GABRIELA ÁVILA FERNANDES SILVA

**Estudo do papel estudo da proteína superóxido dismutase 2 (*SOD2*) no
processo de transformação celular mediado por *HPV***

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Oncologia

Orientadora: Dr^a. Lara Termini

Versão corrigida Resolução CoPGr 5890/11, de 13 de outubro de 2011. A versão
original está disponível na Biblioteca da FMUSP.

São Paulo

2018

GABRIELA ÁVILA FERNANDES SILVA

**Estudo do papel da proteína superóxido dismutase 2 (*SOD2*) no
processo de transformação celular mediado por *HPV***

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Oncologia

Orientadora: Dr^a. Lara Termini

São Paulo
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Gabriela Ávila Fernandes

Estudo do papel da proteína superóxido dismutase 2 (SOD2) no processo de transformação celular mediado por HPV / Gabriela Ávila Fernandes Silva. -- São Paulo, 2018.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Oncologia.

Orientadora: Lara Termini.

Descritores: 1.Superóxido dismutase 2.Citocinas
3.Estresse oxidativo 4.Papilomaviridae 5.Inflamação

USP/FM/DBD-118/18

À minha querida família pelo apoio incondicional

AGRADECIMENTOS

A Deus, que iluminou o meu caminho durante todo esse período.

Aos meus pais, por todo amor, apoio, dedicação, carinho, horas intermináveis de conversas e conselhos. Obrigada por entenderem meus sumiços nas horas de prazos apertados, escrita de relatórios, tese, realização de experimentos em feriados e fins de semana. Obrigada pelo suporte financeiro quando não havia bolsa. Obrigada por sempre me incentivarem a seguir esta carreira, este sonho. Vocês são tudo para mim! Não existem palavras que irão demonstrar o quão grata sou, por pais tão maravilhosos quanto vocês.

Ao meu companheiro de vida, Felipe, por todo amor, compreensão, apoio e paciência nesse período. Meus dias são sempre mais felizes com você! Obrigada por estar em todos os momentos comigo, por esperar os meus experimentos acabarem, não importando as horas, pelas nossas conversas filosóficas ou cheias de bobagens, pelo seu extremo bom humor, pelos seus puxões de orelha, sua alegria, por sua lealdade, cuidado, por me encorajar a enfrentar os desafios que aparecem. Obrigada! Falar que você é especial é pouco.

Aos meus sogros, cunhada e cunhado! Que sempre me acolheram bem, dando todo carinho e apoio. Obrigada por tudo!

Aos meus familiares por todo amor, carinho, preocupação e apoio.

À Dr^a. Lara Termini, que me acolheu como sua aluna e me mostrou um novo caminho na ciência, me proporcionando um aprendizado que possui valor inestimável. Obrigada pela oportunidade, orientação, conversas, risadas e pelos nossos “Rabos de Galo” nas comemorações. O seu carinho, profissionalismo e dedicação estarão sempre presentes em minha vida.

Ao Dr. Enrique Boccardo por colaborar na discussão dos resultados obtidos, conversas e risadas! Lembrando que: Vai Corinthians!!!

À Rafa (para os íntimos, Ellen), uma pessoa que foi conquistando espaço muito especial em meu coração e que sou muita grata por ter entrado em minha vida. Minha querida companheira de lab, obrigada por tudo! Pelas conversas, ajudas, risadas, gordices, serões no lab, enfim, por tudo! Obrigada por dividir seu dia-a-dia comigo, saiba que aprendi muito contigo! Você se tornou uma amiga muito importante e que quero sempre manter em minha vida.

À Giana (a.k.a Creuza, Gianiiiiinha), pessoa mais que admirável, doce, de alma e coração bom. Obrigada por todo carinho (de mãe), apoio, ajuda e risadas, amizade e nossos cafés da manhã.

À Barbara (também conhecida como Barbarella, Barbarellen), que foi chegando de fininho e que hoje não imagino mais meu dia-a-dia sem! Obrigada pelo carinho, apoio, ajuda, risadas e compartilhar ataques de loucura/raiva TPMísticos!!!

À Raquel (Ô Hessel!), que, se não fosse por ela, nada disso teria acontecido. Graças a seu excelente e incansável trabalho, desde a minha matrícula, até a defesa, tudo correu bem. Obrigada! Obrigada também pelas conversas, conselhos e risadas.

À Vanesca, do nosso clã “Brother of Sky”. Obrigada, no início, pela ajuda com as células transduzidas. Depois, com maior convívio, pela ajuda naqueles dias que as células precisavam de repique ou troca de meio, pelas conversas (até sobre Game of Thrones, Vikings e besteiras do Whatsapp), risadas, carinho e apoio. Você é uma pessoa mais do que bem.

Às minhas outras amigas “Brother of Sky” (Aline, Anna, Suellen) que tornaram meu dia-a-dia mais leve, com as conversas, ajudas e risadas.

Ao Lanre, este que entrou na minha vida, sempre com um sorriso no rosto e me ensinando muitas coisas (do laboratório e da vida). Obrigada também à sua família, a qual eu estimo muito. Que a caminhada da vida de vocês seja sempre iluminada. Que a Luizinha e o Marcel se tornem os seres humanos mais fantásticos e que te dêem só orgulho. And remember: “Face, you’re legal!”, “Times Square is bombing!”, “You’re so full of nine o’clock!”

Ao Ricardo, pelas pastas de amendoim, pelas conversas e risadas.

À Dr^a. Luisa Villa, que me recebeu em seu laboratório com muito carinho (de mãe) e cordialidade. Obrigada por todos os conselhos. São pessoas como você, cheias de entusiasmo e dedicação, que nos inspiram a seguir o caminho da ciência.

A todos os membros do laboratório de Inovação em Câncer e do grupo HPV, que me acolheram, me ajudaram quando precisei e que sempre me trataram bem. Obrigada pelos bons momentos.

Ao Mateus por todo suporte e colaboração nos experimentos de metabolismo celular. Por dividir comigo os momentos de loucuras finais em época de fechamento de tese. Obrigada por toda atenção, pelo empenho. Por me ensinar técnicas e conceitos novos no meu dia-a-dia. Você vai longe!

À Dr^a Nadja de Souza Pinto, por todo suporte e colaboração nos experimentos referentes a metabolismo celular e na discussão dos dados obtidos e pelo conhecimento transmitido.

À Débora, por todo apoio e trabalho prestado na pós-graduação. Obrigada por tirar todas as minhas dúvidas durante as etapas do mestrado (matrícula, qualificação, defesa, entre outras coisas). Pela paciência em receber minhas inúmeras ligações. Obrigada! Você ajudou muito!

Aos membros da banca pelo tempo e dedicação.

À CAPES pelo apoio financeiro, por proporcionar bolsa de mestrado (bolsa do departamento de Oncologia – FMUSP).

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro de meu projeto de mestrado, associado aos seguintes processos:

2015/26327-1 – Bolsa de Mestrado

2015/26573-2 – Auxílio à Pesquisa – Dra Lara Termini

2008/57889-1 – INCT-HPV

Ao CNPq pelo apoio financeiro de meu projeto de mestrado, a partir do processo 573799/2008-3.

“Você tem que criar a confusão sistematicamente, isso liberta a criatividade.

Tudo que é contraditório cria vida.”

Salvador Dalí

*“Encontre a emoção principal; isso pode ser tudo que você precisa saber
para encontrar sua história.”*

Scott Fitzgerald

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Essa dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena.

3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e documentação, 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de símbolos, siglas e abreviaturas

Resumo

Abstract

1.	INTRODUÇÃO	19
1.1	CARCINOMA DO COLO UTERINO	19
1.1.1	Epidemiologia	19
1.1.2	Fatores de risco	19
1.1.3	Histopatologia	19
1.1.4	Associação entre carcinoma do colo do útero e HPV	20
1.2	PAPILOMAVÍRUS HUMANO	21
1.2.1	Classificação e Taxonomia do HPV	21
1.2.2	Características, ciclo viral e infecção	23
1.2.3	Potencial oncogênico e integração	27
1.3	INFECÇÕES VIRAIS E REPOSTA IMUNE	28
1.3.1	Aspectos gerais	28
1.3.2	Interleucina 1 (IL-1)	30
1.3.3	Fator de necrose tumoral (TNF)	31
1.3.4	HPV e resposta imune	33
1.4	ESTRESSE OXIDATIVO	35
1.4.1	Mitocôndria como fonte de espécies reativas de oxigênio	37
1.5	SISTEMA ANITIOXIDANTE	39
1.5.1	Família das Superóxido Dismutases (SOD)	39
1.5.1.1	Superóxido Dismutase 2 (SOD2)	39
2.	OBJETIVOS	42
2.1	Objetivo principal	42
2.2	Objetivos específicos	42
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1	Cultura celular	43
3.2	Vetores retrovirais	44
3.3	Transdução de vetores retrovirais	45
3.4	Tratamento com citocinas (TNF e IL-1 β)	45
3.5	Extração proteica	46

3.6	Expressão proteica/ <i>Western Blot</i> (WB)	46
3.7	Imunofluorescência (IF)	47
3.8	Medida da taxa de consumo de oxigênio (<i>Oxygen consumption rate</i> - OCR)	47
3.8.1	OCR de complexos individuais da cadeia transportadora de elétrons (CTE) em células permeabilizadas	47
3.8.2	OCR em células aderidas	49
3.9	Isolamento de mitocôndrias de células em cultura	51
3.10	Análises estatísticas	51
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1	Localização celular da proteína SOD2	52
4.2	Análise da localização intracelular de SOD2	54
4.3	Análise dos níveis de expressão de SOD2 em diferentes linhagens celulares	57
4.4	Efeito da imortalização e transformação celular na expressão de SOD2	61
4.5	Os níveis de SOD2 em células que expressam genes de HPV não correlacionados aos de p53	63
4.6	Medida da taxa de consumo de oxigênio (<i>Oxygen Consumption rate</i> – OCR)	67
4.6.1	OCR de complexos individuais da cadeia transportadora de elétrons (CTE) em células permeabilizadas)	67
4.6.2	OCR em células aderidas	69
4.7	Células que expressam E7 de HPV de alto risco oncogênico apresentam diferenças na indução de SOD2 por citocinas pró-inflamatórias	72
5.	CONCLUSÕES	79
6.	REFERÊNCIAS	80
7.	ANEXOS	97

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Processo de carcinogênese do colo do útero mediado por HPV	20
Figura 2. Classificação dos Papilomavírus Humanos	22
Figura 3. Representação esquemática do genoma do HPV	23
Figura 4. Ciclo de replicação do HPV	24
Figura 5. Geração de superóxido a partir da cadeia transportadora de elétrons	38
Figura 6. Organização do gene SOD2 humano	40
Figura 7. Mapa esquemático do vetor retroviral pLXSN	44
Figura 8. Oxígrafo de alta resolução, <i>Oxygraph-2k (Oroboros)</i>	48
Figura 9. <i>XF24 Extracellular Flux Analyser</i>	49
Figura 10. Desenho esquemático da distribuição das células em <i>XF24 V7 Cell Culture Microplates</i>	50
Figura 11. Expressão da proteína SOD2 em linhagens em diferentes linhagens celulares	53
Figura 12. Determinação da localização intracelular de SOD2	56
Figura 13. Análise da expressão da proteína SOD2 em linhagens HPV-positivas e HPV-negativas	58
Figura 14. Análise da expressão da proteína SOD2 em linhagens HPV-positivas e HPV- negativas	59
Figura 15. Análise por <i>Western Blot</i> dos níveis das oncoproteínas E6 e E7 de HPV16	60
Figura 16. Determinação dos níveis da proteína SOD2 em queratinócitos transduzidos com os oncogenes E6 e E7	62
Figura 17. Interação de p53 e SOD2	65
Figura 18. Expressão de p53 e SOD2 nas linhagens celulares	66
Figura 19. OCR suportada por substratos de Complexo I	69
Figura 20. OCR em células SiHa e HeLa	71
Figura 21. Expressão dos níveis de SOD2 após tratamento com as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Anticorpos utilizados para ensaios de <i>Western Blot</i> e imunofluorescência	47
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

=	Igual a
<	Menor que
≤	Menor ou igual a
°C	Grau Celsius
μL	Microlitro
μM	Micromolar
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
nM	Nanomolar
nmol	Nanomol
AA	Antimicina A
ADP	Adenosina Difosfato
APC	Célula Apresentadora de Antígeno
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
Cat	Catalase
CCCP	Carbonil Cianeto de 3-Clorofenilhidrazona
CDK	Quinase Dependente de Ciclina
CTE	Cadeia Transportadora de Elétrons
ΔΨ	Potencial elétrico de membrana mitocondrial
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
E	Região Precoce
E1	Proteína Precoce 1
E2	Proteína Precoce 2
E2BS	Sítio de ligação da proteína E
E5	Proteína Precoce 5
E6	Proteína Precoce 6
E6-AP	Proteína associada a E6
E7	Proteína Precoce 7
EBV	Vírus Epstein-Barr
ECAR	Taxa de acidificação do meio
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>

FAD	Flavina adenina nucleotídeo, forma oxidada
FADH2	Flavina adenina nucleotídeo, forma reduzida
Fe-S	Ferro-enxofre
FMN	Flavina mononucleotídeo
FPM	Força próton-motriz
GPx	Glutationa Peroxidase
GRx	Glutationa redutase
HBV	Vírus da hepatite B
HCV	Vírus da hepatite C
Hepes	Ácido 4-(2-hidroxietil) piperazina-1-etanosulfônico
HPV	Papilomavírus Humano
hTERT	Transcriptase reversa telomerase humana
IL-1 β	Interleucina 1 Beta
KSFM	<i>Keratinocytes Serum Free Media</i>
L	Região Tardia
L1	Proteína Tardia 1
L2	Proteína Tardia 2
LC	Células de <i>Langerhans</i>
LCR	Região longa de controle
MEM	<i>Minimum essential media</i>
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
mtDNA	DNA Mitocondrial
NADH	Nicotinamida adenina nucleotídeo, forma reduzida
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NIC	Neoplasias intra-epiteliais cervicais
NK	<i>Natural Killer</i>
NOS	Óxido nítrico sintase
NOX	NADPH oxidase
OCR	Taxa de consumo de oxigênio
Oligo	Oligomicina A
ORF	Região aberta de leitura
PBS	Tampão fosfato-salino
PHK	Queratinócitos Primários Humanos
pRB	Proteína do retinoblastoma
Prx 1	Peroxiredoxina 1
PVDF	Polivinilidene difluoreto
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
Rpm	Rotação por minuto

ROT	Rotenona
SCC	Carcinoma de células escamosas
SDH	Succinato desidrogenase
SDS	Dodecilsulfato de Sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
SOD	Superóxido Dismutase
SOD2	Superóxido Dismutase 2
TNF	Fator de Necrose Tumoral
Tris-HCl	Tris (hidroximetil)aminometado hidroclorado
UbQ	Ubiquinona
UV	Ultravioleta
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
μ	Mu
ν	Nu

RESUMO

Silva GAF. Estudo do papel da proteína superóxido dismutase 2 (SOD2) no processo de transformação celular mediado por HPV [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2018.

O estresse oxidativo reflete um desequilíbrio na manutenção do estado redox intracelular que pode resultar no acúmulo de espécies oxidantes. Nestas condições, estas espécies podem gerar danos na estrutura/função do DNA, disfunções mitocondriais, alterações no enovelamento de proteínas, peroxidação de lipídeos, dentre outros danos. Assim, o estresse oxidativo pode contribuir para diversas condições patológicas, como por exemplo, câncer, desordens neurológicas, aterosclerose, diabetes e asma. A infecção persistente por papilomavírus humano (HPV) de alto risco está etiológicamente associada ao câncer de colo uterino, uma das principais causas de morte por câncer em mulheres no mundo todo. Além disso, esses vírus estão associados a uma porcentagem relevante de cânceres de pênis, vulva, ânus e cabeça e pescoço. Em células infectadas por HPV de alto risco oncogênico, o estresse oxidativo resultante do metabolismo anormal dos queratinócitos e a resposta inflamatória crônica não efetiva, podem contribuir no processo de transformação celular. Além disso, a presença das oncoproteínas E6 e E7 interfere nos mecanismos de reparo de lesões em DNA, favorecendo o acúmulo de mutações. Ainda mais, a instabilidade genômica promovida pelo estresse oxidativo, pode favorecer a integração do HPV no genoma das células infectadas, principal causa da persistência viral e progressão de lesões ao câncer. A proteína superóxido dismutase 2 (SOD2) contribui com a homeostase celular ao catalisar a dismutação de radicais ânion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, prevenindo a inativação direta de biomoléculas. Em estudos anteriores, observamos que o aumento do transcrito de SOD2 está associado à resistência ao efeito antiproliferativo do fator de necrose tumoral (TNF) em células imortalizadas por HPV. Além disso, mostramos que existe uma correlação direta entre o aumento dos níveis da proteína SOD2 e a severidade de lesões da cérvix uterina. Finalmente, identificamos SOD2 como um marcador preditivo independente de metástases linfonodais inguinais em pacientes com carcinoma de pênis. No entanto, o papel desta proteína na patogênese associada ao HPV não tem sido estudado em profundidade. O presente estudo visa determinar o envolvimento de SOD2 no processo de transformação celular mediado por HPV e seu valor como marcador preditivo de patologias associadas a este vírus.

Descritores: superóxido dismutase; citocinas; estresse oxidativo; papillomaviridae; inflamação.

ABSTRACT

Silva GAF. Study of superoxide dismutase 2 protein in HPV mediated cell transformation [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo"; 2018.

Oxidative stress reflects a redox imbalance in the cell in favor of oxidant species, which may result in DNA damage, mitochondrial dysfunction, protein misfolding and lipid peroxidation, among others. As a result, oxidative stress is thought to contribute to diverse pathologies such as cancer, neurological disorders, atherosclerosis, diabetes and asthma. Persistent infection with high risk human papillomavirus (HPV) types is etiologically associated with cervical cancer, one of the leading causes of cancer related female death worldwide. Moreover, HPV infection is associated with a significant percentage of penile, vulvar, anal and head and neck carcinomas. In cells infected with high-oncogenic risk HPV types the oxidative stress generated by the abnormal keratinocytes metabolism and non-efficient chronic inflammatory response may contribute to the cellular transformation process. Furthermore, expression of E6 and E7 oncoproteins interferes with several DNA repair mechanisms, favoring the accumulation of mutations. Moreover, genomic instability promoted by oxidative stress may favor HPV integration in host cell genome, the main cause of viral persistence and of precursor lesions progression to cancer. The protein superoxide dismutase 2 (SOD2) contributes to cellular homeostasis by catalyzing radical super anion dismutation in oxygen and oxygen peroxide preventing the direct inactivation of biomolecules. In previous studies we observed that SOD2 mRNA upregulation is associated with the resistance to tumor necrosis factor (TNF) antiproliferative effect in HPV-immortalized cells. Besides, we showed the existence of a direct correlation between increased SOD2 protein expression and cervical lesions severity. Finally, we identified SOD2 as an independent predictive marker of inguinal lymph node metastases in patients with penile carcinomas. However, the role of this protein in HPV-associated pathologies has not been investigated in depth. The goal of this study is to determine the involvement of SOD2 in HPV-mediated cell transformation and its value as a predictive marker in pathologies caused by this virus.

Descriptors: superoxide dismutase; cytokines; oxidative stress; papillomaviridae; inflammation.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARCINOMA DO COLO UTERINO

1.1.1 Epidemiologia

O carcinoma do colo do útero é o segundo tipo de câncer mais comum em mulheres em todo o mundo, com cerca de 530 mil novos casos e 270 mil mortes por ano, das quais mais de 85% estão concentradas em países em desenvolvimento. Este tumor está associado à infecção persistente por alguns tipos de papilomavírus humanos (HPV). Além disso, a infecção por HPV está associada com outros tipos de câncer, como os tumores de vagina, vulva, ânus e pênis, além de tumores de cabeça e pescoço (WOODMAN *et al.*, 2007; WHO, 2016).

No Brasil, o câncer do colo do útero é a segunda neoplasia maligna mais incidente, sendo apenas superada pelo câncer de mama, e o quarto tipo de câncer que mais causa mortalidade entre mulheres (©ICO INFORMATION CENTER ON HPV AND CANCER, 2017). Para o ano de 2018, estimam-se 16.370 novos casos de câncer do colo do útero e, em 2013, registraram-se 5430 óbitos (INCA, 2018).

1.1.2 Fatores de risco

O câncer cervical ainda é uma prioridade em questões de saúde pública (BOSCH, 2013). Para o desenvolvimento desta neoplasia estão associados diversos fatores de risco, sendo os principais: baixo nível socioeconômico, início precoce da atividade sexual, múltiplos parceiros, tabagismo, multiparidade, imunossupressão, utilização de contraceptivos orais e infecção pelo HPV (BOSCH *et al.*, 2002; COTTON *et al.*, 2007; IARC, 2007).

Dados na literatura mostram que a infecção por HPV é o principal agente causador do câncer do colo uterino (SCHIFFMAN *et al.*, 1997; FRANCO *et al.*, 2001; IARC, 2007). Evidências obtidas a partir de ensaios de PCR (reação em cadeia da polimerase), nos quais foram utilizadas amostras de câncer de colo do útero, constataram que o DNA de HPV está presente em 99,7 % dos casos (BOSCH *et al.*, 1995; WALBOOMERS *et al.*, 1997; WALBOOMERS *et al.*, 1999). Desta forma, estes dados indicam que a infecção por HPV é fator essencial para o desenvolvimento da neoplasia cervical (FRANCO *et al.*, 1999).

1.1.3 Histopatologia

O câncer do colo do útero é, em sua maioria, consequência da evolução contínua de lesões precursoras não invasivas, caracterizadas por atipias celulares (displasias). Essas lesões podem

ser caracterizadas e detectadas por exames clínicos citológicos e histopatológicos, como por exemplo, colposcopia (ZUR HAUSEN, 2002). Quando não há tratamento, as lesões podem progredir gerando neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC), sendo divididas em: NIC 1/leve displasia, NIC 2/displasia moderada e NIC 3/carcinoma *in situ*, caracterizando uma displasia severa e que poderá evoluir para um carcinoma invasor derivado de células epidermóides (SCC) (Figura 1). Alterações no epitélio glandular, ocasionadas pelo HPV e por outros co-fatores associados a este tipo tumoral, estão associadas ao desenvolvimento de adenocarcinoma (ZUR HAUSEN, 2002; ©ICO INFORMATION CENTER ON HPV AND CANCER, 2017).

