinoblastoma (pRb) e interromper a interação de pRb com o fator E2F (Dyson *et al.*, 1989; Barbosa *et al.*, 1990; Boyer *et al.*, 1996). Além disso, E7 é capaz de alterar a função de inibidores de quinases dependentes de ciclinas, como p21 e p27 (Münger *et al.*, 1989; Helt e Galloway, 2003). A proteína E7 pode favorecer a progressão do ciclo celular regulando a expressão de ciclinas, atividade de complexos CDK, cullin 2, histona desacetilase e AP1 fazendo com que a célula reentre na fase S do ciclo celular e sintetize o DNA viral (McMurray *et al.*, 2001; McLaughlin-Drubin *et al.*, 2009).

Além disso, as proteínas codificadas pelos genes E6 e E7, denominadas oncoproteínas, presentes nos HPV de alto risco oncogênicos, apresentam uma maior interações com as proteínas celulares. Mais ainda, os oncogenes E6 e E7 são os únicos genes do HPV expressos em todos os tumores do colo do útero e nas linhagens celulares derivadas desses carcinomas e suas oncoproteínas cooperam para imortalizar queratinócitos humanos *in vitro* (Halbert *et al.*, 1992; Halbert *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1997; Münger *et al.*, 1989; Watanabe *et al.*, 1989; Zur Hausen, 1996). Acredita-se que estas interações desempenham um papel fundamental no processo de transformação celular induzida pelo HPV, sendo necessários eventos genéticos adicionais suficientes para o desenvolvimento do tumor, figura 2.

Cervical Cancer

Figura 2 - O ciclo do HPV e a progressão do câncer do colo do útero: A infecção do epitélio pelo HPV onde o ciclo viral segue conforme a diferenciação do epitélio até a formação de novos vírus. No caso de uma infecção persistente, o HPV pode se integrar no DNA na célula hospedeira próximo a regiões do gene E2, que regula a transcrição, levando ao aumento da expressão das proteínas virais E6 e E7, responsáveis em controlar o ciclo celular, resultando na proliferação celular descontrolada e consequentemente no desenvolvimento do câncer. Esquema do vírus do HPV, capsídeo icosaédrico com um diâmetro de 50 a 60 nm e seu genoma composto por DNA de fita dupla circular.

1.3 As proteínas do HPV e a instabilidade genética.

Resultados de diferentes estudos mostram que durante infecções persistentes por HPV de alto risco oncogênico e as interações de suas proteínas com as proteínas celulares podem desencadear instabilidade genética. O reparo do dano ao DNA é necessário para a estabilidade do genoma, prevenindo a transformação celular e a supressão do tumor. Essa via, quando desregulada, pode levar a doenças tais como, o envelhecimento prematuro, doenças neurodegenerativas e diferentes tipos de câncer (Jackson, *et al.*, 2009).

Alguns tipos de lesões podem ativar vias de respostas do dano do DNA, através da fosforilação de proteínas quinases como *ataxia telangiectasia mutated* (ATM) e *ataxia telangiectasia and Rad3 related* (ATR) que apresentam um elevado grau de interferência e conectividade. Assim, essas vias podem ativar a fosfatase Cdc25 e o fator de transcrição p53, inativando as quinases dependentes de ciclinas (CDK) e inibindo a progressão do ciclo celular através da ativação de *checkpoints* específicos (Sancar A, *et al.*, 2004). A complexidade na regulação do ATR e ATM por proteínas de HPV de alto risco indica que há diferenças entre os diferentes tipos,

e essas interações podem desencadear diferentes vias de respostas. No caso da via de ATM está mais consolidada com a expressão da oncoproteína E7 do HPV31 e HPV18, que foi demonstrado que se ligam diretamente a ATM e induz a expressão elevada e a fosforilação de ATM e CHK2 (Moody e Laimins, 2009 e Banerjee *et al.*, 2011). Além disso, ATM e ATR são constitutivamente ativadas nos queratinócitos HPV positivos, e o bloqueio da via de ATR/CHK1 regula negativamente a replicação produtiva do HPV e a expressão de genes virais tardios (Hong *et al.*, 2015).

É importante ressaltar que muitas proteínas das vias ATM e ATR se co-localizam com os locais de replicação do HPV, apoiando ainda mais o papel desses fatores no ciclo de vida do HPV. Mais ainda, as proteínas codificadas por E1 e E2, em células HPV positivas, recrutam proteínas envolvidas com o reparo do dano do DNA. As proteínas identificadas incluem aTrip, TOPbp1, fosfo-ATM, fosfo-H2AX, fosfo-p53, CHK1, CHK2, PCNA, RPA, NBS1, 53BP1, BRCA1, RAD51, MRE11 e Ku70/80 se colocam com o complexo de replicação do HPV (Gillespie *et al.*, 2012; Kadaja *et al.*, 2009; Reinson *et al.*, 2013; Sakakibara *et al.*, 2011; Swindle *et al.*, 1999; Wallace, Galloway, 2013).