Outro tipo de classificação utilizada é o sistema *Bethesda*, o qual emprega outros termos para as lesões precursoras, tais como: células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASCUS), lesões intraepiteliais escamosas, que compreende o baixo grau, LSIL (lesão intraepitelial de baixo grau) ou também, denominado como displasia leve e o alto grau, HSIL (lesão intraepitelial escamosa de alto grau) ou displasia moderada, severa ou carcinoma *in situ* (SOLOMON *et al.*, 2002).

Figura 1. Processo de carcinogênese do colo do útero mediado por HPV. O processo inicia-se pela infecção do epitélio metaplásico, na zona de transformação do colo uterino, por um ou mais tipos de HPV de alto risco. Não havendo a eliminação da infecção, se caracterizará um quadro de persistência, com consecutiva progressão clonal do epitélio infectado até a formação das lesões pré-cancerosas e, consequentemente, do processo de invasão. FONTE: Adaptado de *Identifying molecular culprits of cervical cancer progression*, Center for Cancer Research, National Cancer Institute (NIH), 2007.

1.1.4 Associação entre Carcinoma do colo do útero e HPV

Muitos estudos foram importantes para esclarecer a associação epidemiológica entre a infecção por HPV de alto risco e o câncer de colo do útero. Existe um risco relativo, em média, 50 vezes maior, de mulheres com infecção por HPV virem a desenvolver câncer cervical,

quando comparadas às mulheres não portadoras deste tipo de infecção (ROZENDAAL *et al.*, 1996; CASTELLSAGUÉ, 2008). Foi observado que a maior parte das infecções por HPV não leva ao aparecimento de lesões visíveis, uma vez que podem ser, de fato, eliminadas pelo sistema imune em um curto período de tempo (IARC, 2007). Antagonicamente, alterações severas no sistema imune, resultam em maior prevalência das infecções por HPV e de suas lesões associadas (KIVIAT *et al.*, 1993).

Apesar da maior parte das infecções por HPV ser transiente e seu DNA não ser mais detectável em um período de 1-2 anos, um pequeno número de mulheres apresenta infecção persistente pelo vírus, onde a presença de um mesmo tipo de HPV é detectada, mais de uma vez, ao longo de um período de tempo. São essas mulheres que possuem maior risco de desenvolver neoplasias cervicais, quando comparadas às que eliminaram a infecção pelo HPV (KOUTSKY *et al.*, 1992; HILDESHEIM *et al.*, 1994; HO *et al.*, 1995; EVANDER *et al.*, 1996; FRANCO *et al.*, 1997; IARC, 2007). De modo geral, existe um intervalo de aproximadamente 7-10 anos entre a infecção inicial por tipos de HPV de alto risco oncogênico e o desenvolvimento das NICs, carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo (NOBBENHUIS *et al.*, 1999; IARC 2007). Sendo assim, sugere-se que entre a infecção primária e o desenvolvimento de um câncer invasivo sejam necessários em torno de 20 a 30 anos (ZUR HAUSEN, 1996).

Caracterizar fatores associados à persistência do HPV, pode auxiliar na identificação de mulheres que estão sob maior risco de desenvolverem uma neoplasia cervical maligna. Diversos estudos vêm sendo realizados com o intuito de identificar potenciais marcadores que identifiquem mulheres com infecção persistente e que tenham maior chance de desenvolver lesões ou câncer (FRANCO *et al.*, 1999; HERRERO *et al.*, 2000).

1.2 PAPILOMAVÍRUS HUMANO

1.2.1 Classificação e Taxonomia do HPV

Os HPVs se agrupam taxonomicamente na família *Papillomaviridae* (DE VILLIERS *et al.*, 2004) e são divididos em cinco gêneros: alfa-papilomavírus (α -HPV), beta-papilomavírus (β -HPV), gamma-papilomavírus (γ -HPV), mu-papilomavírus (μ -HPV) e nu-papilomavírus (ν -HPV) (figura 2). Essa divisão é baseada nas diferenças da sequência de DNA da região mais conservada do genoma viral (porção do gene L1). Além disso, considera-se um novo tipo de HPV quando a sequência nucleotídica apresentar diferença em mais de 10 % dos tipos já descritos (IARC, 2007; BERNARD *et al.*, 2010; DOORBAR *et al.*, 2015). Mais de 200 genótipos de HPV foram descritos até o momento (WOODMAN *et al.*, 2007; BERNARD *et al.*, 2010; MIRABELLO *et al.*, 2018; PAPILOMAVIRUS EPISTEME, 2018.), e classificados de

acordo com a sequência de seu DNA. Os HPV mucosos podem ser divididos em HPV de baixo e alto risco, sendo os primeiros, responsáveis, predominantemente, por ocasionar lesões benignas como verrugas e condilomas (HPV 6 e 11, por exemplo), enquanto os últimos estão relacionados às infecções que possuem maior chance de evoluir para lesões de alto grau e, em alguns casos, ocasionar câncer (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 45, por exemplo).

Os HPV classificam-se de acordo com o tropismo epitelial, como mucosos ou cutâneos. Dentre os mucosos, mais de 40 tipos virais infectam a mucosa anogenital, sendo que estes HPV são categorizados em relação ao risco atribuído em causar neoplasias como tipos de alto e baixo risco oncogênico (LORINCZ *et al.*, 1992).

Figura 2. Classificação dos Papilomavírus Humanos. Os tipos de papilomavírus encontrados em humanos são divididos em cinco gêneros, sendo eles os alfa-Papilomavírus, beta-papilomavírus, gamma-papilomavírus, mu-papilomavírus e nu-papilomavírus. Os três primeiros gêneros, representam os maiores grupos. Os tipos inclusos no gênero dos alfa-papilomavírus são classificados em cutâneos de baixo risco oncogênico, representados em lilás, mucosos de baixo risco oncogênico representados em laranja e mucosos de alto risco representados em rosa. FONTE: Adaptado de DOORBAR *et al.*, 2015.

Os α -HPV 16, 18, 31, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 66 são classificados pela Organização Mundial da saúde, como carcinogênicos em humanos. Esse dado é baseado em diversas evidências epidemiológicas e funcionais, as quais relacionam a infecção persistente por estes tipos virais, o câncer cervical e neoplasias em outras regiões anatômicas, tais como vulva, vagina, canal anal, pênis e orofaringe (IARC, 2007; BZHALAVA *et al.*, 2015). As células infectadas pelos HPV de alto risco podem sofrer alterações que originam lesões de alto grau e a falta de tratamento pode culminar na ocorrência de câncer do colo uterino. Nestes casos, é

referida a integração do DNA viral ao genoma celular e a expressão em altos níveis dos oncogenes virais E6 e E7 (WOODMAN *et al.*, 2007).

1.2.2 Características, ciclo viral e infecção

Os HPV possuem DNA de dupla fita e apresentam genoma de aproximadamente 8000 pares de bases. As partículas virais não envelopadas e icosaédricas são compostas por 72 capsômeros e possuem 55 a 60 nm de diâmetro (ZHOU & FRAZER, 1996; MCMURRAY *et al.*, 2001). São vírus espécie-específicos e apresentam tropismo pelas células cutâneas ou mucosas dos epitélios. Os tipos de HPV que infectam o trato anogenital podem ser classificados, segundo o risco de estarem associados ao desenvolvimento de lesões neoplásicas do colo uterino, como HPV de baixo e alto risco oncogênico (LÖRINCZ *et al.*, 1992; ZUR HAUSEN 1996).

O genoma do HPV (figura 3) é dividido em três regiões distintas, denominadas precoce (*early*), tardia (*late*) e região regulatória não codificadora (LCR).

Figura 3. Representação esquemática do genoma do HPV. HPV e suas regiões funcionais: LCR (*Long Control Region*) e as ORFs (*Open Reading Frames*) que codificam as diferentes proteínas virais, precoces e tardias. FONTE: Adaptado de TSAKOGIANNIS *et al.*, 2017.

A LCR contém elementos necessários para controle de replicação e transcrição do DNA viral. Por sua vez, na região precoce encontram-se genes cujos produtos estão envolvidos na replicação, transcrição e demais funções do vírus, como E1, E2, E4, E5, E6 e E7. O gene E2 codifica uma proteína que atua na regulação da replicação do genoma viral e da transcrição dos genes precoces, enquanto os genes E6 e E7 codificam as principais oncoproteínas dos HPV de alto risco. A região de expressão tardia contém genes que codificam proteínas estruturais

componentes do capsídeo viral (L1 e L2), sendo L1 responsável pela codificação da principal proteína do capsídeo (STANLEY, 2012).

O ciclo de replicação do HPV (figura 4) está intrinsecamente relacionado à diferenciação epitelial. Resumidamente, o HPV tem acesso às células da camada basal do epitélio cervical através de microlesões, iniciando assim o processo infeccioso. Para que se estabeleça uma lesão produtiva, o HPV precisa infectar as células da camada basal do epitélio escamoso, uma vez que são estas que apresentam capacidade proliferativa. Uma vez instaurado no interior das células da camada basal do epitélio, o genoma do vírus se estabelece na forma episossomal e replica-se de maneira simultânea junto ao DNA da célula (ZUR HAUSEN, 2002; PEREZ-PLASENCIA *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2010).

Mais especificamente, a infecção pelo HPV inicia-se na camada basal do epitélio, na qual o vírus tem acesso a partir de lesões que exponham essa superfície. Na camada basal, ocorrerá a ligação das proteínas do capsídeo viral com cadeias de proteoglicano heparan-sulfato (HSPG). Isso causará uma mudança conformacional que permitirá a clivagem na porção N-terminal da proteína L2, proteína secundária do capsídeo viral (KINES *et al.*, 2009). Para que essa clivagem ocorra, as pró-proteínas convertases furina e/ou PC5/6 (Furina-PC5/6) expõem um epítipo que possui a capacidade de interagir com a superfície celular e ganhar a entrada na célula (KINES *et al.*, 2009). Entretanto, a maneira em que ocorre a internalização do vírus continua controversa embora os receptores de fatores de crescimento, α -6-integrina e laminina 5, estejam envolvidos nesse processo (DOORBAR, 2006; SURVILADZE *et al.*, 2012; DOORBAR *et al.*, 2015).

Figura 4. Ciclo de replicação do HPV. O ciclo do HPV inicia a partir de microlesões causadas no epitélio estratificado. Partículas virais infecciosas, alcançam a camada basal do epitélio, onde se ligam e entram nas células. O genoma viral é mantido na camada basal do epitélio na forma episossomal. À medida que as células epiteliais basais diferenciam, os genes precoces, E1 e E2 são expressos. Em seguida, nas camadas mais diferenciadas, as proteínas do capsídeo (provenientes dos genes tardios L1 e L2) são expressas, e os vírions são formados e liberados. A infecção pode continuar com a integração do DNA viral ao DNA do hospedeiro. Com isso, pode ocorrer aumento dos níveis de E6 e E7 e as células poderão

proliferar indefinidamente, o que pode levar ao desenvolvimento do câncer. FONTE: Adaptado de ZUR HAUSEN, 2002.

A seguir, dentro do núcleo das células da camada basal (células indiferenciadas com significativa atividade mitótica), o ciclo entra na fase de manutenção do genoma viral. O vírus é mantido na forma episomal, em um número estável e baixo de cópias (entre 50-100 cópias por célula) e sua amplificação relacionada com a diferenciação celular (MOODY & LAIMINS, 2010). A próxima etapa do ciclo viral, necessita da transcrição dos genes E1 e E2 para a utilização da maquinaria de replicação celular. A proteína E2, nas células da camada basal, desempenha diversos papéis importantes tanto na replicação, quanto na segregação genômica viral. Ademais, a proteína E2, possui um domínio de ligação ao DNA o qual reconhece quatro sequências palindrômicas contidas na LCR do vírus, sendo que uma delas é adjacente à origem de replicação (STENLUND, 2003; DOORBAR, 2006).

A ligação de E2 a este sítio é necessária para que ocorra o recrutamento da helicase viral E1, que irá ligar-se a outras proteínas essenciais, como a RPA (*Replication Protein A*) e a DNA polimerase celular, para a replicação do DNA (STENLUND, 2003; DOORBAR, 2006). O genoma viral, será mantido nessa camada de células, como elementos replicativos extracromossomais sincronizados com o ciclo celular, servindo como um reservatório de células infectadas (MCBRIDE, 2008). Concernente à divisão celular, a proteína E2 está relacionada com a divisão dos genomas virais, fazendo com que os episomos se liguem à cromatina, garantindo a segregação igualitária das células filhas e sua localização nuclear. Isso ocorre devido à interação de E2 com outras proteínas celulares, tais como a Brd4 (*Bromodomain-containing protein 4*) (WANG *et al.*, 2013; DOORBAR *et al.*, 2015).

Mesmo que as proteínas virais E1 e E2 sejam imprescindíveis nessa etapa de manutenção e amplificação do episomo viral, as proteínas E6 e E7, com suas atividades regulatórias, atuam como um fator potencializador do processo de replicação do vírus, promovendo a proliferação e divisão celular da camada basal (DOORBAR *et al.*, 2012). Assim que as células infectadas entram em processo de divisão e migram para as camadas superiores do epitélio, elas diminuirão a expressão de fatores necessários para a replicação do genoma do vírus. Ao longo deste processo, as proteínas E5, E6 e E7, auxiliam na manutenção da atividade replicativa viral a partir de diversas interações com proteínas da célula hospedeira, conforme especificado a seguir (JOHANSSON & SCHWARTS, 2013).

A proteína E5 induz a proliferação celular, levando a um aumento da sinalização pelo *epidermal growth factor* (EGF), e também atuando no processo de escape ao sistema imune ao interagir com os receptores HLA (*Human leukocyte antigen*), por exemplo (CRUSIUS *et al.*, 2000). A oncoproteína E6, por sua vez, possui atividade anti-apoptótica, interagindo principalmente com a proteína supressora de tumor p53. A oncoproteína E6 de HPV de alto

risco promove a ubiquitinação e degradação de p53 de maneira eficiente. O mesmo efeito não é observado com E6 de HPV de baixo risco oncogênico (DOORBAR, 2006). Além de promover a ubiquitinação e degradação de p53, a oncoproteína E6 pode interagir com diversos fatores, tais como: E6-AP (*E6-associated protein*), E6-BP (*E6-binding protein*), Bak, TNFR1 (*Tumor necrosis factor receptor 1*), caspase 8, MCM7 (*minichromosome maintenance complex component 7*), p300/CBP, IRF3 (*Interferon regulatory factor 3*), entre outros. Essas interações irão afetar a diferenciação e a transcrição em queratinócitos, ativarão a telomerase e inibirão a apoptose, atuando, então, de maneira complementar às funções de E7 (HOWIE *et al.*, 2009).

A oncoproteína E7 de HPV de alto risco tem a capacidade de se ligar às formas hipofosforiladas das proteínas da família do retinoblastoma (pRb), p105, p107 e p130, levando-as à degradação. As proteínas p105 e p107 controlam a entrada no ciclo celular, ao passo que p130 está relacionada com a reentrada no ciclo celular nas camadas superiores e mais diferenciadas do epitélio. Com isso, ocorrerá a liberação dos fatores de transcrição da família E2F, os quais são responsáveis por modular a expressão de genes da fase S, tais como as enzimas de replicação do DNA (MÜNGER *et al.*, 2004; MOODY & LAIMINS, 2010). A proteína E7 também mantém a atividade dos complexos ciclina E-Cdk2 e ciclina A-Cdk2 em células já diferenciadas, por interagir com as proteínas inibidoras p27 e p21, as quais são importantes reguladoras da parada do ciclo celular durante o processo de diferenciação (MÜNGER *et al.*, 2004; MOODY & LAIMINS, 2010). No entanto, níveis altos de E7 podem induzir a proteína supressora de tumor p53, resultando na parada do ciclo celular e em apoptose (SCHEFFNER *et al.*, 1990; DOORBAR *et al.*, 2015).

De maneira geral, E4 contribui para a amplificação do genoma e a síntese de novos vírions. Seus níveis elevados de expressão durante o processo de replicação viral indicam funções adicionais na liberação e/ou transmissão do vírus. Por fim, o ciclo de replicação do HPV é concluído nas camadas mais superficiais do epitélio, onde os vírions maduros são produzidos (FRAZER, 2004). Por essa razão, é necessária a inibição da expressão de E6 e E7, uma vez que a montagem e a liberação das partículas virais dependem do processo de diferenciação celular. Sendo assim, com o acúmulo de E2, ocorre a inibição da expressão de E6 e E7 e, em seguida, com a expressão dos genes tardios, L1 e L2, ocorrerá o empacotamento e a montagem das partículas infecciosas (DOORBAR, 2006). Entretanto, ao longo da progressão tumoral, E6 e E7 de HPV de alto risco oncogênico possuem um papel fundamental. A infecção persistente aumenta a possibilidade de acúmulo de mutações, favorecendo a o desenvolvimento do câncer. Além disso, durante as lesões precursoras até o câncer, a integração do genoma viral ao genoma da célula infectada, é frequente, levando à perda ou interrupção do gene E2, desregulando e aumentando a expressão de E6 e E7 (VON KNEBEL DOEBERITZ, 2002).

O ciclo biológico completo do HPV, com consequente produção de vírions, se completa entre 2 a 3 semanas, fato que coincide com o tempo de estratificação epitelial (STANLEY, 2010). De maneira interessante, os HPV adaptam-se ao hospedeiro e causam, geralmente, infecções assintomáticas. Nesse caso, a persistência viral, na maioria dos indivíduos infectados, costuma ser menor do que um ano (tempo suficiente para a transmissão para outros hospedeiros), ao passo que este mesmo período não é tão longo para causar doenças, como neoplasias (VINOKUROVA, 2008; CHOW *et al.*, 2009).

1.2.3 Potencial oncogênico e integração

O desenvolvimento da neoplasia causada pelo HPV ocorre normalmente em indivíduos que não eliminam o vírus. O processo de carcinogênese induzida pelo HPV envolve mudanças genéticas e epigenéticas, ocasionando a ativação de proto-oncogenes e inativação de genes supressores de tumor (DOORBAR, 2006; BODILY & LAIMINS, 2011). Adicionalmente, a evasão viral do sistema imune e a persistência da infecção, são fatores importantes cruciais durante o processo oncogênico. O mecanismo de evasão da resposta imune é complexo e envolve a modulação da sinalização e reconhecimento de citocinas. Além disso, a oncoproteína E5 de HPV de alto risco, também possui uma função importante no processo de reconhecimento pelo sistema imune. Ela se liga às bombas de prótons (Bomba H^+ - ATPase) dos endossomos, o que irá diminuir a habilidade destas em acidificar esse compartimento. Como consequência, irá interferir negativamente tanto no carregamento, quanto na exposição de antígenos pelos complexos de histocompatibilidade (MHC I e II) na superfície celular (ZHANG *et al.*, 2003; DRISBOW *et al.*, 2005; ASHRAFI, 2006; CROSBIE *et al.*, 2013).

As oncoproteínas virais E6 e E7 exercem uma função central, pois interagem diretamente com importantes produtos de genes supressores de tumor. A multifuncionalidade destas oncoproteínas merece destaque, uma vez que é resultante da relação bem adaptada do vírus com o hospedeiro. Mesmo com as funções de E6 e E7 bem caracterizadas na literatura, ou seja, a degradação de p53 e proteínas do retinoblastoma, respectivamente, dados recentes têm mostrado que alterações em vias adicionais modificadas por essas oncoproteínas são igualmente importantes no processo de carcinogênese (MOODY & LAIMINS, 2010; MESRI, *et al.*, 2014).

A oncoproteína E7 é capaz de interagir com histonas deacetilases (HDACs - enzimas fundamentais na regulação epigenética) em domínios distintos daqueles que o faz com pRB e, a partir disso, evita a formação de heterocromatina em promotores específicos. Este processo tem sido considerado importante na manutenção do genoma viral e na contribuição para manter a habilidade proliferativa e longevidade celular (LONGWORTH & LAIMINS, 2004).

Por sua vez, a oncoproteína E6, além de promover a degradação de p53 diretamente, tem capacidade de modular a atividade supressora de tumor de p53. Essa modulação se dá a partir da ligação de E6 às enzimas p300 e ADA3 (*alteration/deficiency in activation 3*), bloqueando a capacidade desses fatores em acetilar p53 para aumentar sua estabilidade. Além disso, a oncoproteína E6 também atua degradando um conjunto de proteínas denominado *PDZ Partners*. Estas se ligam ao domínio C-terminal da proteína E6 através de seus motivos PDZ, ocasionando sua degradação (THOMAS *et al.*, 2008; NICOLAIDES *et al.*, 2011).

Com isso, a estabilidade de E6 aumentará, além de ser mantida em altos níveis na célula. Importante ressaltar que as proteínas com domínio PDZ estão relacionadas com a progressão do ciclo celular, transdução de sinal e regulação da polaridade da célula. Quando essas proteínas interagem com E6, cria-se um ambiente favorável para a manutenção do genoma viral (NICOLAIDES *et al.*, 2011). Outro fator a se considerar é a interação entre a oncoproteína E6 e a oncoproteína celular MYC na ativação da transcrição do gene hTERT, a qual é imprescindível nos processos de immortalização e transformação celular (WALLACE & GALLOWAY, 2015).

Muitos estudos fazem a relação entre a integração do genoma viral e o desenvolvimento das lesões precursoras de câncer. Nas lesões de baixo grau, o DNA do vírus é encontrado, preferencialmente, na forma episomal (plasmídeos extracromossômicos), ao passo que, nas lesões malignas, tais como NIC 3 (que incluem carcinoma *in situ*), o DNA encontra-se predominantemente integrado nos cromossomos do hospedeiro (PEITSARO *et al.*, 2002; YU *et al.*, 2005; IARC, 2007; GROVES & COLEMAN, 2015).