Em 2007, Kadaja e colaboradores, relataram que como em uma reinfecção pelo vírus do HPV, com a expressão ectópica de E1 e E2 do HPV18, é possível reativar a origem de replicação do genoma viral integrado ao DNA da célula. Visto que, em uma infecção pelo HPV a origem da replicação viral pode ser desencadeada várias vezes durante o mesmo ciclo celular, levando ao efeito “casca de cebola”. Da mesma maneira, quando o genoma do HPV está integrado no genoma da célula essa reativação da origem pode gerar intermediários de replicação que estressam as moléculas de DNA, levando a quebras de fitas duplas ou únicas. Além disso, essa instabilidade recruta a maquinaria de reparo de DNA que ligam as extremidades soltas do DNA e promovem o rearranjo cromossômicos, levando ao acúmulo de defeitos (Kadaja M, *et al.*, 2007)

Além disso, a expressão de E6 e E7 em queratinócitos, estão envolvidos com a perda de fidelidade mitótica através da indução da amplificação dos centríolos, indução da aneuploidia, erros de segregação cromossômica e indução de quebras no DNA (Duensing e Münger, 2002; Ghittoni *et al.*, 2010; Korzeniewski *et al.*, 2011A, Korzeniewski *et al.*, 2011B). Mais ainda, foi observado que as proteínas E6 e E7 do

HPV16 são capazes de induzir números anormais de centrôssomos e fusos mitóticos com múltiplos polos (Duensing *et al.*, 2000) o que, certamente, favorece ao rápido acúmulo de alterações genéticas nas células infectadas pelo vírus. Esta hipótese é apoiada pela detecção de células altamente poliplóides e aneuplóides em lesões intraepiteliais de alto grau, figura 3 (Duensing *et al.*, 2000; Méhes *et al.*, 2004). O que põe em evidência a existência de um fenótipo de instabilidade genômica que pode ter um papel importante no acúmulo de mutações, favorecendo a progressão da lesão e ao tumor (Figura 3).

Figura 3: O HPV e a instabilidade genômica. Durante a infecção produtiva, a origem da replicação do HPV (Ori) é desencadeada várias vezes durante o mesmo ciclo celular, levando ao tipo de replicação denominada “casca de cebola”. Para mediar a amplificação do genoma e processar os intermediários de replicação do genoma viral, o HPV ativa e recruta vários componentes da resposta a danos no DNA (DDR). A integração do HPV no genoma celular pode surgir como consequência do reparo ativo de quebras de DNA. Este evento leva à regulação negativa de E2 e aumenta os níveis de transcritos e proteínas E6 e E7. Paralelamente à amplificação do genoma viral, a expressão dos oncogenes de HPV aumenta a vida útil da célula, induz alterações na segregação cromossômica, evita a apoptose e afeta o reparo do DNA, levando ao acúmulo de alterações no DNA celular. A presença da proteína E2, expressa a partir de genomas virais episomais coexistentes ou derivada da reinfecção do HPV, pode desencadear a replicação do genoma de HPV

integrado, causando o rápido aparecimento de quebras e rearranjos cromossômicos, contribuindo, ainda mais, para a transformação maligna (adaptado de Prati, *et al.*, 2018).

1.4 As proteínas do HPV e a evasão da resposta imune.

Os vírus quando presentes na célula podem ser reconhecidos por receptores celulares (PRRs - *pattern recognition receptors*), sendo identificados como não próprios (PAMPs - *pathogen-associated molecular patterns*), levando à ativação da via de sinalização do sistema imune inato, incluindo fatores reguladores de interferon (IRF) ativando, assim, a via de (STAT), aumentando a produção de citocinas como interferon (IFNs), efetor crítico de atividades antivirais e antitumorais, e interleucina 1 (IL-1) (Abbas, 2015, p. 51).

A grande maioria das infecções e uma proporção significativa de lesões neoplásicas causadas por HPV são eliminadas por uma resposta imunitária eficaz do indivíduo. Assim, em uma infecção por HPV é montada uma resposta imunológica como o aumento do fator de necrose tumoral (TNF) interleucina (IL) -1 e interferon (IFN) - α e - β (Stanley *et al.*, 2007). Consequentemente, *in vitro*, observa-se a inibição da transcrição de oncogenes e a diminuição do número de cópias do genoma viral em queratinócitos celulares tratados com essas citocinas (Herdman *et al.*, 2006). Por outro lado, a infecção persistente do HPV e sua associação com a inflamação crônica têm sido consideradas aspectos fundamentais no desenvolvimento do tumor junto à seleção do clone mais apto, sendo a inflamação considerada um cofator importante para o desenvolvimento do câncer (Balkwill *et al.*, 2001; Frazer, 2009; Stanley *et al.*, 2007).

Com tudo, para estabelecer uma infecção persistente, o HPV tende a evadir diversas vias de sinalização do sistema imunológico do hospedeiro. Isso inclui evadir a comunicação entre as células infectadas e as células inflamatórias impedindo a sinalização através de citocinas, quimiocinas e as vias apresentadoras de antígenos. As proteínas E6 e E7 promovem vários mecanismos de evasão da resposta imune, por exemplo, estas proteínas estão envolvidas na inibição dos fatores reguladores de interferon como IRF (*interferon regulatory factor*) 1 e 3, a inibição da síntese de interleucinas como IL8, a indução de IL1 e a diminuição da expressão das proteínas que transportam peptídeos para o retículo endoplasmático, como TAP (*transporter associated with antigen processing*) 1 e 2, dificultando a apresentação de antígenos

virais (Huang e McCance, 2002; Nees M, *et al.*, 2001; Ritz *et al.*, 2001; Stanley, 2007; Tindle, 2002).

Células que expressam E6 e E7 de HPV de alto risco apresentam inibição dos receptores envolvidos com o reconhecimento de patógenos, como a diminuição do receptor do tipo toll TLR9 (Hasan, *et al.* 2007). Além disso, essas células apresentam resistência ao efeito anti-proliferativo de TNF (Villa *et al.*, 1992; Delvenne *et al.*, 1995; Basile, *et al.*, 2001; Boccardo *et al.*, 2010^A; Cabeça *et al.*, 2019).

Diversos estudos têm mostrado o envolvimento do HPV na alteração de vias de sinalização mediadas por interferon. Alguns genes responsivos a intérferon podem estar regulados negativamente na presença das oncoproteínas virais do HPV. Por exemplo, a proteína E6 de HPV16 regula a expressão de proteínas envolvidas na resposta imune inata como IRF3 (*Interferon regulatory factor 3*) alterando a resposta ao interferon β (Ronco *et al.*, 1998). Em 2001, Bachmann e colaboradores mostraram que células tumorais HPV positivas perdem a capacidade de sintetizar interferon- β endógeno e expressar as proteínas IRF-1 e ISGF3 (*Interferon-stimulated gene factor 3*) em resposta ao tratamento com TNF.

Durante décadas se fez uso de intérferon no tratamento de lesões genitais causadas por HPV. Como resultado do tratamento observa-se apenas um efeito marginal na resolução dessas lesões, mostrando a capacidade de resistência do vírus a esse tratamento. Mais ainda, foi observado que o tratamento com IFN- β em células W12, linhagem derivada de uma lesão de baixo grau associada a HPV16 e que apresenta o genoma viral em forma epissomal, leva à rápida perda dos epissomos virais selecionando as células que apresentam o genoma integrado, que potencialmente apresentam maior expressão dos genes E6 e E7 (Herdman *et al.*, 2006). Na teoria, *in vivo*, um efeito deste tipo, mediado por células do infiltrado inflamatório como macrófagos e linfócitos T, poderia estar associado à progressão de lesões causadas pelo vírus (Kobayashi *et al.*, 2008; Hammes *et al.*, 2007).

Contudo, as oncoproteínas E6 e E7 estão envolvidas com a instabilidade genômica, proliferação da célula infectada e as respostas inflamatórias do indivíduo, podendo interferir com os aspectos críticos dos mecanismos antivirais do hospedeiro, favorecendo a persistência, a seleção e a progressão de lesões

associados ao vírus. Essa interação parece 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.

1.5 Mecanismos de imunidade celular e a proteína TREX1.

O sistema imune inato é a primeira linha de defesa contra agentes infecciosos na célula. O reconhecimento de diferentes padrões de patógenos se dá pela presença de receptores celulares que coordenam a transcrição de centenas de genes inflamatórios, cujos produtos controlam a infecção e ativam as células da primeira linha de defesa e, quando necessário, organizam e estimulam células T e B do sistema imune adaptativo (Abbas, 2015, p. 51). Os receptores do tipo toll (TLR) do tipo 1 reconhecem a presença de ácidos nucleicos no citosol, que ativam proteínas intermediárias das vias, como IRF3, IRF7, NF- κ B e/ou a pró-caspase-1, resultando na produção de interferon tipo 1 (IFN-1) e na maturação e secreção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF, interleucinas IL-1 β , IL-6 e IL-18. Além disso, algumas nucleases celulares, tais como a DNase II ou a DNase III /TREX1 (*Three Prime Repair Exonuclease 1*) desempenham um papel importante na resposta imune intrínseca da célula ao eliminar o acúmulo de DNA de patógenos nos compartimentos intracelulares e reprimindo a ativação da resposta inflamatória (Atianand e Fitzgerald, 2013).

O gene *TREX1*, codifica para a mais abundante exonuclease em células de mamíferos, que digere fita simples e dupla de DNA nos terminais 3'. Esse gene apresenta um único éxon, no cromossomo 3 da célula, mas com dois transcritos distintos, a variante 4 e a variante 5, que codificam para duas isoformas, a isoforma b com 314 aa e a isoforma c com 304 aa, respectivamente (NCBI). O RNAm de TREX1 está expresso em todos os tecidos e sua proteína se localiza no citoplasma da célula na forma de homodímero. A proteína TREX1 se associa com o retículo endoplasmático, e se desloca para o núcleo da célula na fase S do ciclo celular e em resposta ao estresse genotóxico. Sua função nas vias de reparo do dano do DNA se dá, principalmente, no reparo por excisão de bases, preferencialmente em DNA de fita dupla, onde nucleotídeos mal posicionados na porção 3' terminais são digeridos (Mazur e Perrino, 2001; Wang *et al.*, 2009; Orebaugh *et al.*, 2011).

Além disso, essa proteína é um componente importante do complexo SET composto por proteínas modificadoras da cromatina (SET, HMGB2 e pp32) e as nucleases (Ape1, NM23-H1 e TREX1). O complexo SET é responsável pelo dano do DNA ativado pelo granzima A via sinapse imunológica pelas células NK, além disso, ativa o dano no DNA em algumas formas de morte celular neuronal independente de caspase, através da via da asparagine endopeptidase (AEP) em resposta a acidificação celular. Algumas mutações de TREX1 tornam as células resistentes à morte celular programada, esse fato, pode ser importante para a defesa imunológica contra vírus e câncer que desenvolveram estratégias para evadir apoptose mediada por caspases (Chowdhury *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2008).

O papel de TREX1 é essencial na prevenção do acúmulo excessivo de DNA que pode ser gerado por intermediários gerados na replicação ou retroelementos endógenos expressos na célula. Essa degradação impede o acúmulo de DNA, responsável pela tolerância imune inata da célula, suprimindo a ativação inapropriada do sistema imune inato e inativando genes antivirais dependentes ou independentes de interferons do tipo I. A deficiência de TREX1 pode desencadear a imunidade celular de maneira dependente de GMP-AMP cíclica sintetizada (cGAS), a proteína GMP-AMP sintase (cGAS) desencadeia a reação de GTP para ATP para formar GMP-AMP cíclico (cGAMP) que se liga ao gene estimulador de interferon (STING), que desencadeia a fosforilação do IRF3 via TBK1, sendo a principal via sensora de DNA citoplasmático (Mazur e Perrino, 2001; Ablasser *et al.*, 2014).

Deficiências nessa exonuclease são observadas em doenças autoimunes e doenças inflamatórias como a síndrome de Aicardi-Goutières (doença cerebral neurológica grave que mimetiza uma infecção viral congênita), lúpus eritematosos sistêmico e lúpus *chilblain* (Kavanagh *et al.*, 2008, Lindahl *et al.*, 2009).