No processo de integração, ocorre uma quebra do DNA viral para que se integre no genoma do hospedeiro, modificando seu estado físico da forma episomal (circular), para a forma integrada (linear). Dados na literatura mostram que a ruptura do genoma viral, geralmente, ocorre próximo ao gene E2, afetando tanto a expressão do gene do vírus, quanto a do genoma celular (PETT *et al.*, 2004; MOODY & LAIMINS, 2010). Neste caso, com a diminuição da expressão de E2, serão produzidos níveis mais elevados de E6 e E7, havendo aumento na atividade immortalizadora do HPV (PETT *et al.*, 2004; DOORBAR, 2006). A proteína E2 faz a regulação transcricional dos genes E6 e E7. Além disso, E2 liga-se a quatro sítios de ligação, denominados E2BS, localizados na região reguladora viral. Na presença de alterações das funções de E2, ocorrerá, por exemplo, uma expressão descontrolada dos genes E6 e E7, devido à metilação de E2BS (CHAIWONGKOT *et al.*, 2012).

1.3 INFECÇÕES VIRAIS E RESPOSTA IMUNE

1.3.1 Aspectos gerais

O principal mecanismo para se combater infecções intracelulares é a imunidade celular. A resposta imunológica se dá a partir da interação entre diversos tipos celulares imunocompetentes, sendo fundamental a presença de diversos tipos celulares, como as células apresentadoras de antígeno (APC), linfócitos CD4 e CD8 e células NK (*Natural Killer*) (ABBAS & LICHTMAN, 2010). Assim que os antígenos são capturados nos sítios periféricos, as células APC irão migrar para órgãos linfoides secundários, apresentando os fragmentos peptídicos oriundos do processamento do antígeno às células T CD4⁺. O estabelecimento dessa apresentação ocorre na superfície das células APC e CD4⁺, a partir da geração de complexos entre as moléculas MHC de classe II e os peptídeos, na superfície das APCs para os receptores das células T (TCR), que estão presentes nas células CD4⁺. Essas interações entre TCR e os complexos MHCII-peptídeos são específicas e fundamentais para que os linfócitos CD4⁺ sejam ativados e que sofram expansão clonal (ABBAS e LICHTMAN, 2010).

Quando ativados, os linfócitos CD4⁺ atuarão através da secreção de citocinas, na diferenciação de células efectoras do sistema imune. Em vista disso, os linfócitos CD8⁺ (estimulados pelas células alvo apresentando antígenos), precisam da atividade de citocinas secretadas por células CD4⁺ ou de outros sinais provenientes da interação com as células APC, para que desta forma, se diferenciem em linfócitos citotóxicos. Os linfócitos T citotóxicos (CTL), por sua vez, reconhecem peptídeos apresentados nas moléculas de MHC de classe I (presentes na grande maioria das células), exercendo seu efeito citotóxico através da liberação de porfirinas e citolisinas, enzimas que promovem a lise osmótica das células-alvo (ABBAS e LICHTMAN, 2010). Os antígenos que não alcançam os órgãos linfoides secundários são ignorados pelo sistema imune, uma vez que a ativação das células T CD4⁺ parece acontecer apenas nestes órgãos (ZINKERNAGEL *et al.*, 1997).

De modo geral, as respostas imunológicas, tanto inata quanto adaptativa, na presença de um vírus, bloqueiam a infecção e eliminam as células infectadas (ABBAS e LICHTMAN, 2010). Para se combater agentes virais, a imunidade adaptativa é mediada pela associação entre mecanismos humorais e celulares. Sendo assim, no controle inicial da infecção, anticorpos específicos são importantes na prevenção da entrada do vírus na célula hospedeira e, também, após a liberação das partículas virais das células infectadas, uma vez que os vírus são inacessíveis aos anticorpos em ambiente intracelular (HAWTHORN *et al.*, 1988). Ainda, é importante mencionar que a função celular apresentadora de antígeno das células de *Langerhans* (LC) e de queratinócitos é controlada por diversos mediadores solúveis. Dentre eles, está o fator de necrose tumoral (TNF), apresenta um amplo espectro de atividades pró-inflamatórias e, também, um potente ativador da apresentação de antígenos pelas LC (CUMBERBATCH & KIMBER, 1995). Por sua vez, a interleucina 6 (IL-6), pode inibir a migração de neutrófilos (XING *et al.*, 1998) e, por fim, a interleucina 1 (IL-1), aumenta a expressão de fatores de adesão

em células endoteliais. Isso permitirá a transmigração de células imunocompetentes, tais como fagócitos e linfócitos, para o local da infecção (SIMI *et al.*, 2007).

De maneira geral, os níveis de citocinas podem ser influenciados por diversos fatores, tais como a resposta imunológica do indivíduo, a possibilidade de infecções simultâneas devido a outros patógenos, entre outros. Estes fatores devem ser levados em consideração na tentativa de se estabelecer uma relação entre o perfil da ativação destas citocinas em resposta às infecções causadas, por exemplo, por vírus. Além disso, importante ressaltar, que os queratinócitos são os principais contribuidores na produção de citocinas epiteliais, tais como a IL-1 e o TNF.

1.3.2 Interleucina 1 (IL-1)

A família das interleucinas 1 (IL-1) é composta por mediadores centrais que regulam tanto resposta imune quanto inflamatória (PALOMO *et al.*, 2015), onde uma das importantes fontes destas interleucinas, são os queratinócitos (KONDO *et al.*, 1994). Além disso, IL-1 apresenta papel pleiotrópico afetando, principalmente, respostas inflamatórias e imunológicas, regulando também, outras funções homeostáticas do organismo. Em outras palavras, esta família de citocinas irá desempenhar um papel de controle sobre a inflamação, tanto em seus receptores, quando a níveis nucleares. É importante salientar que os receptores da família da IL-1 atuam tanto como ativadores, quanto como supressores de inflamação (revisado por DINARELLO, 2009).

Quando encontrada em níveis excessivos, IL-1 pode implicar tanto na patogênese de doenças inflamatórias agudas ou crônicas, quanto nas malignidades (DINARELLO, 1996; MARTIN & FALK, 1997; AURON, 1998; MANTOVANI *et al.*, 1998; STYLIANOU & SAKLATVALA, 1998; DINARELLO *et al.*, 2002). Por exemplo, devido ao fato de IL-1 apresentar a habilidade em induzir a expressão de fatores angiogênicos, tais como, interleucina 8 (IL-8) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), pode ocorrer a promoção do crescimento tumoral e de metástase (VORONOV *et al.*, 2003; KONISHI *et al.*, 2005). Além disso, células tumorais podem produzir IL-1 direta ou indiretamente a partir da indução da produção de IL-1 a partir de células provenientes do microambiente tumoral (PORTIER *et al.*, 1993).

De maneira interessante, a IL-1, *in vitro*, apresenta efeitos citostáticos e citotóxicos em diversos tipos de linhagens tumorais (ONOZAKI *et al.*, 1985). Esta citocina também possui a habilidade de aumentar os efeitos antitumorais de células efetoras imunes *in vitro*. A mesma pode induzir e/ou possuir sinergismo com outras citocinas que apresentam ações antitumorais ou imunológicas (PHILIP *et al.*, 1986; CRUMP *et al.*, 1989).

Dentre os 11 membros que compõem a família das IL-1, estão as interleucina 1 alfa e interleucina 1 beta (IL-1 α e IL-1 β , respectivamente) (GABAY *et al.*, 2010). As IL-1 α e IL-1 β são codificadas por genes diferentes, se ligam ao mesmo receptor (IL-1R1 - *interleukin 1 receptor, type I*) e exercem funções biológicas semelhantes. Entretanto, existem diferenças em relação a seus impactos na imunidade, inflamação e câncer. O precursor da IL-1 α é ativo e atua como um “alarme” promovendo rapidamente a liberação de citocinas inflamatórias e quimiocinas. Em outras palavras, a IL-1 α irá intermediar as fases iniciais deste tipo de inflamação (BERDA-HADDAD *et al.*, 2011; RIDER *et al.*, 2011; KONO *et al.*, 2014; SHEN *et al.*, 2013).

Mesmo que a maioria das células não produza IL-1 α de maneira constitutiva em condições normais, os queratinócitos são uma exceção. Esta citocina é armazenada neste tipo celular em quantidades importantes, disponíveis para liberação local em caso de infecção ou lesão (IGLESIAS *et al.*, 1998). Em contrapartida, a produção de IL-1 β se dá, além dos queratinócitos, a partir de monócitos sanguíneos, macrófagos de tecidos e células dendríticas. A transcrição dessa citocina é uma limitação na taxa de sua produção, por isso, o RNAm de IL-1 β requer um sinal adicional para síntese. Esse estímulo pode ser um produto microbiano ou indução por outras citocinas, tais como TNF α , IL-18, IL-1 α ou a própria IL-1 β . Acredita-se que a indução de IL-1 compõe um mecanismo de “autoinflamação” (DINARELLO *et al.*, 1987; DINARELLO, 2011).

Inicialmente, a IL-1 β é sintetizada como um precursor inativo. Entretanto, esse precursor precisa ser clivado pela enzima caspase 1. A caspase 1, por sua vez, requer ativação para processar a IL-1 β em uma citocina ativa. Para que a caspase 1 seja ativada, é necessária a oligomerização de um complexo de proteínas intracelulares, conhecido como inflamassomo (HOFFMAN *et al.*, 2011; DINARELLO & VAN DER MEER, 2013). Assim que a caspase 1 é ativada pelo inflamassomo NALP3, a IL-1 β é prontamente secretada em sua forma ativa, resultando em inflamação (HOFFMAN *et al.*, 2011; DINARELLO & VAN DER MEER, 2013; YERRAMOTHU *et al.*, 2017). Por isso, a IL-1 β possui um papel importante nas repostas celulares imunes adaptativas, onde estimula a maturação de células T e aumenta a proliferação de células B (FREEDMAN *et al.* 1988; VESEY *et al.*, 2002; BURGER *et al.*, 2004). A IL-1 β também promove a expressão de moléculas inflamatórias como a ciclooxigenase tipo 2 (COX-2- que tem sido associada a piores prognósticos em diversos tipos de neoplasia (incluindo o câncer cervical), a fosfolipase A do tipo 2 (PLA2), a prostaglandina E2 (PGE2), entre outras (KIM *et al.*, 2004; DINARELLO, 2009; MUTHU *et al.*, 2017).

1.3.3 Fator de necrose tumoral (TNF)

O TNF, também conhecido como caquexina ou caquetina, é uma potente citocina inflamatória, que é produzida, principalmente, por macrófagos ativados e linfócitos (DE SILVA *et al.*, 1992; PARAMESWARAN *et al.*, 2010). Essa citocina amplifica e prolonga a resposta inflamatória levando outras células a liberarem tanto citocinas, tais como a IL-1 em tecidos epiteliais, quanto mediadores de sua resposta, como o NO e as espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais promovem injúria tecidual. O TNF é indispensável para o processo inflamatório completo, uma vez que a diminuição da inflamação é caracterizada, geralmente, pela atividade decrescente de TNF. A relevância da resposta inflamatória é determinante, ou seja, respostas insuficientes resultarão em um baixo número de células imunes, podendo levar às infecções e ao câncer, ao passo que respostas excessivas, causam morbidade e mortalidade em diversas patologias, tais como: doença de *Crohn*, artrite reumatoide, entre outras (TRACEY, 2002).

Existe uma ampla variedade de atividades biológicas exercidas pelo TNF, dentre elas estão: I) aumento da expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, ocasionando um acúmulo de leucócitos no local da inflamação; II) ativação de polimorfonucleares; III) estimulação da produção de outras citocinas, como IL-1, IL-6 e o próprio TNF, por diversas células do sistema imune; IV) aumento da expressão das moléculas de MHC de classe I, o que favorece a lise mediada por linfócitos citotóxicos contra células infectadas por agentes virais; V) inibição e replicação de alguns vírus (ABBAS & LICHTMAN, 2010). Basicamente, o TNF atua da seguinte maneira: induz a apoptose a partir da ativação de caspases, ativa diversas proteínas quinases envolvidas no sistema em cascata das MAP quinases e recruta componentes de sinalização envolvidos na ativação da transcrição gênica promovida por NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) (PAHL, 1999). Dependendo do tipo celular e de seu estado, o TNF pode apresentar efeitos opostos, ou seja, pode induzir a proliferação ou a apoptose (SZATMÁRY, 1999; WALLACH *et al.*, 1999; WAJANT & SCHEURICH, 2001). Estes efeitos são, em parte, dependentes da localização nuclear e consequente ativação de NF- κ B (BALDWIN, 1996; MARTIN *et al.*, 2001).

O NF- κ B é composto por duas subunidades e, geralmente, é encontrado no citoplasma através de sua associação com proteínas da família I κ B (inibidor de κ B) (KARIN & BEM-NERIAH, 2000). A família NF- κ B/REL é constituída por cinco proteínas p50/p105, p52/100, p65 (RELA), RELB, REL (c-Rel) (HOFFMAN *et al.*, 2006). Além disso, a composição deste fator de transcrição pode variar, afetando sua atividade. As proteínas REL são pertencentes a duas classes, as quais se diferenciam pela sua síntese e propriedades de transativação (KARIN & BEM-NERIAH, 2000). Uma das classes consiste nas proteínas p65 (RELA), RELB e c-REL, as quais são sintetizadas e, também, apresentam um domínio *REL homology domain* (RHD) na região amino-terminal, necessário para a dimerização e ligação ao DNA. Já os domínios relacionados à modulação da transcrição, são encontrados na região carboxi-terminal. A outra

classe, por sua vez é composta pelas proteínas p50/p105 (NF- κ B1) e p52/p100 (NF- κ B2), que são sintetizadas como precursores maiores (p105 e p100) com um domínio RHD na região amino-terminal e repetições de anquirina na região carboxi-terminal. O domínio carboxi-terminal desta segunda classe é removido por proteólise dependente de ubiquitina, onde haverá geração das formas maduras das proteínas p50 e p52, as quais apresentarão capacidade de se ligar ao DNA (KARIN & BEM-NERIAH, 2000). O controle da localização celular de NF- κ B é realizado por uma família de proteínas inibitórias denominada I κ B (I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B γ , Bcl-3 e os precursores de p100 e p105) cuja função central é se ligar a NF- κ B e prevenir sua ativação e consequente translocação para o núcleo. A proteína I κ B α é a mais abundante e melhor caracterizada nas células. A fosforilação de I κ B α é realizada pelo complexo quinase de I κ B (IKK), o qual constitui um ponto de convergência para a maioria dos estímulos que desencadeiam em parte, a ativação de NF- κ B (KARIN & BEM-NERIAH, 2000). Estudos relatam a interferência de proteínas virais com a ativação desregulada de NF- κ B. Um exemplo é a associação de NF- κ B com o vírus HTLV-1, a qual promove a transformação de linfócitos a partir de uma ativação constitutiva da translocação nuclear de NF- κ B, principalmente devido à ativação de I κ K (UHLIK *et al.*, 1998; LI *et al.*, 1999; XIAO *et al.*, 2000).

Outro fator importante a ser mencionado é a relação entre TNF e a resposta imune epitelial. Como citado anteriormente, os queratinócitos, principais células do tecido epitelial, são os principais contribuidores na produção de citocinas, tais como interleucinas e TNF. Tais citocinas podem ser induzidas ou geradas constitutivamente pelos queratinócitos (TIZARD *et al.*, 2000; GRÖNE, 2002). Uma epiderme saudável e intacta apresenta queratinócitos inativados; em outras palavras, possuem níveis baixos de proliferação na camada basal, ao passo que aqueles presentes nas camadas supra basais seguem o programa normal de diferenciação (NICKOLOFF & TURKA, 1993). A ativação dos queratinócitos é devida a diferentes injúrias sofridas e podem, eventualmente, ser desativados, retornando ao programa normal de sua diferenciação. O ativador inicial de queratinócitos, em geral, é a IL-1, a qual é encontrada em sua forma não processada e sendo liberada rapidamente quando as células sofrem danos. Após sua liberação, a IL-1 terá efeito parácrino, facilitando o recrutamento de linfócitos circulantes e, de forma autócrina, ativará os próprios queratinócitos. Como consequência, ocorrerá proliferação, migração e expressão de genes envolvidos na própria ativação dos queratinócitos, tais como TNF e TGF α (*transforming growth factor alpha*). O estado de ativação dos queratinócitos é preservado a partir da exposição ao TNF (NICKOLOFF & TURKA, 1993). Normalmente, os níveis do TNF são encontrados em baixos níveis nas camadas supra basais do epitélio, sendo formado e liberado após indução por IL-1. Pode-se verificar níveis elevados de TNF nesta região em condições como: alergias, dermatites, radiação ultravioleta e infecções virais. Por fim, a manutenção do estado ativado dos queratinócitos mediada pelo TNF irá

depende da causa e/ou eliminação do agente causador desencadeador do processo inflamatório (NICKOLOFF & TURKA, 1993).

1.3.4 HPV e resposta imune

Os HPV são epiteliotrópicos e o seu ciclo de replicação é dependente da diferenciação celular que ocorre neste tipo de tecido e podendo gerar infecções produtivas e crônicas. Estes vírus não causam infecções citolíticas e não promovem uma inflamação exacerbada, o que retarda ou mesmo anula uma resposta imunológica efetiva (HAWTHORN *et al.*, 1988). A maioria das infecções por HPV, mesmo sendo comuns, regride espontaneamente. De fato, a progressão das células infectadas por HPV de alto risco para o câncer invasivo do colo do útero ocorre em menos de 1% das mulheres infectadas. No entanto, aproximadamente 15% das mulheres não conseguem eliminar completamente as células infectadas pelo vírus, podendo ser estabelecida uma infecção persistente por HPV de alto risco, o que constitui um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de lesões malignas (TINDLE, 2002; STANLEY, 2012).

Como as infecções por HPV são exclusivamente intraepiteliais, os antígenos do vírus devem ser processados e apresentados pelas LC (APCs profissionais), que são encontradas na camada basal do epitélio escamoso. Além disso, a entrada do capsídeo viral é, normalmente, um sinal de ativação para as células dendríticas. Entretanto, existem evidências de que as LC não são ativadas pela internalização dos capsídeos do HPV nos queratinócitos (FAUSCH *et al.*, 2002), uma vez que os números das LC são significativamente reduzidos nas lesões intraepiteliais cervicais e vulvares causadas por HPV16 (MATTHEWS *et al.*, 2003; VAN SETERS *et al.*, 2008; LEONG *et al.*, 2010).

Por sua vez, os linfócitos T CD8⁺ possuem uma função extremamente importante na morte das células infectadas por HPV (MELIEF *et al.*, 2002). Em estudo conduzido por Nakagawa e colaboradores, foi possível detectar maiores respostas de CTLs à oncoproteína E6 de HPV16 em mulheres infectadas sem lesões intraepiteliais, quando comparadas às mulheres que apresentavam lesões (NAKAGAWA *et al.*, 2000). Além disso, na presença da oncoproteína viral E7, os CTLs podem ser detectados com frequência em lesões que contêm infiltrados tumorais (EVANS *et al.*, 1997). As oncoproteínas E6 e E7 do HPV participam de diversas formas nos mecanismos de evasão da resposta imune (TINDLE, 2002). Os mesmos incluem a inibição das vias de IRF1 (*Interferon regulatory factor 1*) e IRF3, inibição da síntese de IL-18, IL-1 e a diminuição da expressão das proteínas que transportam peptídeos para o retículo endoplasmático, TAP1 (*Transporter associated with Antigen Processing 1*) e TAP2 (*Transporter associated with Antigen Processing 2*), dificultando desta forma a apresentação de antígenos virais. Além disto, células que expressam E6 e E7 de HPV de alto risco apresentam

níveis aumentados de TGF β (*transforming growth factor- β*) e ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*; STANLEY, 2006).

Alguns estudos realizados *in vitro* descrevem que a proliferação, diferenciação e imortalização de queratinócitos humanos podem ser moduladas por diferentes reguladores positivos e negativos. Entre eles, TGF- β e TNF revelaram-se potentes inibidores da proliferação destas células e parecem desempenhar um papel importante no controle *in vivo* da proliferação das mesmas (MÜNGER *et al.*, 1992; VILLA *et al.*, 1992; VIEIRA *et al.*, 1996; BOCCARDO *et al.*, 2004). Estes efeitos podem estar associados diretamente ao efeito destas citocinas nas células infectadas ou através da regulação negativa do promotor viral (KYO *et al.*, 1994). A resistência de células que expressam oncogenes de HPV de alto risco ao efeito citostático/citotóxico de algumas citocinas poderia constituir um passo fundamental para o desenvolvimento de tumores associados a estes vírus. Em estudos anteriores, observou-se que o TNF apresenta efeito antiproliferativo em queratinócitos primários humanos e em queratinócitos imortalizados por HPV16 (HF698). Por outro lado, queratinócitos imortalizados com HPV18 (HF18Nco) e diversas linhagens derivadas de tumores da cérvix uterina, são resistentes ao efeito antiproliferativo desta citocina (VILLA e SCHLEGEL 1991; VILLA *et al.*, 1992; VIEIRA *et al.*, 1996). Além disso, diversos estudos mostram que as proteínas E6 e E7 de HPV16 são capazes de induzir resistência ao TNF e outras citocinas relacionadas, como por exemplo, TNF-*related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) (FILIPPOVA *et al.*, 2002; 2006; BOCCARDO *et al.*, 2004; 2010).

O resultado da interferência do HPV e suas oncoproteínas, especialmente E6 e E7, na ativação e liberação de IL-1 ainda não está completamente definido. Alguns trabalhos apontam para a redução da secreção de IL-1 em queratinócitos transduzidos com os oncogenes E6 e E7 (NIEBLES *et al.*, 2013). Em contrapartida, alguns autores demonstraram o aumento na síntese e liberação de IL-1 em células que expressam altos níveis de oncoproteínas E6 e E7 de HPV 16. (TJONG *et al.*, 2001; BEHBAKHT *et al.*, 2002). Dados anteriores de nosso grupo, obtidos por *microarray*, apontam alterações na expressão de determinados genes envolvidos na via da IL-1, dentre eles o transcrito IL-1R2 (receptor *decoy* da via), em células imortalizadas com HPV16 e 18 (TERMINI *et al.*, 2008). O grupo possui estudos em andamento para caracterização desta alteração em queratinócitos que expressam oncoproteínas virais do HPV.

Em conjunto, estes dados sugerem que a aquisição de resistência ao TNF e IL-1 pode ser um evento importante na carcinogênese mediada por HPV. No entanto, os eventos moleculares associados ao efeito diferencial destas citocinas em células infectadas pelo HPV ainda não estão completamente elucidados.