Em 2004, Morita e colaboradores, observaram que camundongos *knockout* para TREX1 apresentaram altos níveis de IFN- α ocasionando miocardite inflamatória com características autoimunes e reduzido tempo de vida. Além disso, em 2011, Serra e colaboradores, observaram que a ativação de macrófagos primários de murinos, com o tratamento com IFN- γ , induziu a expressão de mRNA e da proteína de TREX1 e que este efeito é dependente das proteínas c-Jun e STAT1.

Diversos estudos têm mostrado que a proteína TREX1 pode estar envolvida na regulação da resposta antiviral na célula. Por exemplo, foi observado que essa proteína é capaz de inibir a resposta imune inata em resposta à infecção pelo vírus HIV tipo 1. Esse vírus regula positivamente a expressão de TREX1 degradando os produtos de DNA virais não ativos e inibindo a via de interferon. Essa estratégia aumenta a capacidade do vírus de escapar da imunovigilância da célula, como foi visto, em células T CD4+ de rato e em macrófagos humanos infectados (Yan *et al.*, 2010).

Além disso, um estudo conduzido por Hasan e colaboradores (2013) mostrou que TREX1 está envolvida na regulação da biogênese lisossomal e de genes antivirais por vias independentes da ativação de interferon. Essa regulação ocorre rapidamente após a infecção e é funcionalmente importante para controlar a replicação viral. Esses autores observaram uma resistência à infecção por vírus da estomatite vesicular (VSV) e o aumento da expressão de genes antivirais em fibroblastos TREX1(-/-), como a molécula adaptadora STING, a quinase TBK1 e os fatores de transcrição IRF3 e IRF7, após serem infectadas com vírus de RNA.

Em 2009, Wang e colaboradores sugeriram que a proteína TREX1 não é essencial nas células tumorais e sua localização é tipo célula dependente. E que a sua atuação na degradação de DNA nessas células é um processo que antecede à fagocitose. Dados na literatura indicam que células do sistema imune, como células dendríticas, presentes no baço, apresentam uma alta expressão de TREX1 *in vivo* e *in vitro*. Também foi observado que suas células precursoras, derivadas da medula óssea, após o tratamento com interferons tipo 1 (IFN- α e IFN- β) ou ativação de TLR 3, 7 e 9 ou durante infecções por lentivírus, levam a um aumento na expressão de TREX1. Assim, essa proteína pode desempenhar um papel importante na ativação de células dendríticas (Jun Xu *et al.*, 2014).

Além disso, em 2012, Pulliero e colaboradores observaram que linfócitos T derivados de pacientes com síndrome Aicardi-Goutières, associada à mutação no gene TREX1, apresentaram alta capacidade em inibir a proliferação de células derivadas de neuroblastoma e a capacidade angiogênica de células endoteliais, em co-cultura. Interessantemente, os efeitos observados são potencializados na presença da citocina antitumoral IFN- α . Esses dados apoiam a ideia que a proteína

TREX1 pode estar envolvida na modulação da resposta imune e antiviral nas células. Ainda mais, sua expressão é célula específica e diferenças quantitativas parece influenciar o comportamento dessas células e nas comunicações intercelulares.

Estudos prévios, em nosso laboratório, demonstraram que há um grande número de genes envolvidos com no reparo do dano ao DNA diferencialmente expressos entre as células primárias (QPH) e as linhagens tumorais (HeLa, SiHa e C33A). No entanto, essa diferença varia quando considerada as diferentes linhagens tumorais e o conjunto de genes analisados. Nesse trabalho, observou-se um aumento de RNAm de TREX1 em linhagens celulares derivadas de tumores da cérvix uterina HPV positivas (HeLa e SiHa) e uma redução da expressão da linhagem HPV negativa (C33A) quando comparadas com queratinócitos normais (QPH). Além disso, observamos um aumento nos níveis de mRNA que codifica para TREX1 em culturas organotípicas estabelecidas a partir de queratinócitos que expressam os genes de E6 e E7 de HPV 16 e 11 quando comparadas com queratinócitos primários controle (Prati, 2016; Prati *et al.*, 2019).

Essas alterações na expressão gênica podem ter um papel importante no estabelecimento/progressão de tumores associados à infecção por HPV. Assim, escolhemos TREX1 para ensaios funcionais. Os resultados descritos acima mostram que a proteína TREX1 pode ter um papel importante no reparo do DNA, resposta inflamatória, antiviral, antitumoral e biogênese celular. Sua expressão é dependente do tipo celular e pode ser regulada por fatores envolvidos nas respostas mediada por interferon. Da mesma maneira, as proteínas do HPV estão envolvidas com alterações do ciclo celular, nas proteínas envolvidas com o reparo do DNA e nas vias de sinalização do sistema imune do hospedeiro, como alterações nas vias reguladas por interferon tipo I.

8. Conclusões

Observamos um aumento de TREX1 em linhagens celulares derivadas de tumores da cérvix uterina positivas para HPV (HeLa e SiHa), em culturas organotípicas estabelecidas a partir de queratinócitos que expressam os genes de E6 e E7 do HPV 16 ou transfectadas com o genoma completo do HPV16 e HPV18.

O silenciamento de TREX1 em células derivadas de tumores (HeLa, SiHa e C33A) reduziu a viabilidade e a capacidade de formação de colônias em ensaio clonogênico e em soft-ágar e levou ao acúmulo de células em sub G1.

Verificamos uma diminuição da proteína CHK2, PCNA e ciclina D nas linhagens tumorais (HeLa, SiHa e C33A) silenciadas para TREX1.

As linhagens HeLa e SiHa exibem uma regulação positiva de p53 e caspase 3 e é paralela à regulação descendente de proteínas associadas à proliferação celular (PCNA e a ciclina A). Estes efeitos são menos evidentes nos queratinócitos normais.

Queratinócitos expressando as oncoproteínas E6 e E7 do HPV16 apresentou um aumento de p53, redução da viabilidade e da capacidade de formação de colônias em ensaio clonogênico nas linhagens silenciadas para TREX1.

Queratinócitos expressando E7 e E6E7 de HPV16 ha um aumento da proteína pRb e diminuição de PCNA e p21 quando superexpressão TREX1

QPH normal e expressando apenas E7 do HPV16 resulta em níveis reduzidos p53 na superexpressão TREX1.

Genes envolvidos na via de toll-like receptor são diferencialmente expressos em QPH com E6 e E7 do HPV16 quando silenciados para TREX1.

Em amostras cervicais e bancos de dados TREX1 está regulado positivamente, correlacionando-se com a progressão da lesão durante o processo de carcinogênese.

Não observamos efeito aditivo de danos celulares na viabilidade nas células silenciadas quando tratadas com quimioterápicos (cisplatina e doxirrubicina).

REFERÊNCIAS:

Abbas, AK, Lichtman, AH, Pillai, S. Cellular and Molecular Immunology, eighth edition. ELSEVIER SAUNDERS. 2015. 517p.

Abjaude, WS. Estudo de letalidade sintética em células transformadas por papilomavírus humano (HPV). 2016. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo (USP). São Paulo.

Ablasser A, Hemmerling I, Schmid-Burgk JL, Behrendt R, Roers A, Hornung V. TREX1 deficiency triggers cell-autonomous immunity in a cGAS-dependent manner. J Immunol 2014; 192(12):5993-7.

Antinore MJ, Birrer MJ, Patel D, Nader L, McCance DJ. The human papillomavirus type 16 E7 gene product interacts with and trans-activates the AP1 family of transcription factors. EMBO J. 1996 Apr 15;15(8):1950-60.

Atianand MK, Fitzgerald KA. Molecular basis of DNA recognition in the immune system. *J Immunol.* 2013 Mar 1;190(5):1911-8. doi: 10.4049

Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet.* 2001 Feb 17;357(9255):539-45.

Banerjee NS, Wang HK, Broker TR, *et al.* Human papillomavirus (HPV) E7 induces prolonged G2 following S phase reentry in differentiated human keratinocytes. *J. Biol. Chem.*, 2011 286(17):15473-15482. doi:10.1074/jbc.M110.197574

Barbosa MS, Edmonds C, Fisher C, Schiller JT, Lowy DR, Vousden KH. The region of the HPV E7 oncoprotein homologous to adenovirus E1a and Sv40 large T antigen contains separate domains for Rb binding and casein kinase II phosphorylation. *EMBO J.* 1990. 9(1) : 153-60 .

Basile JR; Zacny V; Münger K. The cytokines tumor necrosis factor- α (TNF- α) and TNF-related apoptosis-inducing ligand differentially modulate proliferation and apoptotic pathways in human keratinocytes expressing the human papillomavirus-16 E7 oncoprotein. *J. Biol. Chem.*, 2001; 276, 22522–28.

Boccardo E, Lepique AP, Villa L. The role of inflammation in HPV carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2010-B vol.31 no.11 pp.1905–1912, doi:10.1093/carcin/bgq176

Boccardo E; Manzini Baldi CV; Carvalho AF; Rabachini T; Torres C; Barreta LA; Brentani H; Villa LL. Expression of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein alters keratinocytes expression profile in response to tumor necrosis factor- α . *Carcinogenesis*, 2010-A; 31, 521–531.

Bosch FX , Lorincz A , Muñoz N , *et al* .The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002;55:244–65. doi:10.1136/jcp.55.4.244

Bosch FX, Munoz N. The viral etiology of cervical cancer. *Virus Res.* 2002;89 (2): 183-90,1995.*Oncogene.* Mar; 2;10(5):927-36.

Boyer SN, Wazer DE, Band V. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res.* 1996 Oct 15;56(20):4620-4.

Cabeça TK, de Mello Abreu A, Andrette R, de Souza Lino V, Morale MG, Aguayo F7, Termini L, Villa LL, Lepique AP, Boccardo E. HPV-Mediated Resistance to TNF and TRAIL Is Characterized by Global Alterations in Apoptosis Regulatory Factors, Dysregulation of Death Receptors, and Induction of ROS/RNS. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES*, v. 20, n. 1, JAN 1 2019. doi: 10.3390/ijms20010198

Chowdhury D, Beresford PJ, Zhu P, Zhang D, Sung JS, Demple B, Perrino FW, Lieberman J. The exonuclease TREX1 is in the SET complex and acts in concert with NM23-H1 to degrade DNA during granzyme A-mediated cell death. *Mol Cell.* 2006;23:133–42.

Crook T, Tidy JA, Vousden KH. Degradation of p53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and trans-activation. *Cell*. 1991; 67(3) : 547-56.

Delvenne P; al-Saleh W; Gilles C; Thiry A; Boniver J. Inhibition of growth of normal and human papillomavirus-transformed keratinocytes in monolayer and organotypic cultures by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *Am. J. Pathol* 1995; 146, 589–598.

Demers GW, Foster SA, Halbert CL, Galloway DA: Growth arrest by induction of p53 in DNA damaged keratinocytes is bypassed by human papillomavirus 16 E7. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 4382–4386, 1994.

DiMaio D, Petti LM. The E5 proteins. *Virology*. 2013;445:99–114. doi: 10.1016/j.virol.2013.05.006.

Doorbar, J. The papillomavirus life cycle. *J. Clin. Virol*. 2005;32(Suppl 1)S7-S15.

Duensing S, Münger K. Human papillomaviruses and centrosome duplication errors: modeling the origins of genomic instability. *Oncogene* 2002; 21(40) : 6241-8.

Dyson, N., Howley, P. M., Münger, K. & Harlow, E. The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989; 243, 934–937

Eastman A., “Activation of programmed cell death by anticancer agents: cisplatin as a model system,” *Cancer Cells*. 1990;2;275–80.