1.4 ESTRESSE OXIDATIVO

O termo estresse oxidativo indica um desequilíbrio no balanço redox intracelular e reflete tanto em alterações na produção e detoxificação de espécies oxidantes, bem como nas espécies que acumulam, seus sítios de geração e nos aspectos temporais da formação de oxidantes. Esse desequilíbrio pode resultar no acúmulo de modificações oxidativas em biomoléculas, como ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos, com consequentemente perda de suas funções. Em sistemas biológicos, as espécies oxidantes mais relevantes são (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS), formadas como subprodutos do metabolismo celular normal. Em condições fisiológicas, ROS são formadas principalmente durante o transporte de elétrons na mitocôndria e em reações enzimáticas, como aquelas catalisadas pela NADPH oxidase; entre as principais espécies oxidantes de relevância biológica estão os radicais hidroxila ($\text{HO}^\bullet$), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), peroxila ($\text{ROO}^\bullet$), alcóxila ($\text{RO}^\bullet$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HClO) (DEVASAGAYAM *et al.*, 2004). O acúmulo de biomoléculas oxidadas é associado com alterações no metabolismo aeróbico, resposta inflamatória, efeitos biológicos de radiação UV, hipóxia, proliferação celular anômala e infecções virais, dentre outros. Importaneamente, o estresse oxidativo tem sido correlacionado ao desenvolvimento de diversas condições patológicas, que incluem câncer, desordens neurológicas, aterosclerose, diabetes, asma, entre outras patologias (HALLIWELL *et al.* 2004; XU *et al.*, 2008; GALLAGHER *et al.*, 2009).

O acúmulo de lesões em DNA e/ou dificuldades em repará-las podem desencadear o processo de apoptose ou morte celular. Por mecanismos ainda não claramente estabelecidos, a presença das oncoproteínas E6 e E7 interfere neste fenômeno, favorecendo o acúmulo de mutações, processo diretamente relacionado à transformação celular (KAINA, 2003; MOODY & LAIMINS 2010; WILLIAMS *et al.*, 2014). O estresse oxidativo está diretamente envolvido no processo de transformação celular. No caso de células infectadas por HPV de alto risco, o estresse oxidativo, gerado pelo metabolismo anormal dos queratinócitos que expressam as oncoproteínas virais e pela resposta inflamatória crônica não efetiva, pode contribuir no processo de transformação celular. Mais ainda, a instabilidade genômica promovida pelo estresse oxidativo favoreceria a integração do HPV no genoma das células infectadas, principal causa da persistência viral e progressão de lesões ao câncer (MOODY & LAIMINS, 2010; WILLIAMS *et al.*, 2011).

A expressão consistente de oncoproteínas específicas dos vírus Epstein-Barr (EBV), vírus da hepatite C (HCV) e vírus da hepatite B (HBV) está diretamente associada ao aumento do estresse oxidativo nas células infectadas. De fato, este efeito tem sido associado ao desenvolvimento de hepatocarcinomas (associados ao HBV e HCV) e tumores de nasofaringe (associados à infecção por EBV). Em todos os casos, ocorre tanto a modulação direta do estresse oxidativo pelas oncoproteínas específicas destes vírus, como a interferência indireta da

resposta inflamatória crônica gerada pelo hospedeiro contra estas infecções. O aumento do estresse oxidativo favorece o acúmulo de danos ao DNA, além de alterar vias de sinalização celulares que culminam em aberrações cromossômicas e transformação celular (TSAI *et al.*, 2010; KAMRANVAR *et al.*, 2011; TAYLOR *et al.*, 2011). Vale a pena ressaltar que o estresse oxidativo durante infecções virais pode ser modulado tanto pela produção intracelular de ROS, como pela liberação dessas espécies pelos neutrófilos e macrófagos ativados (LEVITSKY 2002; TINDLE *et al.*, 2002; WIELAND *et al.*, 2005).

Alguns dados da literatura apontam para o aumento de ROS e NOS (óxido nítrico sintase) em células infectadas com HPV ou que expressam as oncoproteínas virais E6 e E7 (BEEVI *et al.*, 2007; JIANG *et al.*, 2013; WAROWICKA *et al.*, 2013; WILLIAMS *et al.*, 2014; MARULLO *et al.*, 2015; VISALLI *et al.*, 2015). No entanto, o papel do HPV na modulação do estresse oxidativo ainda não está bem estabelecido.

1.4.1 Mitocôndria como fonte de espécies reativas de oxigênio

Na maioria das células de mamíferos, as mitocôndrias são a fonte fisiológica mais relevante de ROS. A produção de ROS pode causar dano mitocondrial, encontrado em diversas patologias, mas também é importante na sinalização redox da mitocôndria para o resto da célula (MURPHY 2009). Considera-se que, na mitocôndria, os complexos I e III da cadeia transportadora de elétrons (CTE) sejam os principais responsáveis pela produção de $O_2^{\cdot -}$ (figura 5). A CTE é composta por complexos proteicos de alto peso molecular, apresentando em sua estrutura carreadores de elétrons. Esses carreadores realizam o transporte dos equivalentes redutores (na forma de coenzimas reduzidas, NADH e $FADH_2$), que foram geradas por reações catabólicas, sucessivamente até o O_2 , gerando água e um gradiente de prótons (H^+) através de membrana mitocondrial interna (ΔpH). Em virtude da natureza iônica do próton, um gradiente elétrico também é formado entre a matriz mitocondrial e o espaço inter-membranas (potencial elétrico de membrana mitocondrial - $\Delta \Psi$). De maneira combinada, ΔpH e $\Delta \Psi$, contribuirão para a formação da força próton-motriz (FPM ou Δp). A FPM é a energia potencial desses gradientes, sendo utilizada, particularmente, para a síntese de ATP, transporte de metabólitos e homeostase iônica (FIGUEIRA *et al.*, 2013).

O início do fluxo de elétrons se dá a partir da CTE via complexo I (NADH: ubiquinona oxidoreductase), quando o doador de elétrons é o NADH, ou via complexo II (SDH: succinato desidrogenase, que também é uma enzima do Ciclo de Krebs), o qual utiliza FAD como cofator (revisado por HIRST, 2013). O primeiro grupo a receber elétrons, no sítio de oxidação de NADH, é a flavina mononucleotídeo (FMN), a qual transfere elétrons através dos centros de ferro-enxofre (conhecidos como Fe-S *clusters*) até a ubiquinona (UbQ). Se o sítio de ligação a

NADH, NADH desidrogenase – módulo N, estiver desocupado e FMN encontrar-se totalmente reduzido, possivelmente o O_2 sofrerá redução parcial (monoeletrônica) a $O_2^{\cdot-}$ (KUSSMAUL & HIRST, 2006). Por não existirem subunidades extras/supérfluas ao redor do sítio de ligação de NADH, reforça-se a hipótese de que há formação de oxidantes nesse local (VINOTHKUMAR *et al.*, 2014).

Figura 5. Geração de superóxido a partir da cadeia transportadora de elétrons. A produção primária de $O_2^{\cdot-}$ ocorre através do complexo I e do complexo III. O $O_2^{\cdot-}$ não se difunde facilmente através das membranas individualmente, sugere-se que esta molécula passe através das membranas mitocondriais para o citosol a partir de canais especializados (exemplo: VDAC – *voltage-gated anion channel* – representado em rosa). O $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial é rapidamente convertido em H_2O_2 a partir da ação das superóxido dismutases (SODs) de matriz e intermembranares, ao passo que no citosol, o $O_2^{\cdot-}$ é convertido em H_2O_2 pela SOD citosólica. Por fim, o H_2O_2 difunde-se livremente através das membranas sendo convertido em radical hidroxila ($OH^{\cdot}$). I: NADH ubiquinona oxidoreductase; II: complexo II - SDH: succinato desidrogenase; III: citocromo bc_1 ; IV: citocromo c oxidase; V: ATP sintase. FONTE: Adaptado de FOGG *et al.*, 2011.

Acredita-se que outro local responsável pela geração de $O_2^{\cdot-}$ seja o sítio de ligação à UbQ (módulo Q), mesmo local onde a rotenona se liga, inibindo a atividade do complexo I (HERRERO & BARJA, 2000; FIGUEIRA *et al.*, 2013). Não importando o mecanismo, ambos os sítios de geração de $O_2^{\cdot-}$ liberam esta molécula na matriz mitocondrial. O complexo II, por sua vez, possui menor susceptibilidade em produzir oxidantes devido ao arranjo de seus centros redox (YANKOVSKAYA *et al.*, 2003). Entretanto, as atividades de SDH, glicerol-3-fosfato desidrogenase e acil-CoA desidrogenases contribuem para uma redução no montante de UbQ, o que pode ocasionar um fluxo reverso de elétrons em direção ao complexo I (pelo menos em mitocôndrias isoladas), e consequente aumento da geração de $O_2^{\cdot-}$ no sítio de ligação da UbQ (FIGUEIRA *et al.*, 2013). Por fim, mesmo não havendo um mecanismo bem definido, sabe-se que há produção de $O_2^{\cdot-}$ no complexo III, com liberação dessa espécie tanto na matriz mitocondrial, quanto no espaço intermembranar (MULLER *et al.*, 2004).

Os efeitos biológicos da produção de $O_2^{\cdot-}$ estão claramente associados aos níveis em equilíbrio dessa espécie. Na sinalização celular, quando encontrada em níveis baixos, $O_2^{\cdot-}$ participa de processos celulares normais, tais como proliferação e diferenciação. Já quando o superóxido é encontrado em níveis moderados, irá possibilitar a ativação de programas adaptativos, incluindo a transcrição de genes antioxidantes que estão regulados positivamente. Por fim, em altos níveis, o $O_2^{\cdot-}$, irá levar a célula à senescência e morte celular (FIGUEIRA *et al.*, 2013).

1.5 SISTEMA ANTIOXIDANTE

O sistema antioxidante controla o balanço entre a produção e a remoção de espécies oxidantes (ROS e RNS) (VALKO *et al.*, 2007). O sistema antioxidante é dividido em dois grupos, enzimático e não enzimático. O grupo enzimático é formado, majoritariamente, pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GRx), enquanto que o grupo não enzimático é formado por pequenas moléculas orgânicas, tanto produzidas pelo organismo, quanto provenientes da alimentação, tais como glutathione, ácido lipóico, ácido úrico, coenzima Q10, vitamina C, vitamina E, ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 e 6, entre outros (WILLCOX *et al.*, 2004).

As espécies antioxidantes devem ser constantemente recicladas no organismo, uma vez que durante seu mecanismo de ação, são oxidadas. Em decorrência dessa propriedade, em determinadas circunstâncias, as espécies antioxidantes podem atuar como pró-oxidantes, participando de reações redox com potencial implicação biológica (YOUNG & WOODSIDE, 2001). O sistema antioxidante pode atuar de duas formas, pelo processo de quebra de corrente (*Chain-breaking process*) ou por prevenção. No processo de quebra de corrente, a espécie antioxidante atua bloqueando a progressão de reações radiculares entre intermediários radicais, que ao serem reduzidos geram um radical na molécula com as quais reagem. Nesse processo, o antioxidante (exemplo: Vitamina C) funciona como doador de elétrons, mas o produto gerado é mais estável e não dá prosseguimento à cadeia de reações radiculares (YOUNG & WOODSIDE, 2001).

1.5.1 Família das Superóxido Dismutases (SOD)

As proteínas pertencentes à família das superóxido dismutases são as principais enzimas antioxidantes envolvidas na metabolização de $O_2^{\cdot-}$. Essa família é constituída por três membros em mamíferos: i) superóxido dismutase dependente de cobre-zinco – Cu/ZnSOD (codificada pelo gene *SOD1*), encontrada no citoplasma; ii) superóxido dismutase dependente de manganês

– MnSOD (codificada pelo gene *SOD2*), localizada na mitocôndria; iii) superóxido dismutase extracelular – ECSOD, codificada pelo gene *SOD3*, encontrada no meio extracelular (MIAO & ST CLAIR, 2009).

1.5.1.1 Superóxido Dismutase 2 (SOD2)

O gene *SOD2* está localizado no cromossomo 6q25.3, sendo composto por cinco éxons e quatro íntrons. Seu promotor basal não apresenta TATA e CAAT *boxes*, mas possui motivos ricos em guanina-citosina (GC), além de possuir numerosas sequências consenso para os fatores de transcrição SP1 e AP2 em sua região promotora proximal (figura 6; DYNAN, 1986; JONES *et al.*, 1988; MIAO & ST CLAIR, 2009).

Figura 6. Organização do gene SOD2 humano. Os elementos reguladores da região flanqueadora 5' e o segundo íntron de SOD2 estão identificados de maneira expandida na parte inferior da figura. Os números correspondentes aos números negativos e positivos apontam sua localização relativa ao sítio de iniciação, o qual é designado como +1. FONTE: Adaptado de MIAO & ST CLAIR, 2009.

A proteína SOD2 exerce um papel fundamental na regulação do estresse celular. Esta enzima catalisa a dismutação de radicais ânion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (como mostra a reação química abaixo), que pode ser posteriormente removido por outros sistemas enzimáticos.

Desta forma, a proteína SOD2 contribui para a homeostase celular prevenindo a reação direta de biomoléculas com radicais superóxido (ZELKO *et al.*, 2002; PIAÑTÁ, 2005). Além disso, a proteína SOD2 também está envolvida diretamente em processos celulares importantes na carcinogênese, tais como proliferação, crescimento e diferenciação celulares. Estudos *in vitro*

demonstraram que a expressão aumentada dos membros da família das superóxido dismutases, correlaciona-se com maior diferenciação celular, diminuição do crescimento e proliferação celular e, notadamente, na reversão do fenótipo maligno (KINNULA *et al.*, 2004). No entanto, as funções exatas de SOD2 em processos neoplásicos não são completamente compreendidas. Paradoxalmente, enquanto a redução do estresse oxidativo decorrente do aumento de expressão da proteína SOD2 poderia evitar lesões no DNA e, conseqüentemente, exercer um efeito protetor no processo de carcinogênese, o aumento da expressão de SOD2 em células neoplásicas as protegeria do potencial efeito citotóxico de ROS. A redução da expressão de SOD2 também pode levar ao desbalanço na produção/remoção de ROS, favorecendo a seleção de células que acumulam danos em seu DNA (MIAO & ST CLAIR, 2009; HOLLEY *et al.*, 2012). Este aparente paradoxo tem sido atribuído, em parte, às alterações no balanço redox em células malignas, de acordo com o microambiente específico. Resultados de vários grupos mostram que a proteína SOD2 tem a expressão aumentada em diversos tipos de câncer quando comparados aos tecidos normais, incluindo carcinomas coloriais, de pulmão e gástrico-esofágicos, entre outros (revisado por DHAR & ST. CLAIR *et al.*, 2012). Por outro lado, em tumores de próstata, os níveis de SOD2 estão diminuídos quando comparados ao tecido normal prostático (BAKER *et al.*, 1997; BOSTWICK *et al.*, 2000).

Dados na literatura mostram que a SOD2 RNA-binding protein é fosforilada pela tirosina quinase (TK) e sua desfosforilação é necessária para sua atividade de ligação (KNIRSCH & CLERCH, 2001; HOULDSWORTH, 2016). Sendo assim, o estado de fosforilação da SOD2-RNA binding protein pode afetar a capacidade da célula de resistir aos efeitos nocivos de ROS ou, talvez, regular a sinalização mediada por ROS, atuando como um segundo mensageiro, como por exemplo, na ativação de NF- κ B (SCHRECK *et al.*, 1991).

De maneira interessante, a expressão de SOD2 encontra-se diminuída em diversos tipos de câncer devido à metilação de sequências específicas na região intrônica do gene e aos níveis elevados do fator de transcrição AP2, o qual interage com sequências da região flanqueadora 5' do gene de SOD2 (HUANG *et al.*, 1997; HUANG *et al.*, 1999; ZHU *et al.*, 2001). Deve-se, também, levar em consideração o fato de que a atividade de SOD2 não é apenas regulada em nível transcricional, mas também podem ocorrer alterações pós-traducionais. (CHUNG *et al.*, 1998).

Vale a pena ressaltar que os níveis de expressão do gene/proteína SOD2 podem ser induzidos pelo fator de transcrição NF- κ B em diversos tipos celulares após tratamento com TNF e IL-1 (KININGHAM *et al.*, 2001; SUGINO *et al.*, 2002; MCCARTHY *et al.*, 2013). Interessantemente, alguns estudos descrevem a resistência ao efeito citotóxico, antiproliferativo e apoptótico do TNF em células que expressam SOD2 em altos níveis (LI *et al.*, 1997; MANNA *et al.*, 1998; DELHALLE *et al.*, 2002; DASGUPTA *et al.*, 2006).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

Determinar o papel da proteína SOD2 na patogênese associada ao HPV e no efeito de citocinas pró-inflamatórias em queratinócitos que expressam oncoproteínas de HPV.

2.2 Objetivos específicos

- Estabelecer linhagens celulares transduzidas com as oncoproteínas E6 e/ou E7 de HPV16;
- Em células que expressam as oncoproteínas E6 e E7 de HPV16 (culturas em monocamada):
 - Determinar os níveis e padrão de expressão de SOD2;
 - Caracterizar a presença de marcadores de estresse oxidativo;
 - Determinar os níveis e padrão de expressão de SOD2 tratamento com TNF e IL-1 β .

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura celular

Neste estudo, foram realizados experimentos utilizando-se as seguintes linhagens celulares e culturas primárias:

PHK: Queratinócitos primários humanos originados de prepúcio de recém-nascidos (*Primary Human Keratinocytes*, Lonza, Basel, Suíça).

PHKΦ: queratinócitos transduzidos com vetor retroviral pLXSN.

PHKE6: queratinócitos transduzidos com vetor retroviral contendo a sequência de E6 de HPV16.

PHKE7: queratinócitos transduzidos com vetor retroviral contendo a sequência de E7 de HPV16.

PHKE6E7**b**: queratinócitos transduzidos com vetor retroviral contendo a sequência de E6 e E7 de HPV16 (queratinócitos não imortalizados – **b**: passagem baixa).

PHKE6E7**a**: queratinócitos transduzidos com vetor retroviral contendo a sequência de E6 e E7 de HPV16 (queratinócitos imortalizados – **a**: passagem alta).

Bosc23: Células empacotadoras, derivadas de HEK-293T, que produzem retrovírus ecotrópicos capazes de transduzir células de camundongo (PEAR *et al.*, 1993; ATCC®CRL 11270).

Am12: Células empacotadoras derivadas de NIH 3T3 (linhagem de fibroblastos de camundongos), que produzem lentivírus cujo envelope anfotrópico é capaz transduzir quase todas as células de mamíferos (MARKOWITZ; GOFF; BANK, 1988). Gentilmente cedidas pela Dra. Louise T. Chow, Departamento de Bioquímica e Genética Molecular, Universidade do Alabama, Birmingham, Alabama, EUA.

C33 (ou C33A): Linhagem derivada de carcinoma escamoso cervical. Negativa para HPV. Possui mutações nos genes *p53* e *pRb* (ATCC®HTB31™).

SiHa: Linhagem derivada de carcinoma escamoso cervical contendo genoma de HPV 16 (ATCC®HTB35™).

HeLa: Linhagem derivada de adenocarcinoma cervical contendo genoma de HPV18 (ATCC®CCL2™).

As culturas de queratinócitos foram mantidas em meio KSFM (*Life Technologies*, Califórnia, EUA) suplementado com fator de crescimento epidérmico recombinante (5 ng/mL) e extrato de glândula pituitária (50 mg/mL). As linhagens tumorais foram cultivadas em meio de cultura MEM (*Thermo Fisher*, Massachussets, EUA) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB, *Thermo Fisher*, Massachussets, EUA). As demais linhagens foram cultivadas em meio DMEM contendo 10 % de SFB. Todas as linhagens permaneceram em estufa a 37°C e 5 % de CO₂.

3.2 Vetores retrovirais

Vetores retrovirais que expressam E6 e E7 de HPV forma transduzidos em culturas de queratinócitos. Os vetores retrovirais, como seguem abaixo, baseados no vetor pLXSN, foram cedidos gentilmente pela Dra. Denise A. Galloway (*Fred Hutchinson Cancer Research Center*, Seattle, USA).

-pLXSN: vetor retroviral contendo sítio de múltipla clonagem (*Clontech*).

Figura 7. Mapa esquemático do vetor retroviral pLXSN. Vetor utilizado para produção de vetores retrovirais carregando os genes de interesse clonados no sítio múltiplo de clonagem (MCS). Este vetor possui gene de resistência à ampicilina para seleção em bactérias e gene de resistência à neomicina para seleção de células transduzidas utilizando-se o antibiótico geneticina.

-pLXSN 16 E6: vetor retroviral contendo a sequência de E6 de HPV16 (HALBERT; DEMERS; GALLOWAY,1992).

-pLXSN 16 E7: vetor retroviral contendo a sequência de E7 de HPV16 (HALBERT; DEMERS; GALLOWAY,1992).

-pLXSN 16 E6E7: vetor retroviral contendo a sequência de E6 e E7 de HPV16 (HALBERT; DEMERS; GALLOWAY,1992).

3.3 Transdução de vetores retrovirais

Para a realização das transduções, os vetores retrovirais contendo os genes que codificam as oncoproteínas E6 e/ou E7 foram introduzidos em células Bosc23 por transfecção utilizando o reagente FuGENE®, seguindo as orientações do fabricante. A seguir, as células foram incubadas a 37°C e 5 % de CO₂. O sobrenadante foi coletado após o período de 48 horas e utilizado para transduzir as células Am12, as quais foram mantidas nas mesmas condições. Para realizar a transdução, o meio contendo a produção de retrovírus foi filtrado através de um filtro de 0,45 µm e gotejado sobre a cultura de células Am12, e acrescido de 10 µg/mL de polibreno (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, USA).

Após 24 horas, o meio foi substituído por meio DMEM contendo 10 % de SFB e antibiótico específico, de acordo com o vetor utilizado. Após uma semana de seleção, as células Am12 foram mantidas em meio fresco para recuperação até se verificar formação de colônias. O sobrenadante destas células foi utilizado para transduzir PHK, como já descrito anteriormente. Em seguida, as células foram selecionadas em meio KSFM com antibiótico por 48 h, para então serem utilizadas em diversos experimentos. As linhagens transduzidas, PHK pLXSN foram mantidas congeladas em nitrogênio líquido.

Esta parte dos experimentos foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Enrique Boccardo, no laboratório de Oncovirologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP).

3.4. Tratamento com citocinas (TNF e IL-1β)

Foi avaliada a produção de citocinas pelos queratinócitos normais (PHK), queratinócitos que expressam os oncogenes E6 e/ou E7 de HPV16 (PHKΦ, PHKE6, PHKE7, PHKE6E7) e linhagens tumorais (SiHa e HeLa) após o tratamento com IL-1β e TNF. As linhagens celulares cultivadas nas condições anteriormente descritas foram semeadas em placas de Petri (5 x 10⁵ células por placa de 100 mm de diâmetro). Ao atingirem confluência de 40 % a 50 %, o meio de cultura foi substituído por meio fresco contendo 1 ng/mL de IL-1β recombinante humana (*Roche, Mannheim, Germany*) e 2 nM de TNF recombinante humano (*Roche, Mannheim,*

Germany). Tais concentrações foram utilizadas com base em estudos prévios do grupo e dados da literatura. Após os tempos de tratamento determinados (3 horas, 16 horas e 24 horas), foram extraídas proteínas para sua utilização nos ensaios de *Western Blot*.

3.5 Extração proteica

A extração de proteínas das culturas celulares em monocamada foi realizada mediante lise celular com tampão de extração (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,5 % NP40 e 0,1 mM EDTA). As células passaram pelo processo de lise e os extratos obtidos foram colocados em tubos de 1,7 mL e mantidos em gelo por 20 minutos. Após esse tempo, os tubos foram centrifugados a 4°C por 15 minutos a 14.000 rpm para a separação da fração proteica solúvel dos restos celulares. Os sobrenadantes foram, então, transferidos para tubos limpos e estocados à -80°C. A dosagem de proteínas foi realizada pelo método de *Bradford* (*Bio Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate*), conforme instruções do fabricante.

3.6 Expressão proteica/*Western Blot* (WB)

As proteínas foram separadas por SDS-PAGE e transferidas (*Bio-Rad Power PAC 300*) para uma membrana de polivinilidene difluoreto (PVDF) (*Hybond-P, GE Healthcare, UK*), empregando-se 60 volts por duas horas e utilizando-se o tampão de transferência (3 g Tris, 14,4 g glicina, 1000 mL água) contendo 20% (v/v) de metanol. Após o término da transferência, a membrana foi lavada com PBS pH 7,4, 0,05 % *Tween-20* e bloqueada com 5 % (p/v) de leite em pó desnatado (dissolvido em PBS *Tween-20* 0,05%) por duas horas. Após este período, a membrana foi incubada por 12-18 horas com anticorpo primário contra a proteína de interesse em diluição específica (tabela 1) em 1 % de leite em pó desnatado diluído em PBS *Tween-20* 0,05 %. A membrana foi então lavada para a remoção dos anticorpos não ligantes e incubada por 1 hora com anticorpo secundário de coelho ou camundongo conjugados com peroxidase. A revelação foi conduzida pelo método de quimiluminescência usando o kit *ECLTM Prime Western Blotting Detection Reagent* (*Ge Healthcare Life Sciences*).

Tabela 1. Anticorpos utilizados para ensaios de *Western Blot* e imunofluorescência.

Proteína Reconhecida	Marca do anticorpo	Número de Catálogo	Concentração Utilizada
SOD2	Abcam	Ab13533	1:3000 (WB)/1:1000 (IF)
p53	Abcam	Ab131442	1:750
E6 HPV16	Arborvita	AVC1006	1:500
E7 HPV16	Arborvita	AVC1015	1:500
COX IV (3E11)	Cell Signaling	4850	1:1000
α -Tubulina	Sigma	T9026	1:5000
β -actina	Sigma	A2228	1:5000

3.7 Imunofluorescência (IF)

As linhagens SiHa e HeLa foram cultivadas em placa de 24 poços contendo lamínulas de 13 mm, em meio MEM com 10 % de SFB. Quando as células atingiram confluência de 50-60 %, o meio foi retirado dos poços, e estas foram lavadas com PBS 1x por três vezes. Em seguida, as células foram fixadas com paraformaldeído (4 % m/v) durante 10 minutos à temperatura ambiente. Após esse tempo, lavou-se as células duas vezes com PBS *Tween-20* 0,05 %. Para a etapa de permeabilização, utilizou-se metanol durante três minutos e, em seguida, lavou-se com PBS 1x três vezes para hidratar as células.

Em seguida, realizou-se o bloqueio durante meia hora utilizando PBS 1x com 5 % de SFB. Após esse período, incubou-se o anticorpo primário (SOD2 – *Abcam* 13533) na concentração 1:1000, pelo período de 12-18 horas a 4°C. O anticorpo primário foi retirado, com consecutiva lavagem das células com PBS *Tween-20* 0,05 % por três vezes. Incubou-se então, o anticorpo secundário (*Alexa flúor 488, Carlsbad, CA, USA*) por uma hora no escuro à temperatura ambiente. Por fim, as células foram lavadas duas vezes por cinco minutos, com PBS 0,05 % *Tween-20*. A seguir, as lâminas foram montadas com adição de 5 μ L de *Vectashield® Mounting Medium with Dapi* e, em seguida, das lamínulas com as células aderidas em sua superfície. As lamínulas foram vedadas com esmalte e abrigadas da luz para secarem.

3.8 Medida da taxa de consumo de oxigênio (Oxygen consumption rate - OCR)

3.8.1 OCR de complexos individuais da cadeia transportadora de elétrons (CTE) em células permeabilizadas

Com o objetivo de monitorar o consumo de O₂ em células permeabilizadas a partir de substratos específicos para os Complexos I e II da CTE, utilizou-se um oxígrafo (figura 8) de alta resolução *Oxygraph-2k*, marca *Oroboros* (*Oroboros Instruments*, Innsbruck, Áustria)

concomitantemente com o uso do *software DatLab* versão 4.2.0.73 (*Oroboros Instruments*, Innsbruck, Áustria).

Para isso, queratinócitos transduzidos com os oncogenes E6 e E7 de HPV16 e a linhagem transformada positiva para HPV16, SiHa, foram cultivados em garrafas de 75 cm² contendo meio KSFM (*Life Technologies*, Califórnia, EUA) suplementado com fator de crescimento epidérmico recombinante (5 ng/mL) ou MEM com 10 % de SFB e extrato de glândula pituitária (50 mg/mL). A linhagem transformada, SiHa, foi também cultivada em garrafa de 75 cm² contendo meio MEM contendo 10 % de SFB. Assim que as células atingiram 90 % de confluência, as células foram tripsinizadas, ressuspensas em meio MEM+10 % SFB. Contou-se o número de células com o fim de se obter uma quantidade entre 4×10^6 – 7×10^6 células para a realização do experimento. Feito isso, as células em suspensão em meio MEM+10 % SFB foram centrifugadas por 5 min a 1200 rpm e a temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e lavou-se o *pellet* com o meio de reação padrão (HEPES-KOH 10 mM – pH 7,2, sacarose 125 mM, KCl 65 mM, K₂HPO₄ 2mM e MgCl₂ 2 mM). Mais uma vez, centrifugou-se o conteúdo por 5 min a 1200 rpm em temperatura ambiente com subsequente descarte do sobrenadante e lavagem do *pellet* com o meio de reação padrão. Neste momento, a quantidade necessária para fazer o monitoramento da respiração foi separada, e o restante das células em suspensão foi mantido em banho a 37°C.

A linhagem transformada SiHa, foi permeabilizada com 20 µM digitonina em 2 mL de meio de reação padrão contendo 5 mM dos substratos glutamato, α-cetoglutarato, malato e piruvato, os quais doam elétrons para a CTE via complexo I. A seguir, foram feitas adições sequenciais de 400 µM adenosina difosfato (ADP), 0,5 µM Oligomicina A, 0,25 µM de CCCP (carbonil cianeto de 3-clorofenilhidrazona).

Os queratinócitos expressando os oncogenes E6 e E7 de HPV16 (PHKE6E7) receberam 5 mM de substratos, foram permeabilizados com 20 µM digitonina, seguidos de adições de 200 µM ADP, 0,5 µM Oligomicina A, 0,25 µM de CCC, 1 µM antimicina A (AA) e 1 µM de rotenona (ROT).

Todas as análises foram realizadas no oxígrafo Oroboros a 37°C.

Figura 8. Oxígrafo de alta resolução, *Oxygraph-2k* (Oroboros). O *Oroboros Oxygraph-2k* é utilizado para respirometria e fluorimetria de alta resolução. Este possui duas câmaras de vidro independentes de 2 mL, inseridas em um bloco de cobre, o qual é mantido em temperatura constante por regulação eletrônica. A concentração de oxigênio é registrada de maneira contínua por eletrodos polarográficos de oxigênio em cada câmara de vidro e os dados são processados com o auxílio do *software DatLab*. FONTE: Adaptado de *Oroboros Instruments*, Innsbruck, Áustria.

Os ensaios foram realizados em colaboração com a Profa. Dra. Nadja de Souza Pinto e o Dr. Mateus Prates Mori, do Laboratório de Genética Mitochondrial do Departamento de Bioquímica/Instituto de Química da USP.

3.8.2 OCR em células aderidas

Para analisar o consumo mitocondrial de O_2 em células intactas incubadas em meio de crescimento padrão (contendo glicose como principal substrato energético), o experimento de OCR em células aderidas foi realizado em aparelho *XF24 Extracellular Flux Analyser* (figura 9 - *Seahorse Bioscience*®).

Figura 9. *XF24 Extracellular Flux Analyser*. Este equipamento realiza medições a partir de biossensores fluorescentes ópticos que estão embutidos em um cartucho descartável estéril, o qual é colocado na microplaca de 24 poços contendo as culturas de células. FONTE: *Seahorse Bioscience*® - *Agilent*.

Previamente ao ensaio, o cartucho *XF24 Assay kit* contendo os sensores de oxigênio e pH foi hidratado utilizando-se 1 mL de *XF Calibrant Solution*, pH 7,4 a 37°C e incubado em estufa umidificada livre de CO₂ por 1 hora. Paralelamente, 4x10⁴/poço (SiHa) ou 5x10⁴/poço (HeLa) células foram semeadas em placas de 24 poços *XF24 V7 Cell Culture Microplates* em 250 µL de MEM+10 % SFB, distribuídas de acordo com a figura 10 e incubadas por 23 h em estufa umidificada com 5 % de CO₂. Antes da realização do ensaio, as células foram lavadas com 1 mL *XF Assay Medium* pH 7,4 (não tamponado), suplementado com 10 mM D-glicose (Glc) e 1 mM piruvato e foram incubadas em 675 µL do mesmo meio de cultura por no mínimo 1 hora em estufa livre de CO₂. Os poços A1, B4, C3, D6 (figura 10 – correção de fundo) correspondem ao controle sem células para correção dos valores de fluorescência basais. Foram medidas a taxa de consumo de O₂ (OCR) e taxa de acidificação do meio (ECAR - reflete a conversão da glicose em lactato, gerando ATP a partir da glicólise).

Figura 10. Desenho esquemático da distribuição das células em XF24 V7 Cell Culture Microplates. As células foram incubadas por 23 h em meio MEM contendo 10 % de SFB e só depois foram incubadas em *XF assay medium* contendo 10 mM de D-glicose (Glc) e 1 mM de piruvato.

Após o tempo de incubação, o cartucho foi retirado da estufa e os reservatórios injetores foram carregados da maneira a seguir com as drogas: 1) reservatório A, 75 µL de 10 µM oligomicina A (concentração final de 1µM); 2) reservatório B, 83 µL de 2 µM CCCP (concentração final de 200 nM); 3) reservatório C, 92 µL de 10 µM de ROT e AA (concentração final de 1µM). As drogas foram diluídas em *XF Assay Medium*, uma vez que se encontravam 10X concentradas em relação à concentração molar final desejada em meio de cultura. Após a calibração dos sensores do cartucho, realizou-se a medição da OCR em quatro condições: i) cinco medidas no meio *XF Assay Medium* suplementado com suas respectivas fontes oxidáveis de carbono (OCR inicial → OCR_i); ii) três medidas após a injeção do conteúdo do reservatório A (OCR acoplada à síntese de ATP → OCR_{ATP}); iii) três medidas após a injeção do conteúdo do reservatório B (OCR máximo → OCR_{máx}); iv) três medidas após a injeção do conteúdo do reservatório C (OCR residual → OCR_{res}).

Baseando-se nas medidas de OCR realizadas após as adições indicadas acima, calculou-se os parâmetros a seguir:

- Respiração basal (RB) = $OCR_i - OCR_{res}$
- Capacidade respiratória máxima (CRM) = $OCR_{máx} - OCR_{res}$
- Capacidade respiratória reserva (CRR) = $OCR_{máx} - OCR_i$
- Respiração acoplada à síntese de ATP (RATP) = $OCR_i - OCR_{ATP}$
- Vazamento de prótons (VP) = $OCR_{ATP} - OCR_{res}$
- Respiração não-mitocondrial (RNM) = OCR_{res}

Para a análise dos resultados obtidos, três experimentos independentes, com quintuplicatas de cada linhagem celular, foram realizados.

Os ensaios foram realizados em colaboração com a Profa. Dra. Nadja de Souza Pinto e o Dr. Mateus Prates Mori, do Laboratório de Genética Mitocondrial do Departamento de Bioquímica/Instituto de Química da USP.

3.9 Isolamento de mitocôndrias de células em cultura

As frações mitocondriais das linhagens PHK, PHKΦ, PHKE6, PHKE7, PHKE6E7b, PHKE6E7a, SiHa e HeLa foram isoladas seguindo as instruções presentes no manual do *Mitochondria/Cytosol Fractionation Kit* (Abcam – Ab65320). Assim que as frações mitocondriais e citosólicas foram separadas, as mesmas foram armazenadas a -80°C até o momento de uso.

3.10 Análises estatísticas

Todos os dados obtidos foram organizados para análise, utilizando-se *Microsoft Excel*® e *Origin*®. Para as análises relacionadas à expressão proteica de SOD2, foram realizados os testes estatísticos *One Way ANOVA* e T de *Student* não-pareado. Para a análise dos dados obtidos no oxígrafo, o programa *Origin*® foi utilizado para confecção dos gráficos. Para os dados obtidos em relação à taxa de consumo de oxigênio, realizou-se Teste T de *Student* não-pareado. E, por fim, para as análises relacionadas à expressão proteica de SOD2 mediante tratamento com citocinas pró-inflamatórias, foi realizado o teste estatístico *One Way ANOVA*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Localização celular da proteína SOD2

Para avaliar inicialmente a localização celular de SOD2, sua expressão foi avaliada a partir de ensaios de imunofluorescência em culturas de queratinócitos normais, em queratinócitos transduzidos com os oncogenes E6 e/ou E7 de HPV 16 (PHK, PHKE6, PHKE7, PHKE6E7**b**) e em células tumorais (SiHa e HeLa), conforme apresentado na figura 11 A e B respectivamente. Observa-se um padrão pontilhado citoplasmático de SOD2, compatível com sua localização mitocondrial, na literatura, descreve-se uma localização mitocondrial (matriz e espaço intermembranas em diversas espécies e tipos celulares (WEISIGER & FRIDOVICH, 1973; KARNATI *et al.*, 2013), alguns estudos sugerem que SOD2 pode ser encontrado nos peroxissomos (SINGH *et al.*, 1999).

Figura 11. Expressão da proteína SOD2 em linhagens em diferentes linhagens celulares. Ensaios de imunofluorescência realizados em **A)** queratinócitos normais (PHK) e queratinócitos transduzidos com os oncogenes E6 e/ou E7 de HPV16 (PHKE6, PHKE7, PHKE6E7) **B)** nas linhagens transformadas HPV positivas, SiHa e HeLa.

Figura 11. Expressão da proteína SOD2 em linhagens em diferentes linhagens celulares. Ensaios de imunofluorescência realizados em **A)** queratinócitos normais (PHK) e queratinócitos transduzidos com os oncogenes E6 e/ou E7 de HPV16 (PHKE6, PHKE7, PHKE6E7) **B)** nas linhagens transformadas HPV positivas, SiHa e HeLa.

Observa-se, em todas as linhagens celulares, um padrão pontilhado de SOD2 no citoplasma, com maior destaque para a linhagem tumoral HPV16 positiva, SiHa. Estes resultados são compatíveis com a localização mitocondrial de SOD2. Este resultado está de acordo com o que é encontrado na literatura, onde descreve-se uma localização mitocondrial, tanto na matriz, quanto no espaço intermembranas, em diversas espécies e tipos celulares (WEISIGER & FRIDOVICH, 1973; KARNATI et al., 2013). Entretanto, devido à existência de dados sugerindo uma possível localização de SOD2, também em peroxissomos (SINGH et al., 1999), optou-se por avaliar se em nossos modelos celulares, se SOD2 poderia estar localizada em outros compartimentos intracelulares, além da mitocôndria. Para isso, realizou-se a análise da localização intracelular de SOD2.

4.2 Análise da localização intracelular de SOD2

Diante desses dados apresentados na seção 4.1, e com o objetivo de confirmar a localização subcelular de SOD2 observada nos ensaios de imunofluorescência, realizou-se o isolamento de mitocôndrias de células em cultura. Realizou-se o isolamento mitocôndrias de queratinócitos normais (PHK), queratinócitos contendo apenas o vetor retroviral pLXSN (PHKΦ), queratinócitos transduzidos com os oncogenes E6 e/ou E7 de HPV16 (PHKE6, PHKE7, PHKE6E7b, PHKE6E7a) e das células transformadas SiHa e HeLa, conforme as instruções do

Kit Mitochondria/Cytosol Fractionation (Abcam). Em seguida, a dosagem de proteínas obtidas foi realizada pelo método de *Bradford*, conforme instruções do fabricante, e os níveis da proteína SOD2 foram determinados por *Western Blot*, tanto nos extratos das porções citosólicas, quanto nas porções mitocondriais. O resultado de um único experimento pode ser observado abaixo, na figura 20. O anticorpo COX4 foi utilizado como controle, uma vez que a COX4 (citocromo c oxidase ou complexo IV) é uma proteína localizada na mitocôndria.

Foi possível verificar na figura 12A, que as porções citosólicas de todas as linhagens celulares testadas não apresentam expressão da proteína SOD2. Por sua vez, na figura 12B, a expressão de SOD2 é observada nas porções mitocondriais que foram anteriormente isoladas. Este resultado apresenta diferenças quando comparados aos das figuras 14 e 16, onde foram utilizados extratos de proteínas totais das mesmas linhagens celulares. Observa-se que, principalmente em queratinócitos normais, queratinócitos transduzidos apenas com o vetor retroviral, queratinócitos expressando a oncoproteína E7, foram as linhagens que apresentaram maior diferença de expressão proteica de SOD2, quando comparadas às suas expressões utilizando os extratos proteicos totais. De maneira interessante, a linhagem transformada HeLa, apresenta níveis reduzidos da proteína SOD2 mitocondrial, quando comparados aos níveis proteicos totais.

Figura 12. Determinação da localização intracelular de SOD2. Queratinócitos normais, queratinócitos expressando as oncoproteínas E6 e/ou E7 de HPV16 e as linhagens transformadas HPV positivas SiHa e HeLa, tiveram suas mitocôndrias isoladas. A seguir, foi feita a análise dos níveis de SOD2 por *Western Blot*, em extratos proteicos provenientes das frações **A)** mitocondriais e **B)** citosólicas das linhagens celulares citadas acima. HeLa (C-) - controle negativo experimental. Resultado representativo de um experimento.

O dado apresentado a partir do isolamento das mitocôndrias de nossas linhagens celulares, juntamente com os resultados dos ensaios de imunofluorescência (seção 4.1) corroboram com dados publicados, em que SOD2 humana é exclusivamente encontrada na mitocôndria (WEISIGER & FRIDOVICH, 1973; KARNATI *et al.*, 2013; EKOUE *et al.*, 2017). Esta diferença de expressão proteica de SOD2 entre os extratos totais e os mitocondriais, pode ser observada pelo fato que no extrato total, se tem a quantificação absoluta de SOD2, inclusive das moléculas que estão sendo traduzidas no citosol, enquanto que após o isolamento das mitocôndrias, quantifica-se apenas aquela porção que já foi direcionada para a organela.

Os altos níveis de SOD2 podem reduzir a produção de superóxido nas mitocôndrias, evitando assim, a reação dos superóxidos com proteínas e com DNA dentro da mitocôndria. É importante mencionar que quando há aumento da atividade de quinase dentro das mitocôndrias, que fosforilam Bcl-2 e Bcl-2L1, pode ocorrer a ligação destas proteínas com Bax, desestabilizando a membrana mitocondrial e consequentemente, liberando o citocromo C

(SCHLESINGER *et al.*, 1997; VANDER HEIDEN *et al.*, 1997). Além disso, a redução de ROS durante este processo de fosforilação, causada pelo aumento da atividade de SOD2, pode prevenir reações de ROS com outros componentes mitocondriais. Outro mecanismo possível de ação de SOD2 é a proteção do DNA mitocondrial, após exposição à radiação, por exemplo (YONEDA *et al.*, 1995; LEACH *et al.*, 2001). Prevenir o dano ao DNA mitocondrial pode proteger a mitocôndria e evitar o processo apoptótico (EPPERLY *et al.*, 2003).

Neste sentido, futuramente será necessário avaliar lesões oxidativas em DNA mitocondrial e nuclear de células que expressam genes de HPV.

4.3 Análise dos níveis de expressão de SOD2 em diferentes linhagens celulares

Inicialmente, foram verificados os níveis de expressão proteica de SOD2 em diferentes linhagens celulares a partir de ensaios de *Western Blot*. Para isso, culturas das linhagens PHK, C33A, SiHa e HeLa, foram cultivadas conforme já descrito. A morfologia destas linhagens celulares pode ser observada na figura 13.

Figura13. Exemplos de linhagens celulares em cultura de monocamada (PHK, C33, SiHa e HeLa) em microscopia de fase.