Frazer, I. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Rev Immunol* 4, 46–55 (2004). <https://doi.org/10.1038/nri1260>

Frazer, I.H. Interaction of human papillomaviruses with the host immune system: a well evolved relationship. *Virology* 2009; 384, 410– 414.

Gewin L, and Galloway DA, E box-dependent activation of telomerase by human papillomavirus type 16 E6 does not require induction of c-myc. *J Virol*. 2001 Aug;75(15):7198-201. doi: 10.1128/JVI.75.15.7198-7201.2001

Ghittoni R, Accardi R, Hasan U, Gheit T, Sylla B, Tommasino M. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. *Virus Genes* 2010; 40(1) : 1-13.

Gillespie KA, Mehta KP, Laimins LA, Moody CA. Human papillomaviruses recruit cellular DNA repair and homologous recombination factors to viral replication centers. *J Virol*. 2012;Sep;86(17):9520-6. doi: 10.1128/JVI.00247-12.

GLOBOCAN (2018), Cancer incidence and mortality worldwide. (<http://www.dep.iarc.fr>), último acesso em 05.01.2020.

Gordon KM, Duckett L, Daul B, Petrie HT. A simple method for detecting up to five immunofluorescent parameters together with DNA staining for cell cycle or viability on a benchtop flow cytometer. *J Immunol Methods*. 2003 275(1-2): 113-21.

Guess CJ, McCance JD. 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*. 2005 Dec.;79(23): 14852-62.doi: 10.1128/JVI.79.23.14852-14862.

Halbert CL, Demers GW, Galloway DA. The E6 and E7 genes of human papillomavirus type 6 have weak immortalizing activity in human epithelial cells. *J Virol*.1992 ;66:2125-34.

Halbert CL, Demers GW, Galloway DA. The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *J Virol*.1991 Jan;65(1):473-8.

Hammes LS; Tekmal RR; Naud P; Edelweiss MI; Kirma N; Valente PT; Syrjänen KJ; Cunha-Filho JS. Macrophages, inflammation and risk of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) progression-clinicopathological correlation. *Gynecol. Oncol*. 2007; 105, 157–165.

Härtlova, A., Erttmann, SF, Raffi, FAM, Schmalz, AM, Resch, U., Anugula, S. *et al*. (2015) o dano ao DNA inicia o sistema de interferon tipo I viasensor de DNA citosólico STING para promover imunidade antimicrobiana inata. *Immunity* 42, 332–343 <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.01.012> .

Hasan M, Koch J, Rakheja D, Pattnaik AK, Brugarolas J, Dozmorov I, Levine B, Wakeland EK, Lee-Kirsch MA, Yan N. Trex1 regulates lysosomal biogenesis and interferon-independent activation of antiviral genes. *Nat Immunol*. 2013 Jan;14(1):61-71. doi: 10.1038/ni.2475.

Hasan UA, Bates E, Takeshita F, Biliato A, Accardi R, Bouvard V, Mansour M, Vincent I, Gissmann L, Iftner T, Sideri M, Stubenrauch F, Tommasino M. TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. *J Immunol*. 2007; 178(5) : 3186-97.

Helt AM, Galloway DA. Destabilization of the retinoblastoma tumor suppressor by human papillomavirus type 16 E7 is not sufficient to overcome cell cycle arrest in human keratinocytes. *J Virol*. 2001;75(15):6737-47. doi: 10.1128/JVI.75.15.6737-6747.2001.

Helt AM, Galloway DA. Mechanisms by which DNA tumor virus oncoproteins target the Rb family of pocket proteins. *Carcinogenesis* 2003; 24(2) : 159-69.

Herdman MT, Pett MR, Roberts I, Alazawi WO, Teschendorff AE, Zhang XY, Stanley MA, Coleman N. Interferon-beta treatment of cervical keratinocytes naturally infected with human papillomavirus 16 episomes promotes rapid reduction in episome numbers and emergence of latent integrants. *Carcinogenesis* 2006; 27, 2341–2353.

Herfs M, *et al*. A discrete population of squamocolumnar junction cells implicated in the pathogenesis of cervical cancer *PNAS* June 26, 2012 109 (26) 10516-10521; <https://doi.org/10.1073/pnas.1202684109>

Hong S, Cheng S, Iovane A, Laimins LA. STAT-5 Regulates Transcription of the Topoisomerase II β -Binding Protein 1 (TopBP1) Gene To Activate the ATR Pathway

and Promote Human Papillomavirus Replication. MBio. 2015;6(6):e02006-15, <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.02006-15>.

Howley PM, Lowy DR. Papillomaviruses. In: Knipe DM, Howley PM. Fields Virology. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams Wilkins; 2007. Cap. 62 p. 2299-354.

Huang SM, McCance DJ. Down regulation of the interleukin-8 promoter by human papillomavirus type 16 E6 and E7 through effects on CREB binding protein/p300 and P/CAF. *J Virol*. 2002; 76(17): 8710-21.

IARC. Biological Agents. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 2012;100B:1–475 (Accessed Jan ,24 2020-02-24 at <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100B/index.php>.)

Instituto Nacional Do Câncer (INCA): Estimativas 2020, Incidência de Câncer no Brasil (2020).

International Agency for Research on Cancer (IARC). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Human Papillomaviruses. Volume 90 (2007).

Jackson, S.P., Bartek, J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 2009; 461(7267):1071- 1078.

Jun Xu, Philip W. Zoltick, Ana M. Gamero, and Stefania Gallucci. TLR ligands up-regulate Trex1 expression in murine conventional dendritic cells through type I Interferon and NF-κB-dependent signaling pathways. *J Leukoc Biol* 2014; doi:10.1189/jlb.2A0713-393RR

Kadaja M, Isok-Paas H, Laos T, Ustav E, Ustav M. Mechanism of genomic instability in cells infected with the high-risk human papillomaviruses. *PLoS Pathog*. 2009;5(4):e1000397, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000397>.

Kadaja M, Sumerina A, Verst T, Ojarand M, Ustav E, *et al*. Genomic instability of the host cell induced by the human papillomavirus replication machinery. *Embo J*. 2007;26:2180–2191.

Kavanagh D, Spitzer D, Kothari PH, Shaikh A, Liszewski MK, Richards A, Atkinson JP. New roles for the major human 3'-5' exonuclease TREX1 in human disease. *Cell Cycle*. 2008 Jun 15;7(12):1718-25.

Kobayashi A; Weinberg V; Darragh T; Smith-McCune K. Evolving immunosuppressive microenvironment during human cervical carcinogenesis. *Mucosal Immunol*. 2008; 1, 412– 420.

Korzeniewski N, Spardy N, Duensing A, Duensing S. B- Genomic instability and cancer: lessons learned from human papillomaviruses. *Cancer Lett*. 2011; 305(2) : 113-22.

Korzeniewski N, Treat B, Duensing S. A- The HPV-16 E7 oncoprotein induces centriole multiplication through deregulation of Polo-like kinase 4 expression. *Mol Cancer* 2011; 10 : 61-65.

Kyo S, Klumpp DJ, Inoue M, Kanaya T, Laimins LA. Expression of AP1 during cellular differentiation determines human papillomavirus E6/E7 expression in stratified epithelial cells. *J Gen Virol*. 1997 Feb;78 (Pt 2):401-11.

Lace MJ, *et al*. Interferon regulatory factor (IRF)-2 activates the HPV-16 E6-E7 promoter in keratinocytes. *Virology* 2010; 399, 270–279.

Lampugnani M.G. Cell migration into a wounded area in vitro. *Methods in Molecular Biology*. 1999; 96 : 177-82.

Lechner MS, Mack DH, Finicle AB, Crook T, Vousden KH, Laimins LA. Human papillomavirus E6 proteins bind p53 in vivo and abrogate p53-mediated repression of transcription. *EMBO J*. 1992; 11(8) : 3045-52.

Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc*. 20072; (2) : 329-33.

Lindahl T, Barnes DE, Yang YG, Robins P. Biochemical properties of mammalian TREX1 and its association with DNA replication and inherited inflammatory disease. *Biochem Soc Trans*. 2009 Jun.;37(Pt 3):535-8. doi: 10.1042/BST0370535

Liu X, Han S, Baluda MA, Park N. HPV-16 oncogenes E6 and E7 are mutagenic in normal human oral keratinocytes. *Oncogene*. 1997 May;14(19): 2347-53.

Liu Z, Jang SW, Liu X, Cheng D, Peng J, Yepes M, Li XJ, Matthews S, Watts C, Asano M, *et al*. Neuroprotective actions of PIKE-L by inhibition of SET proteolytic degradation by asparagine endopeptidase. *Mol Cell* 2008;29:665–678. [PubMed: 18374643]

Louie KS, de Sanjose S, Diaz M, Castellsague X, Herrero R, Meijer CJ, Shah K, Franceschi S, Muñoz N, Bosch FX. Early age at first sexual intercourse and early pregnancy are risk factors for cervical cancer in developing countries. *Br J Cancer* 2009; 100: 1191– 7.

Maja T. Tomicic, Dorthe Aasland, Teodora Nikolova, Bernd Kaina, Markus Christmann. Human three prime exonuclease TREX1 is induced by genotoxic stress and involved in protection of glioma and melanoma cells to anticancer drugs. *Biochimica et Biophysica Acta* 1833 (2013) 1832–1843

Manawapat-Klopfer, A. *et al*. TMEM45A, SERPINB5 and p16INK4A transcript levels are predictive for development of high-grade cervical lesions. *Am J Cancer Res* 6, 1524–1536 (2016).

Maria S, Sonia-Vanina F, Selma PL, Jorge L, Antonio C. Characterization of Trex1 Induction by IFN-g in Murine Macrophages. *The Journal of Immunology* 2011; 186: 2299–2308.

Martel C, *et al*. Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. *Int. J. Cancer*, 141 (2017), pp. 664-670

Mazur DJ, Perrino FW. Structure and expression of the TREX1 and TREX2 3' -> 5' exonuclease genes. *J Biol Chem*. 2001; 276: 14718–27.

McLaughlin-Drubin ME, Münger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology*. 2009; 384(2) : 335-44.

McMurray HR; Nguyen D; Westbrook TF; McCanee DJ. Biology of human papillomavirus. *Int. J. Exp. Path.* 2001; 82, 15–33.

Moody CA, Laimins LA. Human papillomaviruses activate the ATM DNA damage pathway for viral genome amplification upon differentiation. *PLoS Pathog.*, 2009; 5(10):e1000605.

Morale MG, Abjaude WS, et al. HPV-transformed cells exhibit altered HMGB1-TLR4/MyD88-SARM1 signaling axis. *Sci Rep* **8**, 3476 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21416-8>

Morita M, Stamp G, Robins P, Dulic A, Rosewell I, Hrivnak G, Daly G, Lindahl T, Barnes DE Gene-targeted mice lacking the Trex1 (DNase III) 3'→5' DNA exonuclease develop inflammatory myocarditis. *Mol Cell Biol*. 2004 Aug;24(15):6719-27.

Münger K, Werness BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E, Howley PM. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J*. 1989; 8(13) : 4099-105.

Nees M, et al. Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation-associated and NF-kappaB-responsive genes in cervical keratinocytes. *J. Virol*. 2001; 75:4283-4296.

Orebaugh CD, Fye JM, Harvey S, Hollis T, Perrino FW. The TREX1 exonuclease R114H mutation in Aicardi-Goutières syndrome and lupus reveals dimeric structure requirements for DNA degradation activity. *J. Biol. Chem*. 2011 Nov 18;286(46):40246-54.