Quando as células atingiram a confluência de 90%, foi realizada a extração de proteínas, suas quantificações pelo método de Bradford, e os níveis da proteína SOD2 foram determinados por *Western Blot*, utilizando-se extratos totais de proteína obtidos a partir de queratinócitos normais (PHK) e de culturas das linhagens derivadas de tumores de colo de útero C33 (HPV-negativa, genes *p53* e *pRb* mutados), SiHa (HPV16) e HeLa (HPV18). Como controle negativo (C-) da reação foi utilizado uma amostra de extrato da linhagem HeLa incubada exclusivamente com o anticorpo secundário. A quantificação dos níveis da proteína SOD2 foi realizada utilizando-se o *software ImageJ (NIH)*.

As linhagens celulares derivadas de carcinomas do colo do útero positivas para HPV, SiHa e HeLa, apresentaram níveis mais elevados da proteína SOD2 quando comparadas às linhagens PHK e C33. Tanto os queratinócitos normais, quanto a linhagem tumoral C33, são negativas para HPV. A figura 14 A mostra um exemplo representativo dos resultados obtidos. Para estes ensaios foram realizadas três repetições utilizando culturas celulares independentes (figura 14 B).

Figura 14. Análise da expressão da proteína SOD2 em linhagens HPV-positivas e HPV- negativas.
A) Análise dos níveis de SOD2 em extratos proteicos provenientes de amostras de culturas em monocamada de queratinócitos normais (PHK) e de linhagens tumorais derivadas de colo do útero HPV negativas (C33) e HPV positivas (SiHa e HeLa). HeLa (C-): controle negativo experimental. **B)** Quantificação dos níveis da proteína SOD2 utilizando-se o software ImageJ (NIH) e análise estatística por *One Way* ANOVA. Ensaios realizados em triplicata.

A diferença de expressão proteica de SOD2 observada na figura anterior, pode ser atribuída a diversos fatores. Decidiu-se avaliar se este efeito poderia estar associado à presença das oncoproteínas virais E6 e E7 e/ou se a expressão diferencial desta proteína estaria diretamente relacionada ao processo de imortalização/transformação celular. Para isso, optamos por expressar através de vetores retrovirais os principais oncogenes de HPV16, E6 e/ou E7 em queratinócitos normais (PHK), tipo celular HPV negativo. Adicionalmente, decidiu-se realizar

experimentos em queratinócitos normais transduzidos com E6 e E7, antes e após sua immortalização, derivada da expressão destas oncoproteínas virais. Foram comparadas linhagens com baixo número de passagens (até 10 repiques celulares/PHKE6E7b) e com alto número de passagens (após 100 repiques celulares/PHKE7a). Vale a pena ressaltar que queratinócitos normais derivados de cultura primária de prepúcio, são mantidos em cultura até no máximo 10-12 passagens. Após este período ocorre a diferenciação destas células com consequente morte celular. Diferentemente, em queratinócitos transduzidos com vetores que expressam as oncoproteínas E6 e E7 de HPV16, não ocorre diferenciação e morte celular, caracterizando assim uma linhagem immortalizada por estas proteínas. Desta forma, o intuito deste experimento foi verificar se a expressão diferencial de SOD2 estaria não apenas associada à presença das oncoproteínas virais, mas também ao processo de immortalização. Sendo assim, essas linhagens transduzidas com os oncogenes virais foram semeadas em placas de 100 mm x 20 mm em meio KSM e meio MEM contendo 10 % de soro fetal bovino (SFB) respectivamente. Quando atingida a confluência de 90%, as proteínas foram extraídas e quantificadas.

Inicialmente, optamos por verificar se os queratinócitos normais (PHK) efetivamente passaram a expressar as oncoproteínas E6 e/ou E7 de HPV16. Para isso, avaliaram-se níveis das oncoproteínas E6 e E7 nos queratinócitos transduzidos por ensaio de *Western Blot* (figura 15).

Figura 15. Análise por *Western Blot* dos níveis das oncoproteínas E6 e E7 provenientes de extratos proteicos obtidos de queratinócitos transduzidos com os oncogenes E6 e/ou E7 de HPV16: PHK Φ , PHKE6, PHKE7, PHKE6E7b (passagem baixa) e PHKE6E7a (passagem alta). Hela (C-): controle negativo experimental.

A figura 15 é um exemplo representativo da confirmação da presença das oncoproteínas E6 e/ou E7 de HPV16. Este resultado indica que as transduções com os vetores retrovirais contendo os oncogenes de HPV de alto risco em queratinócitos foram bem-sucedidas. Diante deste resultado, seguiu-se com a caracterização das linhagens celulares selecionadas para este estudo e a expressão de SOD2.

4.4 Efeito da immortalização e transformação celular na expressão de SOD2

A seguir, foram avaliados os níveis proteicos de SOD2 nos queratinócitos transduzidos com os oncogenes E6 e/ou E7 de HPV16 por *Western Blot*. Os resultados obtidos podem ser observados na figura 16.

De acordo com os resultados acima apresentados, observa-se que as linhagem de queratinócitos que expressam a oncoproteína E7 de HPV16 individualmente (PHKE7) ou em combinação com a oncoproteína E6 (PHKE6E7), apresentam diminuição nos níveis de expressão proteica de SOD2, quando comparadas aos queratinócitos contendo o vetor vazio pLXSN/PHKΦ. Interessantemente, os níveis de SOD2 mostraram níveis mais baixos na linhagem com **alto** número de passagens (após 100 repiques celulares/PHKE7**a**), quando comparados aos queratinócitos com baixo número de passagens (até 10 repiques celulares/PHKE6E7**b**). Estes resultados apontam o efeito da immortalização celular nos níveis da proteína SOD2. Estes resultados mostram que a expressão aguda de E7 de HPV16 afeta os níveis de expressão de SOD2. Isto sugere que estas células podem apresentar um desbalanço no equilíbrio redox logo nas primeiras etapas da infecção viral. Em estudos prévios do grupo (TERMINI *et al.*, 2008), não foram observadas diferenças significativas nos níveis de RNAm de SOD2 entre queratinócitos normais e immortalizados com genoma completo de HPV16 e 18. Importante salientar que nestas linhagens a expressão de E6 e E7 é controlada pelo promotor homólogo do vírus (LCR). No entanto, nos experimentos aqui apresentados (células transduzidas com vetor retroviral), a transcrição dos oncogenes E6 e/ou E7 é controlada por um promotor heterólogo (promotor LTR presente vetor retroviral), que é de expressão constitutiva e mais forte que o promotor homólogo naturalmente encontrado no genoma completo do vírus.

Figura 16. Determinação dos níveis da proteína SOD2 em queratinócitos transduzidos com os oncogenes E6 e E7 de HPV16. A) Análise por *Western Blot* dos níveis de SOD2 em extratos proteicos provenientes de amostras de culturas em monocamada de queratinócitos transduzidos com os oncogenes virais de HPV16 **B)** Quantificação dos níveis da proteína SOD2 foi realizada a partir de duplicata experimental, utilizando-se o *software ImageJ* (NIH) e a análise estatística (teste T de *Student* não pareado- $*p \leq 0,01$). Análises realizadas com as linhagens PHKΦ, PHKE6, PHKE7, PHKE6E7b (passagem baixa) e PHKE6E7a (passagem alta). HeLa (C-): controle negativo experimental. ns: não significante.

Vale a pena ressaltar que em um estudo anterior de nosso grupo, foram identificados diversos genes diferencialmente expressos em queratinócitos normais quando comparados aos imortalizados com HPV16 (linhagens sensíveis ao efeito anti-proliferativo do TNF) ou HPV18 (linhagem resistente), antes e após tratamento com TNF, através da técnica de cDNA-*Microarray*. Dentre os genes diferencialmente expressos identificados, observou-se um aumento do RNAm de SOD2 em queratinócitos normais e imortalizados com HPV16, após tratamento com TNF. O mesmo efeito não foi observado na linhagem imortalizada com HPV18, ou seja, a linhagem resistente ao efeito antiproliferativo mediado pelo TNF (TERMINI *et al.*, 2008). Além

disso, observou-se que o tratamento de linhagens celulares que expressam oncogenes de HPV com TNF induz o aumento de SOD2 (TERMINI *et al.*, 2008). Dados anteriores do grupo indicam que em amostras de lesões e tumores de colo uterino, a expressão de SOD2 aumenta com o grau de lesão, sendo maior em lesões de alto grau que em lesões de baixo grau e tecidos controle (cervicites). Além disso, tanto em amostras de carcinomas escamosos quanto em adenocarcinomas, os níveis de SOD2 detectados são ainda maiores do que nas lesões precursoras, particularmente em adenocarcinomas (TERMINI *et al.*, 2011). Em outro estudo do grupo, foi avaliada a expressão da proteína SOD2 por imunohistoquímica em 125 tumores primários epidermóides clássicos de pênis. A expressão intensa de SOD2 nestes tumores mostrou ser fator preditivo independente para metástase inguinal em análise multivariada, junto aos outros fatores preditivos clássicos de metástase em tumores penianos. Novamente, sugere-se que o aumento da expressão de SOD2 pode estar associado aos casos com pior prognóstico e que poderia contribuir na prática clínica destes tumores (TERMINI *et al.*, 2015). Estes dados estão de acordo com um estudo recentemente publicado, onde altos níveis da proteína SOD2, juntamente ao aumento da expressão das proteínas FABP5 (*fatty acid binding protein 5*) e HspB1 (*heat shock protein beta 1*), foram observados em tumores primários cervicais com estadiamento precoce (estadio I-II) em mulheres que apresentaram metástase inguinal (WANG *et al.*, 2014). Particularmente, neste estudo, não se observou uma associação entre a positividade para HPV e a expressão intensa de SOD2 (TERMINI *et al.*, 2015). Ademais, dados recentes do grupo indicam que o aumento da expressão de SOD2 é fator independente ao tipo de HPV conforme severidade da doença (RABELO-SANTOS *et al.*, 2018). Em conjunto, dados do nosso grupo indicam que a regulação da expressão de SOD2 no contexto de patologias associadas ao HPV é complexa e depende tanto de fatores virais, como de fatores do microambiente celular. Contrariamente às culturas de células utilizadas em nossos ensaios, onde existe apenas um tipo celular em análise, as amostras clínicas representam o tecido de origem composto por diversos tipos celulares, incluindo componentes do infiltrado inflamatório, além de matriz extracelular e citocinas. Este ambiente complexo pode contribuir à regulação positiva de SOD2.

4.5 Os níveis de SOD2 em células que expressam genes de HPV não estão correlacionados aos de p53.

Um dos principais mecanismos de transformação viral mediado pelos HPV de alto risco é a degradação da proteína p53 mediada por E6. Portanto, os níveis de SOD2 foram comparados aos níveis da proteína p53 em nossas linhagens. Estudos na literatura descrevem que a proteína p53 regula uma extensa rede que controla a integridade do genoma frente a danos celulares, tais

como alterações cromossômicas, depleção de metabólitos, choque térmico, hipóxia, ativação de oncogenes celulares e oncoproteínas virais (MENENDEZ *et al.*, 2007; MAXIMOV & MAXIMOV, 2008; FERREIRA & ROCHA, 2010).

Foi demonstrado que a proteína p53 interage fisicamente com SOD2 dentro das mitocôndrias, interferindo em sua atividade enzimática e reduzindo sua capacidade de eliminar moléculas de superóxido, conforme resumido na figura 17 (ZHAO *et al.*, 2005; CANDAS *et al.*, 2014). Este dado faz sentido, uma vez que altos níveis de p53 podem indicar dano celular e, altos níveis de ROS estão associados ao processo de apoptose. A repressão da expressão do gene *SOD2* por *p53* foi sugerida por diversos mecanismos. Dentre eles, está a interferência na iniciação da transcrição (HUSSAIN *et al.*, 2004), a qual bloqueia o acesso de ativadores de genes na região promotora e, consequentemente, gera tanto um complexo inibitório com os mesmos (FARMER *et al.*, 1996), quanto interações proteína-proteína (LI *et al.*, 2010). Entretanto, p53 pode, também, induzir a expressão de SOD2 (DHAR *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2010). Estes efeitos opostos de p53 na expressão de SOD2 são propostos para serem dependentes do tipo celular, espécie e concentração. Na presença de baixas concentrações de p53, aumenta-se a expressão de SOD2, em conjunto com outros fatores de transcrição, tais como o NF- κ B. Quando encontrada em altas concentrações, p53 suprime a expressão de SOD2 (KININGHAM *et al.*, 1997; DRANE *et al.*, 2001).

Deve-se levar em consideração que, embora os mecanismos exatos associados aos altos níveis e/ou ativação de SOD2 não sejam totalmente compreendidos, diversos estudos exploraram o papel da regulação pós-traducional, transcricional e pós-transcricional de SOD2 ao controlar sua atividade de superóxido dismutase na resposta adaptativa contra o estresse oxidativo (CANDAS *et al.*, 2014). Dados publicados por Archambaud *et al* relataram que SOD2 pode ser fosforilada, mas também foi o primeiro trabalho a indicar que a fosforilação de SOD2 controla sua atividade, embora os efeitos biológicos relevantes desta atividade ainda precisam ser esclarecidos (ARCHAMBAUD *et al.*, 2006). Além disso, estudos posteriores previram que SOD2 mitocondrial é alvo de fosforilação. Sendo assim, esses dados iniciais sugeriram que SOD2 é regulada pela fosforilação em uma variedade de espécies (de bactérias a mamíferos) (BYKOVA *et al.*, 2003).

Figura 17. Interação de p53 e SOD2. Interação da proteína p53 com SOD2 na mitocôndria, diminuindo sua atividade enzimática. FONTE: Adaptado de CANDAS, 2014.

Paralelamente, foi também demonstrado que a fosforilação de proteínas antioxidantes está relacionada ao crescimento em células de mamíferos. Descreveu-se que a fosforilação da peroxiredoxina 1 (Prx 1) pela quinase dependente de ciclina 1 (CDK1), por exemplo, resulta na inativação desta espécie antioxidante e afeta progressão do ciclo celular (CHANG *et al.*, 2002). Diante disso, a regulação da Prx 1 com a fosforilação mediada por quinases dependentes de ciclina (CDK) pode contribuir na elucidação da regulação de SOD2 a partir de mecanismos similares (CANDAS *et al.*, 2014).

O conhecimento atual indica que a interação de p53 com SOD2 na mitocôndria inibe a atividade de SOD2 em eliminar as espécies oxidantes e induz a apoptose, ao passo que a fosforilação de p53 mediada por CDK1 na mitocôndria, impede a apoptose, possivelmente

interferindo na interação p53-SOD2. A localização mitocondrial de p53 e ciclina B1/Cdk1 em condições de estresse oxidativo, demonstra que CDK1 pode fosforilar diretamente SOD2 e melhorar sua atividade (CANDAS *et al.*, 2013), sugerindo um mecanismo regulador CDK1-p53-SOD2 na resposta ao estresse oxidativo. A identificação de SOD2 como alvo direto de p53 pode ter grande significância para a biologia do tumor, além de apresentar potencial relevante para aplicações clínicas (CANDAS *et al.*, 2014).

Baseando-se nos dados da literatura, avaliaram-se os níveis da proteína p53 nos queratinócitos normais e transduzidos com os genes E6 e/ou E7 de HPV16, nas linhagens tumorais HPV positivas (SiHa e HeLa) e na linhagem HPV negativa (C33) (figura 17).

Como esperado, na presença da oncoproteína E6, observaram-se baixos níveis da proteína p53, tanto nos queratinócitos transduzidos, como nas linhagens tumorais HPV positivas, contrariamente do observado na linhagem C33, HPV negativa (Figura 18 A e B, respectivamente).

Como citado anteriormente, é descrito na literatura alta expressão de SOD2 quando os níveis de p53 são baixos e, baixos níveis de expressão de SOD2 quando os níveis de p53 são altos. Entretanto, em PHKE6, PHKE6E7b e PHKE6E7a esperava-se que a expressão proteica de SOD2 fosse alta, uma vez que a oncoproteína E6 degrada p53. Mas contrariamente, observou-se uma baixa expressão de SOD2. Além disso, é importante mencionar que a proteína p53 é detectada em baixos níveis em células normais, como é possível observar em queratinócitos normais (PHK). Novamente, foram obtidos níveis de p53 e de SOD2 semelhantes e não antagônicos, como é descrito.

Figura 18. Expressão de p53 e SOD2 nas linhagens celulares. Os níveis da proteína p53 foram determinados por *Western Blot* a partir de: **A)** queratinócitos normais (PHK) e queratinócitos transduzidos (PHKΦ, PHK16E6, PHK16E7, PHKE6E7b PHKE6E7a), **B)** queratinócitos normais (PHK), linhagem tumoral HPV negativa (C33), linhagens tumorais HPV positivas (SiHa e HeLa). HeLa (C-) - controle negativo experimental. Resultado representativo de um experimento.

Por outro lado, células que apresentam mutação em *p53*, apresentam altos níveis da mesma, decorrente da alteração de sua meia vida/degradação, como observado na linhagem C33. Vale a pena ressaltar que nestes experimentos foram avaliados níveis totais da proteína SOD2. Entretanto, de modo geral, o padrão de expressão proteico observado nos modelos celulares utilizados no presente estudo é diferente, quando comparados aos modelos descritos na literatura. Vale a pena mencionar novamente que estes efeitos opostos de *p53* na expressão de SOD2 são propostos para serem dependentes do tipo celular, espécie e concentração. Neste sentido, futuramente será necessário avaliar se existe correlação da expressão e atividade de SOD2 com os níveis de *p53* e ROS em extratos mitocondriais de células que expressam genes de HPV, e também verificar se *p53* pode interagir com SOD2 de maneira indireta, a partir da regulação de outras proteínas.

4.6 Medida da taxa de consumo de oxigênio (Oxygen consumption rate - OCR)

4.6.1 OCR de complexos individuais da cadeia transportadora de elétrons (CTE) em células permeabilizadas

A avaliação do consumo mitocondrial de O_2 na linhagem celular SiHa (linhagem transformada HPV16 positiva) e em queratinócitos expressando os oncogenes E6 e E7 de HPV16 (PHKE6E7b), foi realizada em células permeabilizadas em suspensão, com o intuito de investigar o funcionamento dos complexos da CTE.

Para isso, 4 milhões de células da linhagem SiHa, em meio de reação padrão, foram colocadas no oxígrafo Oroboros a 37°C. A seguir, a adição dos substratos glutamato, α -cetoglutarato, malato e piruvato, que quando oxidados levam à formação de NAHD, permitiu o monitoramento do funcionamento da CTE a partir do fluxo de elétrons via complexo I (NADH desidrogenase).

Para permeabilização da membrana mitocondrial, utilizou-se uma concentração final de 30 μM de digitonina, o que aumentou o consumo de O_2 uma vez que permitiu o aporte dos substratos ao meio intracelular. Depois, a adição de ADP, na concentração de 400 μM , foi realizada para estimular a fosforilação via ATP sintase e promover a respiração celular acoplada. A seguir, com a adição de oligomicina na concentração de 0,5 μM , observou-se um decaimento na taxa de consumo de oxigênio, uma vez que a oligomicina A inibe a ATP sintase, impedindo a passagem de prótons para dentro da mitocôndria. Essa abordagem permite avaliar a taxa respiratória acoplada à fosforilação de ADP. Por último, adicionou-se CCCP, na concentração de 0,25 μM . Este protonóforo permite o transporte de prótons de volta a matriz mitocondrial a favor do gradiente de concentração, dissipando o potencial elétrico intermembranas. O resultado

é o aumento do consumo de O_2 , o que permite medir a capacidade máxima de transporte da CTE. Um perfil típico dessa medida é apresentado na Figura 19A.

Da mesma maneira, o ensaio foi realizado utilizando-se a linhagem PHKE6E7b. Para essa linhagem, foram utilizadas 6,6 milhões de células, 0,5 mM de cada substrato, 20 μ M digitonina, 200 μ M ADP, 1,0 μ M Oligomicina A, 0,25 μ M de CCCP e 1 μ M AA. Assim como observado em SiHa (figura 19 A), foi verificado que ao longo do experimento, as células responderam a adição de oligomicina e ao CCCP (figura 19 B).

Quando se compara as taxas de consumo de O_2 em células SiHa com PHKE6E7b, observa-se que o desacoplamento causado pela adição de CCCP em SiHa foi maior do que o observado em PHKE6E7b. Importante salientar que o desacoplamento da fosforilação oxidativa pode diminuir consideravelmente a liberação de $O_2^{\bullet-}$ (BARTOSZ, 2009). A taxa de consumo de O_2 dependente da fosforilação oxidativa (ou seja, após a adição de ADP) em SiHa foi de 240 nmol/mL, ao passo que em PHKE6E7b apresentou 165 nmol/mL de taxa de respiração de O_2 . Por sua vez, a taxa de consumo de O_2 independente da fosforilação oxidativa (após a adição de oligomicina A) em SiHa foi de 220 nmol/mL e de PHKE6E7b, foi de 155 nmol/mL. Por fim, a respiração desacoplada causada após a adição de CCCP, em SiHa foi de 210 nmol/mL e em PHKE6E7b foi de 152,5 nmol/mL. Em relação à adição de AA em PHKE6E7b, foi verificado o bloqueio do fluxo de elétrons, uma vez que o acréscimo de AA tinha como objetivo, demonstrar a inibição da CTE, mantendo-se apenas consumo de oxigênio independente da mesma.

A figura 19 mostra os resultados obtidos em um único experimento. Devido à grande quantidade de células necessárias para a realização desse ensaio, houve certa dificuldade em se obter o número de células necessárias (principalmente por se tratar de queratinócitos, tanto normais, quanto transduzidos), devido à demanda de padronização do experimento. Com isso, o ensaio do *Seahorse* (medição taxa de respiração celular em células aderidas), foi a alternativa preferida, uma vez que utiliza significativamente menos células por experimento.

Figura 19. OCR suportada por substratos de Complexo I. Definição de parâmetros respiratórios são: Basal: taxa respiratória com substrato endógeno; Dig: após permeabilização com digitonina; Oligo: adição de oligomicina para a inibição da ATPsintase; CCCP: velocidade respiratória máxima após desacoplamento; AA: adição de Antimicina A para o bloqueio do fluxo de elétrons e do consumo de O_2 . **A)** Parâmetros de OCR em SiHa; **B)** Parâmetros de OCR em PHKE6E7.

4.6.2 OCR em células aderidas

Frente às dificuldades em realizar a análise da OCR em células em suspensão, optou-se por realizar o ensaio para avaliar a OCR em células aderidas. O objetivo do experimento é o mesmo,

ou seja, verificar o funcionamento dos complexos da CTE. Para isso, as linhagens tumorais HPV positivas, SiHa e HeLa, foram escolhidas para investigações iniciais.

Para este ensaio, experimentos preliminares foram realizados para determinar o número de células necessário em cada ponto experimental para se obter respostas lineares no aparelho XF24 Extracellular Flux Analyzer (*Seahorse Bioscience*®). Os resultados indicaram que as quantidades de células de 4×10^4 para SiHa e 5×10^4 para HeLa apresentavam respostas lineares. Assim, os experimentos subsequentes foram realizados nas condições indicadas na seção 3.8.2. Na presença de oligomicina, as células são incapazes de sintetizar ATP via fosforilação oxidativa, apresentando uma diminuição na OCR, recorrendo ao processo de glicólise para atender a demanda de ATP, resultando em um aumento em ECAR. Além disso, como o CCCP atua como um agente desacoplador, ocorre a dissipação dos gradientes de prótons, diminuindo a barreira termodinâmica ao transporte de prótons acoplado ao transporte de elétrons. Como consequência, a velocidade de transporte de elétrons pode ir ao seu máximo. Por fim, a ROT e a AA, farão com que o fluxo de elétrons cesse na CTE, diminuindo drasticamente o consumo de O_2 (NICHOLLS *et al.*, 2010).

Os resultados obtidos para OCR e para ECAR em células aderidas são apresentados figura 20. Inicialmente, os valores de respiração de basal de SiHa e HeLa eram 427 pmol O_2 /min (equivalente a aproximadamente 100 % em porcentagem de OCR basal) e 443 pmol O_2 /min respectivamente (equivalente a aproximadamente 120 % em porcentagem de OCR basal). Os dados obtidos (figura 20 A e B) mostram que tanto SiHa, quanto HeLa, realizam respiração acoplada à síntese de ATP (RATP) em níveis semelhantes. Entretanto, SiHa apresenta maior capacidade respiratória máxima (CRR). Isso pode indicar que esta linhagem celular possui maior número de mitocôndrias ou organelas com mais complexos respiratórios, ou seja, poderiam responder melhor às demandas metabólicas.

A linhagem HeLa, por sua vez, apresenta perfil mais glicolítico (figura 20 A e B), uma vez que a produção de lactato, com consequente acidificação do meio, é significativamente maior nas mesmas condições experimentais. Esse efeito é evidenciado após a adição de oligomicina, quando a inibição de ATP sintase aumenta a demanda de síntese de ATP via glicólise.

Quando analisamos as taxas de ECAR (figura 19 C e D), os dados obtidos se correlacionam com o que se observa nos resultados de OCR, uma vez que HeLa apresenta maior taxa de acidificação do meio e menor capacidade respiratória máxima, ao passo que SiHa, apresenta menor taxa de ECAR e maior capacidade respiratória. Embora necessitem de confirmação por outros métodos, esses resultados podem indicar que, em condições de crescimento normal, células SiHa apresentam maior atividade oxidativa enquanto células HeLa apresentam maior atividade glicolítica. Esses resultados podem ter implicações importantes quando da comparação de parâmetros metabólicos entre linhagens celulares diferentes, e devem ser considerados nesse contexto. Além disso é importante levar em consideração os tipos de HPV. A linhagem SiHa é uma célula transformada HPV16 positiva, enquanto HeLa é uma

célula derivada de carcinoma de colo uterino positiva para HPV18. Como já mencionado anteriormente, dados publicados pelo grupo mostram que os transcritos de SOD2 não eram induzidos em queratinócitos imortalizados com HPV18, contrariamente do observado nas células imortalizadas com HPV16 e em queratinócitos normais.

Vale a pena ressaltar também, que o aumento da glicólise aeróbica, também conhecido com Efeito *Warburg*, em muitos tipos de câncer é o resultado combinado de diversos fatores, tais como, ativação de oncogenes e/ou perda de supressores de tumor, um microambiente com baixos níveis de oxigênio, mutações no DNA mitocondrial (mtDNA), entre outros. Ademais, as células tumorais se reprogramam continuamente para se adaptarem às pressões ambientais e às alterações das condições de crescimento. Como consequência dessas mudanças é que o ambiente desfavorável irá oferecer uma vantagem seletiva para as células tumorais (ZHENG, 2012).

Para compreender melhor o papel de SOD2 nos modelos celulares selecionados neste estudo, serão necessárias mais investigações sobre os perfis respiratórios das células e a associação com outras proteínas reguladoras do metabolismo celular.

4.7 Células que expressam E7 de HPV de alto risco oncogênico apresentam diferenças na indução de SOD2 por citocinas pró-inflamatórias.

Em uma segunda etapa deste projeto, avaliou-se a indução da proteína SOD2 por citocinas associadas à resposta inflamatória. A resistência ao efeito citostático mediado por citocinas pró-inflamatórias em células que expressam oncogenes de HPV de alto risco é considerado um evento de fundamental importância para o desenvolvimento de tumores associados a este tipo viral, conforme citado anteriormente.

A indução da expressão da proteína SOD2 por TNF e IL-1 β foi determinada por *Western Blot*. Queratinócitos normais (PHK), queratinócitos transduzidos com os oncogenes virais de HPV16 (PHKE6, PHKE7, PHKE6E7), além de linhagens tumorais HPV positivas (SiHa e HeLa), foram tratados com IL-1 β (1 ng/mL) ou TNF (2 nM) por diferentes períodos. A concentração de citocinas e o tempo de tratamento utilizados foi baseado em estudos anteriores do grupo e em dados da literatura, conforme citado anteriormente. A figura 21 mostra um exemplo representativo dos resultados obtidos.

Após o tratamento com IL-1 β ou com TNF, observaram-se níveis semelhantes de indução de SOD2 em queratinócitos normais (PHK) nos três tempos de tratamento testados (3, 16 e 24 horas), em comparação aos controles (sem tratamento), como pode ser observado na figura 21 A e B. A figura 21 C e D mostra diferenças estatisticamente significativas entre os queratinócitos sem tratamento e os que receberam tratamento com as citocinas pró-inflamatórias por 3h e 16h

respectivamente. Um efeito semelhante foi observado em PHK transduzidos com E6 de HPV16 nos três tempos de tratamento. Novamente, na presença do tratamento com IL-1 β ou TNF, foram constatadas diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle sem tratamento. Por outro lado, em queratinócitos que expressam a oncoproteína E7 individualmente ou em conjunto com E6 (PHKE7 e PHKE6E7b, respectivamente), e nas linhagens SiHa e HeLa, verificou-se a indução dos níveis proteicos de SOD2 apenas após 16 horas de tratamento (Figura 21 A e C). Resultados semelhantes foram observados após tratamento das mesmas linhagens celulares com TNF (figura 21 B e C e D), onde há diferença estatística entre os grupos sem tratamento e com tratamento. Todos os valores de p encontrados na análise estatística realizada estão representados na figura 21 C e D. Os resultados apresentados indicam que a expressão do oncogene E7 de HPV de alto risco oncogênico afeta a cinética da indução de SOD2 em resposta a citocinas pró-inflamatórias.

Figura 21. Expressão dos níveis de SOD2 após tratamento com as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF. Os níveis de SOD2 foram determinados por *Western Blot* a partir de extratos proteicos de culturas das linhagens PHK, PHK pLXSN16 E6, PHK pLXSN16 E7, PHK pLXSN16 E6E7, SiHa e HeLa. Todas as linhagens foram tratadas com IL-1 β e TNF em diferentes tempos (3h, 16h, 24h) **A.** Expressão proteica de SOD2 nas células tratadas com IL-1 β (1 ng/mL). **B.** Expressão proteica de SOD2 nas células tratadas com TNF (2 mM). Para cada tempo de tratamento há uma amostra controle, não tratada com as citocinas.

C-: HeLa - controle negativo experimental. C) Análise estatística *One Way ANOVA* dos resultados obtidos de 2 experimentos independentes com tratamento com as citocinas IL-1 β e TNF por 3h. Diferenças estatísticas entre os grupos sem tratamento e com tratamento de 3h com IL-1 β e TNF. D) Análise estatística *One Way ANOVA* dos resultados obtidos de 2 experimentos independentes com tratamento com as citocinas IL-1 β e TNF por 16h. Diferenças estatísticas entre os grupos sem tratamento e com tratamento de 16h com IL-1 β e TNF.

Figura 21. Expressão dos níveis de SOD2 após tratamento com as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF. Os níveis de SOD2 foram determinados por *Western Blot* a partir de extratos proteicos de culturas das linhagens PHK, PHK pLXSN16 E6, PHK pLXSN16 E7, PHK pLXSN16 E6E7, SiHa e HeLa. Todas as linhagens foram tratadas com IL-1 β e TNF em diferentes tempos (3h, 16h, 24h). A. Expressão proteica de SOD2 nas células tratadas com IL-1 β (1 ng/mL). B. Expressão proteica de SOD2 nas células tratadas com TNF (2 mM). Para cada tempo de tratamento há uma amostra controle, não tratada com as citocinas. C-: HeLa - controle negativo experimental. C) Análise estatística *One Way ANOVA* dos resultados obtidos de 2 experimentos independentes com tratamento com as citocinas IL-1 β e TNF por 3h. Diferenças estatísticas entre os grupos sem tratamento e com tratamento de 3h com IL-1 β e TNF. D) Análise estatística *One Way ANOVA* dos resultados obtidos de 2 experimentos independentes com tratamento com as citocinas IL-1 β e TNF por 16h. Diferenças estatísticas entre os grupos sem tratamento e com tratamento de 16h com IL-1 β e TNF.

Figura 21. Expressão dos níveis de SOD2 após tratamento com as citocinas pró-inflamatórias IL-1β e TNF. Os níveis de SOD2 foram determinados por *Western Blot* a partir de extratos proteicos de culturas das linhagens PHK, PHK pLXSN16 E6, PHK pLXSN16 E7, PHK pLXSN16 E6E7, SiHa e HeLa. Todas as linhagens foram tratadas com IL-1β e TNF em diferentes tempos (3h, 16h, 24h) **A.** Expressão proteica de SOD2 nas células tratadas com IL-1β (1 ng/mL). **B.** Expressão proteica de SOD2 nas células tratadas com TNF (2 mM). Para cada tempo de tratamento há uma amostra controle, não tratada com as citocinas. C-: HeLa - controle negativo experimental. **C)** Análise estatística *One Way ANOVA* dos resultados obtidos de 2 experimentos independentes com tratamento com as citocinas IL-1β e TNF por 3h. Diferenças estatísticas entre os grupos sem tratamento e com tratamento de 3h com IL-1β e TNF. **D)** Análise estatística *One Way ANOVA* dos resultados obtidos de 2 experimentos independentes com tratamento com as citocinas IL-1β e TNF por 16h. Diferenças estatísticas entre os grupos sem tratamento e com tratamento de 16h com IL-1β e TNF.

Figura 21. Expressão dos níveis de SOD2 após tratamento com as citocinas pró-inflamatórias IL-1β e TNF. Os níveis de SOD2 foram determinados por *Western Blot* a partir de extratos proteicos de culturas das linhagens PHK, PHK pLXSN16 E6, PHK pLXSN16 E7, PHK pLXSN16 E6E7, SiHa e HeLa. Todas as linhagens foram tratadas com IL-1β e TNF em diferentes tempos (3h, 16h, 24h) **A.** Expressão proteica de SOD2 nas células tratadas com IL-1β (1 ng/mL). **B.** Expressão proteica de SOD2 nas células tratadas com TNF (2 mM). Para cada tempo de tratamento há uma amostra controle, não tratada com as citocinas. C-: HeLa - controle negativo experimental. **C)** Análise estatística *One Way ANOVA* dos resultados obtidos de 2 experimentos independentes com tratamento com as citocinas IL-1β e TNF por 3h. Diferenças estatísticas entre os grupos sem tratamento e com tratamento de 3h com IL-1β e TNF. **D)** Análise estatística *One Way ANOVA* dos resultados obtidos de 2 experimentos independentes com tratamento com as citocinas IL-1β e TNF por 16h. Diferenças estatísticas entre os grupos sem tratamento e com tratamento de 16h com IL-1β e TNF.

Estudos na literatura mostraram que para E7 ter a capacidade de superar o efeito citostático do TNF em queratinócitos humanos cultivados em cultura de monocamada, necessita da integridade da sequência LxCxE, um domínio proteico envolvido com a transformação celular e necessário para mediar a degradação de pRb (BASILE *et al.*, 2001). Por sua vez, dados publicados pelo nosso grupo mostram que o TNF regula um conjunto distinto de genes em células normais e em células que expressam E7. Além disso, o oncogene E7 em altos níveis pode induzir um estado proliferativo celular que em parte poderia gerar o efeito resistente ao estímulo citostático deflagrado pelo tratamento com TNF (BOCCARDO *et al.*, 2010). Assim como citado na seção 1.3.4, diversos dados mostram que as proteínas E6 e E7 de HPV16 são capazes de induzir resistência ao TNF e outras citocinas relacionadas (FILIPPOVA *et al.*, 2002; 2006; BOCCARDO *et al.*, 2004; 2010). Sugere-se que esta resistência é um evento chave de várias etapas que leva ao câncer cervical (BOCCARDO *et al.*, 2010).

Como citado anteriormente (seção 1.3.4), o resultado da interferência do HPV e suas oncoproteínas, especialmente E6 e E7, na ativação e liberação de IL-1 ainda não está completamente definido. Alguns trabalhos apontam para a redução da secreção de IL-1 β em queratinócitos transduzidos com os oncogenes E6 e E7 (NIEBLES *et al.*, 2013). Em contrapartida, alguns autores demonstraram o aumento na síntese e liberação de IL-1 em células que expressam altos níveis de oncoproteínas E6 e E7 de HPV 16. (TJONG *et al.*, 2001; BEHBAKHT *et al.*, 2002). Dados anteriores de nosso grupo, obtidos por *microarray*, apontam aumento na expressão de determinados genes envolvidos na via da IL-1, dentre eles o transcrito IL-1R2 (receptor *decoy* da via), em células imortalizadas com HPV16 e 18 (TERMINI *et al.*, 2008). O grupo possui estudos em andamento para caracterização desta alteração em queratinócitos que expressam oncoproteínas virais do HPV. É de importância citar novamente, que a aquisição de resistência ao TNF e IL-1 pode ser um evento importante na carcinogênese mediada por HPV. No entanto, os eventos moleculares associados ao efeito diferencial destas citocinas em células infectadas pelo HPV ainda não estão completamente elucidados.

Foi demonstrado por Wong e Goeddel que as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF, são potentes indutores da expressão de SOD2 (WONG & GOEDEL, 1988). Dados publicados por Rogers e colaboradores mostram que, em células endoteliais de artéria pulmonar de ratos, a via de NF- κ B é ativada para induzir a expressão de SOD2 quando há tratamento com IL-1 β , mas o mesmo não ocorre na presença de TNF, onde sugerem que a sinalização ocorra através de uma proteína influenciada por um peróxido lipídico ou outras ROS, ou até mesmo por um peróxido lipídico (ROGERS *et al.*, 2001). É interessante investigar nos modelos celulares selecionados para nosso estudo, tratados com IL-1 β e TNF, quais seriam as

vias de sinalização que participam da ativação da expressão de SOD2, proporcionando-nos melhor compreensão no atraso da indução de SOD2 na presença da oncoproteína E7 de HPV16.

É também importante salientar que elevados níveis de SOD2 geram um aumento na produção de H_2O_2 no estado estacionário, sugerindo que H_2O_2 possa ter uma função protetora contra a apoptose (SUZAKI *et al.*, 2002; TAKADA *et al.*, 2002; BUTTS *et al.*, 2003). Desde então, muitos mecanismos moleculares que controlam a apoptose foram definidos. Estudos neste sentido mostram que SOD2 protege as células do processo apoptótico mediado pelo TNF. Este mecanismo de proteção ocorre, devido ao aumento da produção de H_2O_2 no estado estacionário, que, por sua vez, irá restringir o processo apoptótico. Entretanto, o processo pelo qual a restrição da apoptose acontece ainda não foi definido (DASGUPTA *et al.*, 2006).

Os dados acima descritos contradizem a ideia bem estabelecida de que H_2O_2 é apenas uma molécula pró-apoptótica. Os alvos moleculares exatos que são sensíveis à produção de H_2O_2 dependente de SOD2 ainda precisam ser determinados. Possivelmente, a produção de H_2O_2 localizada no microambiente mitocondrial pode alterar a função de moléculas pró ou antipoptóticas, o que provocará sua inibição ou ativação, respectivamente (DASGUPTA *et al.*, 2006). Além disso, sugere-se que na presença de alta expressão de SOD2 em células com fenótipo maligno aumenta-se a chance de sobrevivência celular em resposta a um estímulo apoptótico (DASGUPTA *et al.*, 2006).

A avaliação da produção de H_2O_2 , bem como esta espécie oxidante atua nas linhagens celulares deste estudo, tratadas com as citocinas TNF e IL-1 β , pode nos indicar por que existe diferença na cinética de indução de SOD2 na presença da oncoproteína E7, independentemente do processo de transformação celular.

5 CONCLUSÕES

- Em queratinócitos normais, queratinócitos transduzidos com os oncogenes E6 e/ou E7 de HPV16 e nas linhagens transformadas HPV positivas SiHa e HeLa, a localização intracelular de SOD2 é predominantemente mitocondrial.
- As linhagens derivadas de tumores da cérvix uterina SiHa (HPV16 positiva) e HeLa (HPV18 positiva) apresentam níveis maiores da proteína SOD2, quando comparadas aos queratinócitos normais e à linhagem tumoral derivada de colo uterino HPV negativa, C33.
- A expressão aguda de E6 de HPV16 em PHK está associada a maiores níveis da proteína SOD2.
- A expressão aguda de E7 de HPV16 em PHK está associada a menores níveis da proteína SOD2.
- A proteína SOD2 apresenta um atraso em sua indução em queratinócitos que expressam a oncoproteína E7 apenas (PHKE7) ou que expressam as oncoproteínas E6 e E7 em conjunto (PHKE6E7), quando tratados com as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF. O mesmo é observado nas linhagens tumorais HPV positivas, SiHa e HeLa. A linhagem transformada HPV16 positiva, SiHa, possui perfil mais oxidativo, ao passo que HeLa (linhagem transformada HPV18 positiva) apresenta perfil mais glicolítico.

6 REFERÊNCIAS

- Abbas A, Lichtman A, Pillai S. Cellular and molecular immunology. Vol. 8^a ed., Elsevier. 2010. 565 p.
- Archambaud C, Nahori MA, Pizarro-Cerda J, Cossart P, Dussurget O. Control of *Listeria* superoxide dismutase by phosphorylation. *J Biol Chem*. 2006; 281: 31812–22.
- Ashrafi GH, Haghshenas M, Marchetti B, Campo MS. E5 protein of human papillomavirus 16 downregulates HLA class I and interacts with the heavy chain via its first hydrophobic domain. *Int J Cancer*. 2006;119(9):2105–12.
- Auron PE. The interleukin 1 receptor: ligand interactions and signal transduction. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 1998;9:221–237.
- Baker AM, Oberley LW, Cohen MB. Expression of antioxidant enzymes in human prostatic adenocarcinoma. *Prostate*. 1997;32(4):229–33.
- Baldwin AS. The NF- κ B and I κ B proteins: New Discoveries and Insights. *Annu Rev Immunol*. 1996;14(1):649–81.
- Bartosz G. Reactive oxygen species: destroyers or messengers? *Biochem Pharmacol*. 2009; 77(8)1303-15.
- 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(25):22522-8.
- Beevi SS, Rasheed MH, Geetha A. Evidence of oxidative and nitrosative stress in patients with cervical squamous cell carcinoma. *Clin Chim Acta*. 2007;375(1–2):119–23.
- Berda-Haddad Y, Robert S, Salers P, Zekraoui L, Farnarier C, Dinarello CA, et al. Sterile inflammation of endothelial cell-derived apoptotic bodies is mediated by interleukin-1. *Proc Natl Acad Sci*. 2011;108(51):20684–9.
- Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, Hausen H zur, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*. 2010;401(1):70–9.
- Boccardo E, Noya F, Broker TR, Chow LT, Villa LL. HPV-18 confers resistance to TNF- α in organotypic cultures of human keratinocytes. *Virology*. 2004;328(2):233–43.
- Boccardo E, Baldi CVM, Carvalho AF, Rabachini T, Torres C, Barreta LA, et al. Expression of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein alters keratinocytes expression profile in response to tumor necrosis factor- α . *Carcinogenesis*. 2010;31(3):521–31.
- Bodily J, Laimins LA. Persistence of human papillomavirus infection: Keys to malignant progression. Vol. 19, *Trends in Microbiology*. 2011. p. 33–9.

- Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87(11):796–802.
- Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJLM, Shah K V. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol.* 2002;55(4):244–65.
- Bosch FX. The path to eliminate cervical cancer in the world and the challenges of professional education. *Vaccine.* 2013;31(S5):11–2.
- Bostwick DG, Alexander EE, Singh R, Shan a, Qian J, Santella RM, et al. Antioxidant enzyme expression and reactive oxygen species damage in prostatic intraepithelial neoplasia and cancer. *Cancer.* 2000;89(1):123–34.
- Bouvard V, Matlashewski G, Gu ZM, Storey A, Banks L. The Human Papillomavirus Type 16 E5 Gene Cooperates with the E7 Gene to Stimulate Proliferation of Primary Cells and Increases Viral Gene Expression. *Virology.* 1994;203(1):73–80.
- Burger D, Molnarfi N, Gruaz L, Dayer J-M. Differential induction of IL-1beta and TNF by CD40 ligand or cellular contact with stimulated T cells depends on the maturation stage of human monocytes. *J Immunol (Baltimore, Md 1950).* 2004;173(2):1292–7.
- Butts BD, Kwei KA, Bowden GT, Briehl MM. Elevated basal reactive oxygen species and phospho-Akt in murine keratinocytes resistant to ultraviolet B-induced apoptosis. *Mol Carcinog.* 2003; 37:149–57.
- Bykova NV, Egsgaard H, Moller IM. Identification of 14 new phosphoproteins involved in important plant mitochondrial processes. *FEBS Lett.* 2003; 540: 141–6.
- Bzhalava D, Eklund C, Dillner J. International standardization and classification of human papillomavirus types. *Virology.* 2015;476:341–4.
- Candas D, Fan M, Nantajit D, Vaughan AT, Murley J, Woloschak G, et al. CyclinB1/Cdk1 phosphorylates mitochondrial antioxidant MnSOD in cell adaptive response to radiation stress. *J Mol Cell Biol.* 2013; 5(3):166-75.
- Candas, D, Li JJ. Mnsod in oxidative stress response-potential regulation via mitochondrial protein influx. *Antioxidants & Redox Signaling.* 2014; 20(10):1599–617.
- Castellsagué X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2008;110.
- Center for Cancer Research, National Cancer Institute (NIH). Identifying molecular culprits of cervical cancer progression, 12/2007. Disponível em https://ccr.cancer.gov/news/inthejournals/Gius_03. Acesso em 05 de dezembro de 2017.
- Chaiwongkot A, Vinokurova S, Pientong C, Ekalaksananan T, Kongyingyoes B, Kleebkaow P, et al. Differential methylation of E2 binding sites in episomal and integrated

HPV 16 genomes in preinvasive and invasive cervical lesions. *Int J Cancer*. 2013;132(9):2087–94.