Prati B, Abjaude WS, Termini L et al. Three Prime Repair Exonuclease 1 (TREX1) expression correlates with cervical cancer cells growth *in vitro* and disease progression *in vivo*. *Sci Rep* **9**, 351 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37064-x>

Prati B, Marangoni B, Boccardo E. Human papillomavirus and genome instability: from productive infection to cancer *Clinics* (2018), 73 (Suppl 1) <http://dx.doi.org/10.6061/clinics/2018/e539s>

Prati, B. Expressão de genes de vias de reparo de dano ao DNA em células infectadas por papilomavírus humano (HPV). 2014. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42132/tde-12082014-175455/>>. Acesso em: 2019-12-30.

Pulliero A, Marengo B, Domenicotti C, Longobardi MG, Fazzi E, Orcesi S, Bianchi M, Balottin U e Izzotti A. Inhibition of neuroblastoma cell growth by TREX1-mutated human lymphocytes. *Oncology reports* 2012; 27: 1689-94.

Ritz U, Momburg F, Pilch H, Huber C, Maeurer MJ, Seliger B. Deficient expression of components of the MHC class I antigens processing machinery in human cervical carcinoma. *Int J Oncol.* 2001; 19:1211-21:.

Ronco LV, Karpova AY, Vidal M, Howley PM. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev.* 1998; 12(13) : 2061-72 .

Sakakibara, N, Mitra, R, McBride AA. The papillomavirus E1 helicase activates a cellular DNA damage response in viral replication foci. *J Virol.* 2011, 85(17); 8981–95. doi: 10.1128/JVI.00541-11

Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kaçmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem.* 2004;73:39-85. doi: 10.1146/annurev.biochem.73.011303.073723

Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell.* 1990; 63(6) : 1129-36.

Scotto, L. *et al.* Identification of copy number gain and overexpressed genes on chromosome arm 20q by an integrative genomic approach in cervical cancer: potential role in progression. *Genes Chromosomes Cancer.* 2008;47, 755–765, <https://doi.org/10.1002/gcc.20577>.

Sherman SED, Gibson D, Wang AHJ, Lippard SJ. “X-ray structure of the major adduct of the anticancer drug cisplatin with DNA: cis-[Pt(NH₃)₂{d(pGpG)}],” *Science.* 1985;230;4724:412–17.

Stanley MA; Sterling JC. HPV: from infection to cancer. *Biochem. Soc. Trans.* 2007; 35, 1456–1460.

Swindle CS, Zou N, Van Tine BA, Shaw GM, Engler JA, Chow LT. Human papillomavirus DNA replication compartments in a transient DNA replication system. *J Virol.* 1999; Feb;73(2):1001-9

Takemura G1, Fujiwara H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management. *Prog Cardiovasc Dis.* 2007;49(5):330-52.

Tindle RW. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002; Jan;2(1):59-65.

Tota JE, Chevarie-Davis M, Richardson LA, Devries M, Franco EL. Epidemiology and burden of HPV infection and related diseases: implications for prevention strategies. *Prev Med.* 2011; Oct;53 Suppl 1:S12-21. doi:10.1016/j.ypmed.2011.08.017

Van Doorslaer K, R.D. Burk. Association between hTERT activation by HPV E6 proteins and oncogenic risk *Virology.* 201; 433, pp. 216-219

Vanpouille-Box C, Alard A, Aryankalayil MJ, Sarfraz, Y, Diamond JM, Schneider RJ *et al.* A exonuclease de DNA Trex1 regulaimunogenicidade tumoral induzida por radioterapia. *Nat. Comum.* 2017;8, 15618. doi.org/10.1038/ncomms1561

Villa LL, Vieira KB, Pei XF, Schlegel R. Differential effect of tumor necrosis factor on proliferation of primary human keratinocytes and cell lines containing human papillomavirus types 16 and 18. *Mol. Carcinog.* 1992; 6, 5–9.

Wallace NA, Galloway DA. Manipulation of cellular DNA damage repair machinery facilitates propagation of human papillomaviruses. *Semin Cancer Biol.* 2014; [Epub ahead of print]. doi: [org/10.1016/j.semcancer.2013.12.003](https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2013.12.003)

Wang CJ, Lam W, Bussom S, Chang HM, Cheng YC. TREX1 acts in degrading damaged DNA from drug-treated tumor cells. *DNA Repair (Amst).* 2009; Oct 2;8(10):1179-89. doi: [10.1016/j.dnarep.2009.06.006](https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2009.06.006). Epub 2009 Jul 18.

Watanabe S, Kanda T, Yoshiike K. Human papillomavirus type 16 transformation of primary human embryonic fibroblasts requires expression of open reading frames E6 and E7. *J Virol.* 1989; Feb;63(2):965-9.

Wilson R, *et al.* MicroRNA regulation of endothelial TREX1 reprograms the tumour microenvironment. *Nat Commun* 7.2016;13597. doi:[org/10.1038/ncomms13597](https://doi.org/10.1038/ncomms13597).

Yan N, Regalado-Magdos AD, Stiggelbout B, Lee-Kirsch MA, Lieberman J. The cytosolic exonuclease TREX1 inhibits the innate immune response to human immunodeficiency virus type 1. *Nat Immunol.* Nov. 2010;11(11):1005-13. doi:[10.1038/ni.1941](https://doi.org/10.1038/ni.1941).

Zhai, Y. *et al.* Gene expression analysis of pre invasive and invasive cervical squamous cell carcinomas identifies HOXC10 as a key mediator of invasion. *Cancer Res* 67. 2007; 10163–10172, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-07-2056>

Zur Hausen H. Papillomavirus infections a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta.* 1996; Oct 9;1288(2):F55-78.

zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer* 2002; 2(5) : 342-50.