- Chang TS, Jeong W, Choi SY, Yu S, Kang SW, and Rhee SG. Regulation of peroxiredoxin I activity by Cdc2-mediated phosphorylation. *J Biol Chem*. 2002; 277: 25370–76.
- Chen C, Köberle B, Kaufmann AM, Albers AE. A quest for initiating cells of head and neck cancer and their treatment. Vol. 2, *Cancers*. 2010. p. 1528–54.
- Chow LT, Broker TR. Human papillomavirus infections: Warts or cancer? *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(7).
- Chung DJ, Wright AE, Clerch LB. The 3' untranslated region of manganese superoxide dismutase RNA contains a translational enhancer element. *Biochemistry*. 1998;37(46):16298–306.
- Crosbie EJ, Einstein MH, Franceschi S, Kitchener HC. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. 2013;382(9895):889–99.
- Crump WL, Owen-Schaub LB, Grimm EA. Synergy of human recombinant interleukin 1 with interleukin 2 in the generation of lymphokine-activated killer cells. *Cancer Res*. 1989;49(1):149–53.
- Crusius K, Rodriguez I, Alonso A. The human papillomavirus type 16 E5 protein modulates ERK1/2 and p38 MAP kinase activation by an EGFR-independent process in stressed human keratinocytes. *Virus Genes*. 2000;20:61-5.
- Cumberbatch M, Kimber I. Tumour necrosis factor-alpha is required for accumulation of dendritic cells in draining lymph nodes and for optimal contact sensitization. *Immunology*. 1995; 84(1):31-35.
- Dhar SK, Xu Y, and St Clair DK. Nuclear factor kappaB and specificity protein 1-dependent p53-mediated bidirectional regulation of the human manganese superoxide dismutase gene. *J Biol Chem*. 2010; 285:9835–46.
- Dasgupta J, Subbaram S, Connor KM, Rodriguez AM, Tirosh O, Beckman JS, et al. Manganese superoxide dismutase protects from TNF-alpha-induced apoptosis by increasing the steady-state production of H₂O₂. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8(7–8):1295–305.
- Delhalle S, Deregowski V, Benoit V, Merville M-P, Bours V. NF-kappaB-dependent MnSOD expression protects adenocarcinoma cells from TNF-alpha-induced apoptosis. *Oncogene*. 2002;21(24):3917–24.
- De Silva DGH, Mendis LN, Sheron N, Alexander GJM, Candy DCA, Chart H, et al. TNF α in stool as marker of intestinal inflammation. Vol. 340, *The Lancet*. 1992. p. 372.
- Devasagayam TPA, Tilak J, Bloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India*. 2004;52(October):794–804.

- De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, Zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. Vol. 324, Virology. 2004. p. 17–27.
- Dhar SK, St. Clair DK. Manganese superoxide dismutase regulation and cancer. Vol. 52, Free Radical Biology and Medicine. 2012. p. 2209–22.
- Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. Blood. 1996;87:2095–2147..
- Dinarello CA & Moldawer LL. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. A primer for clinicians. Third edition. Thousand Oaks, CA: Amgen, pp. 21–51, 2002.
- Dinarello CA. Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. Annu Rev Immunol. 2009;27(1):519–50.
- Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. Blood. 2011;117(14):3720–32.
- Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. Clin Sci (Lond). 2006;110(5):525–41.
- Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. Vol. 30, Vaccine. 2012.
- Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. Vol. 25, Reviews in Medical Virology. 2015. p. 2–23.
- Drane P, Bravard A, Bouvard V, and May E. Reciprocal down-regulation of p53 and SOD2 gene expression implication in p53 mediated apoptosis. Oncogene. 2001; 20: 430–9.
- Ekoue DN, He C, Diamond AM1, Bonini MG. Manganese superoxide dismutase and glutathione peroxidase-1 contribute to the rise and fall of mitochondrial reactive oxygen species which drive oncogenesis. Biochim Biophys Acta. 2017; 1858(8):628-632.
- Epperly MW, Gretton JE, Sikora CA, Jefferson M, Bernarding M, Nie S, Greenberger JS. Mitochondrial localization of superoxide dismutase is required for decreasing radiation-induced cellular damage. Radiat Res. 2003; 160(5):568-78.
- Evander M, Edlund K, Gustafsson a, Jonsson M, Karlsson R, Rylander E, et al. Human papillomavirus infection is transient in young women: a population-based cohort study. J Infect Dis. 1995;171(4):1026–30.
- Evans EM, Man S, Evans a S, Borysiewicz LK. Infiltration of cervical cancer tissue with human papillomavirus-specific cytotoxic T-lymphocytes. Cancer Res. 1997;57(14):2943–50.
- Farmer G, Friedlander P, Colgan J, Manley JL, and Prives C. Transcriptional repression by p53 involves molecular interactions distinct from those with the TATA box binding protein. Nucleic Acids Res. 1996; 24: 4281–88.
- Fausch SC, Da Silva DM, Rudolf MP, Kast WM. Human papillomavirus virus-like particles do not activate Langerhans cells: a possible immune escape mechanism used by human

papillomaviruses. *J Immunol.* 2002;169(6):3242–9.

- Figueira TR, Barros MH, Camargo AA, Castilho RF, Ferreira JCB, Kowaltowski AJ, et al. Mitochondria as a Source of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: From Molecular Mechanisms to Human Health. *Antioxid Redox Signal.* 2013;18(16):2029–74.
- Filippova M, Song H, Connolly JL, Dermody TS, Duerksen-Hughes PJ. The human papillomavirus 16 E6 protein binds to tumor necrosis factor (TNF) R1 and protects cells from TNF-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2002;277(24):21730–9.
- Filippova M, Brown-Bryan TA, Casiano CA, Duerksen-Hughes PJ. The human papillomavirus 16 E6 protein can either protect or further sensitize cells to TNF: Effect of dose. *Cell Death Differ.* 2005;12(12):1622–35.
- Fogg VC, Lanning NJ, MacKeigan JP. Mitochondria in cancer: At the crossroads of life and death. Vol. 30, *Chinese Journal of Cancer.* 2011. p. 526–39.
- Franco EL, Villa LL, Richardson H, et al. Epidemiology of cervical human papillomavirus infection. In: Franco EL, Monsonog J, editors. *New developments in cervical cancer and prevention.* London: Blackwell Science, 1997. p. 14-22. (WHO/EUROGIN monograph).
- Franco EL, Rohan TE, Villa LL. Epidemiologic evidence and human papillomavirus infection as a necessary cause of cervical cancer. Vol. 91, *Journal of the National Cancer Institute.* 1999. p. 506–11.
- Franco EL, Duarte-Franco E, Ferenczy A. Cervical cancer: Epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. Vol. 164, *CMAJ.* 2001. p. 1017–25.
- Freedman AS, Freeman G, Whitman J, et al. Pre-exposure of human B cells to recombinant IL-1 enhances subsequent proliferation. *J Immunol.* 1988. 141(10):3398–404.
- Gabay C, Lamacchia C, Palmer G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. Vol. 6, *Nature Reviews Rheumatology.* 2010. p. 232–41.
- Gallagher CJ, Ahn K, Knipe AL, Dyer A-M, Richie JP, Lazarus P, et al. Association between haplotypes of manganese superoxide dismutase (SOD2), smoking, and lung cancer risk. *Free Radic Biol Med [Internet].* 2009;46(1):20–4.
- Groves IJ, Coleman N. Pathogenesis of human papillomavirus-associated mucosal disease. *J Pathol.* 2015;235(4):527–38.
- Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? Vol. 142, *British Journal of Pharmacology.* 2004. p. 231–55.
- Hawthorn RJ, Murdoch JB, MacLean a B, MacKie RM. Langerhans' cells and subtypes of human papillomavirus in cervical intraepithelial neoplasia. *BMJ.* 1988;297(6649):643.
- Herrero A, Barja G. Localization of the site of oxygen radical generation inside the complex I of heart and nonsynaptic brain mammalian mitochondria. *J Bioenerg Biomembr.*

2000;32(6):609–15.

- Herrero R, Hildesheim A, Bratti C, Sherman ME, Hutchinson M, Morales J, et al. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(6):464–74.
- Hildesheim A, Schiffman MH, Gravitt PE, Glass AG, Greer CE, Zhang T, et al. Persistence of type-specific human papillomavirus infection among cytologically normal women. *J Infect Dis.* 1994;169(2):235–40.
- Ho GY, Burk RD, Klein S, Kadish a S, Chang CJ, Palan P, et al. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst.* 1995;87(18):1365–71.
- Hoffmann A, Natoli G, Ghosh G. Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. *Oncogene.* 2006;25(51):6706–16.
- Hoffman HM, Brydges SD. Genetic and molecular basis of inflammasome-mediated disease. Vol. 286, *Journal of Biological Chemistry.* 2011. p. 10889–96.
- Holley AK, Dhar SK, Xu Y, St. Clair DK. Manganese superoxide dismutase: beyond life and death. *Amino Acids.* 2012;42(1):139–58.
- Houldsworth A. A Review of the Role of Mitochondrial Manganese Superoxide Dismutase in Human Disorders, such as Diabetes. 2016. *J Endocrinol Diab,* 3(3):1-5.
- Huang Y, Peng J, Oberley LW, Domann FE. Transcriptional inhibition of manganese superoxide dismutase (SOD2) gene expression by DNA methylation of the 5' CpG island. *Free Radic Biol Med.* 1997;23(2):314–20.
- Huang Y, He T, Domann FE. Decreased expression of manganese superoxide dismutase in transformed cells is associated with increased cytosine methylation of the SOD2 gene. *DNA Cell Biol.* 1999;18(8):643–52.
- Hussain SP, Amstad P, He P, Robles A, Lupold S, Kaneko I, et al. p53-induced up-regulation of MnSOD and GPx but not catalase increases oxidative stress and apoptosis. *Cancer Res.* 2004; 64: 2350–56.
- IARC Working Group. Human papillomaviruses. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum,* vol. 90, 2007.
- ©ICO INFORMATION CENTRE ON HPV AND CANCER (HPV INFORMATION CENTER). Brazil human papillomavirus and related diseases report, 2017. Disponível em <http://www.hpvcentre.net/statistics/reports/BRA.pdf>. Acesso em 01 de dezembro de 2017.
- Iglesias M, Yen K, Gaiotti D, Hildesheim A, Stoler MH, Woodworth CD. Human papillomavirus type 16 E7 protein sensitizes cervical keratinocytes to apoptosis and release of interleukin-1alpha. *Oncogene.* 1998;17(10):1195–205.

- Jiang B, Xiao S, Khan MA, Xue M. Defective antioxidant systems in cervical cancer. *Tumor Biol.* 2013;34(4):2003–9.
-
- Johansson C, Schwartz S. Regulation of human papillomavirus gene expression by splicing and polyadenylation. Vol. 11, *Nature Reviews Microbiology*. 2013. p. 239–51.
- Jones NC, Rigby PW, Ziff EB. Trans-acting protein factors and the regulation of eukaryotic transcription: lessons from studies on DNA tumor viruses. Vol. 2, *Genes & development*. 1988. p. 267–81.
- Kaina B. DNA damage-triggered apoptosis: Critical role of DNA repair, double-strand breaks, cell proliferation and signaling. In: *Biochemical Pharmacology*. 2003. p. 1547–54.
- Kamranvar SA, Masucci MG. The Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 promotes telomere dysfunction via induction of oxidative stress. *Leukemia*. 2011;25(6):1017–25.
- Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation Meets Ubiquitination: The Control of NF- κ B Activity. *Annu Rev Immunol*. 2000;18(1):621–63.
- Karnati S, Lüers G, Pfreimer S, Baumgart-Vogt E. Mammalian SOD2 is exclusively located in mitochondria and not present in peroxisomes. *Histochem Cell Biol*. 2013; 140:105–117.
- Kim YB, Kim GE, Pyo HR, Cho NH, Keum KC, Lee CG, et al. Differential cyclooxygenase-2 expression in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the uterine cervix. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004;60(3):822–9.
- Kines RC, Thompson CD, Lowy DR, Schiller JT, Day PM. The initial steps leading to papillomavirus infection occur on the basement membrane prior to cell surface binding. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;106(48):20458–63.
- Kiningham KK and St Clair DK. Overexpression of manganese superoxide dismutase selectively modulates the activity of Jun-associated transcription factors in fibrosarcoma cells. *Cancer Res*. 1997; 57: 5265–71.
- Kiningham KK, Xu Y, Daosukho C, Popova B, St Clair DK. Nuclear factor kappaB-dependent mechanisms coordinate the synergistic effect of PMA and cytokines on the induction of superoxide dismutase 2. *Biochem J*. 2001;353(Pt 1):147–56.
- Kinnula VL, Crapo JD. Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. Vol. 36, *Free Radical Biology and Medicine*. 2004. p. 718–44.
- Kiviat NB, Critchlow CW, Holmes KK, Kuypers J, Sayer J, Dunphy C, et al. Association of anal dysplasia and human papillomavirus with immunosuppression and HIV infection among homosexual men. *AIDS*. 1993;7(1):43–9.
- Knirsch L, Clerch LB. Tyrosine phosphorylation regulates manganese superoxide dismutase (MnSOD) RNA-binding protein activity and MnSOD protein expression. *Biochemistry*. 2001;40(26):7890–5.

- Kondo S, Sauder DN, Kono T, Galley K a, McKenzie RC. Differential modulation of interleukin-1 alpha (IL-1 alpha) and interleukin-1 beta (IL-1 beta) in human epidermal keratinocytes by UVB. *Exp Dermatol*. 1994;3(1):29–39.
- Konishi N, Miki C, Yoshida T, Tanaka K, Toiyama Y, Kusunoki M. Interleukin-1 receptor antagonist inhibits the expression of vascular endothelial growth factor in colorectal carcinoma. *Oncology*. 2005; 68:138-45.
- Kono H, Onda A, Yanagida T. Molecular determinants of sterile inflammation. Vol. 26, *Current Opinion in Immunology*. 2014. p. 147–56.
- Koutsky LA, Holmes KK, Critchlow CW, Stevens CE, Paavonen J, Beckmann AM, et al. A cohort study of the risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 in relation to papillomavirus infection. *N Engl J Med*. 1992;327(18):1272–8.
- Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*. 2009; 47(4); 333-43.
- Kussmaul L, Hirst J. The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* . 2006;103(20):7607–12.
- Kyo S, Inoue M, Hayasaka N, Inoue T, Yutsudo M, Tanizawa O, et al. Regulation of early gene expression of human papillomavirus type 16 by inflammatory cytokines. *Virology*. 1994;200(1):130–9.
- Leach JK, Van Tuyle G, Lin PS, Schmidt-Ullrich R, Mikkelsen RB. Ionizing radiation-induced, mitochondria-dependent generation of reactive oxygen/nitrogen. 2001; 61(10):3894-901.
- Leong CM, Doorbar J, Nindl I, Yoon HS, Hibma MH. Deregulation of E-cadherin by human papillomavirus is not confined to high-risk, cancer-causing types. *Br J Dermatol*. 2010;163(6):1253–63.
- Levitsky V, Masucci MG. Manipulation of immune responses by Epstein-Barr virus. Vol. 88, *Virus Research*. 2002. p. 71–86.
- Li JJ, Oberley LW. Overexpression of manganese-containing superoxide dismutase confers resistance to the cytotoxicity of tumor necrosis factor α and/or hyperthermia. *Cancer Res*. 1997;57(10):1991–8.
- Li XH, Murphy KM, Palka KT, Surabhi RM, Gaynor RB. The human T-cell leukemia virus type-1 Tax protein regulates the activity of the IkappaB kinase complex. *J Biol Chem*. 1999;274(48):34417–24.
- Li Z, Shi K, Guan L, Cao T, Jiang Q, Yang Y, and Xu C. ROS leads to MnSOD upregulation through ERK2 translocation and p53 activation in selenite-induced apoptosis of NB4 cells. *FEBS Lett*. 2010; 584:2291–97.

- Longworth MS, Laimins LA. The Binding of Histone Deacetylases and the Integrity of Zinc Finger-Like Motifs of the E7 Protein Are Essential for the Life Cycle of Human Papillomavirus Type 31. *J Virol*. 2004;78(7):3533–41.
- Lorincz AT, Reid R, Jenson AB, Greenberg MD, Lancaster W, Kurman RJ. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol*. 1992;79(3):328–37.
- Manna SK, Zhang HJ, Yan T, Oberley LW, Aggarwal BB. Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses tumor necrosis factor-induced apoptosis and activation of nuclear transcription factor-kappaB and activated protein-1. *J Biol Chem*. 1998;273(21):13245–54.
- Mantovani A, Muzio M, Ghezzi P, Colotta C, Introna M. Regulation of inhibitory pathways of the interleukin-1 system. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1998; 840:338–351.
- Martin MU & Falk W. The interleukin-1 receptor complex and interleukin-1 signal transduction. *European Cytokine Network*. 1997; 8:5–17.
- Martin a G, San-Antonio B, Fresno M. Regulation of nuclear factor kappa B transactivation. Implication of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase C zeta in c-Rel activation by tumor necrosis factor alpha. *J Biol Chem*. 2001;276(19):15840–9.
- Marullo R, Werner E, Zhang H, Chen GZ, Shin DM, Doetsch PW. HPV16 E6 and E7 proteins induce a chronic oxidative stress response via NOX2 that causes genomic instability and increased susceptibility to DNA damage in head and neck cancer cells. *Carcinogenesis*. 2015;36(11):1397–406.
- Matthews K, Leong CM, Baxter L, Inglis E, Yun K, Bäckström BT, et al. Depletion of Langerhans cells in human papillomavirus type 16-infected skin is associated with E6-mediated down regulation of E-cadherin. *J Virol*. 2003;77(15):8378–85.
- McBride AA. Chapter 4 Replication and Partitioning of Papillomavirus Genomes. Vol. 72, *Advances in Virus Research*. 2008. p. 155–205.
- McCarthy DA, Ranganathan A, Subbaram S, Flaherty NL, Patel N, Trebak M, et al. Redox-control of the alarmin, Interleukin-1 α . *Redox Biol*. 2013;1(1):218–25.
- McLaughlin ME, Münger K. Oncogenic activities of human papillomaviruses. *Virus Research*. 2009; 143:195-208.
- McMurray HR, Nguyen D, Westbrook TF, McAnce DJ. Biology of human papillomaviruses. *Int J Exp Pathol*. 2001;82(1):15–33.
- Melief CJM, Van der Burg SH, Toes REM, Ossendorp F, Offringa R. Effective therapeutic anticancer vaccines based on precision guiding of cytolytic T lymphocytes. *Immunol Rev*. 2002;188:177–82.

- Mesri EA, Feitelson MA, Munger K. Human viral oncogenesis: A cancer hallmarks analysis. Vol. 15, Cell Host and Microbe. 2014. p. 266–82.
- Miao L, St. Clair DK. Regulation of superoxide dismutase genes: Implications in disease. Vol. 47, Free Radical Biology and Medicine. 2009. p. 344–56.
- Mirabello L, Clarke M, Nelson C, Dean M, Wentzensen N, Yeager M, et al. The Intersection of HPV Epidemiology, Genomics and Mechanistic Studies of HPV-Mediated Carcinogenesis. Viruses. 2018;10(2):80.
- Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: Pathways to transformation. Vol. 10, Nature Reviews Cancer. 2010. p. 550–60.
- Muller FL, Liu Y, Van Remmen H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. J Biol Chem. 2004;279(47):49064–73.
- Münger K, Pietenpol J a, Pittelkow MR, Holt JT, Moses HL. Transforming growth factor beta 1 regulation of c-myc expression, pRB phosphorylation, and cell cycle progression in keratinocytes. Cell Growth Differ. 1992;3(5):291–8.
- Munger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, et al. Mechanisms of Human Papillomavirus-Induced Oncogenesis. J Virol. 2004;78(21):11451–60.
- Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. Biochem J. 2009;417(1):1–13.
- Nakagawa M, Stites DP, Patel S, Farhat S, Scott M, Hills NK, et al. Persistence of human papillomavirus type 16 infection is associated with lack of cytotoxic T lymphocyte response to the E6 antigens. J Infect Dis. 2000;182(2):595–8.
- Ni Z, Okeley NM, Smart BP, Gelb MH. Intracellular actions of group IIA secreted phospholipase A2 and group IVA cytosolic phospholipase A2 contribute to arachidonic acid release and prostaglandin production in rat gastric mucosal cells and transfected human embryonic kidney cells. J Biol Chem. 2006;281(24):16245–55.
- Nicholls DG, Darley-Usmar VM, Wu M, Jensen PB, Rogers GW, Ferrick DA. Bioenergetic Profile Experiment using C2C12 Myoblast Cells. J Vis Exp. 2010; (46). pii: 2511.
- Nickoloff BJ, Turka LA. Keratinocytes: key immunocytes of the integument. Am J Pathol. 1993;143(2):325-331.
- Nicolaides L, Davy C, Raj K, Kranjec C, Banks L, Doorbar J. Stabilization of HPV16 E6 protein by PDZ proteins, and potential implications for genome maintenance. Virology. 2011;414(2):137–45.
- Niebles M, Qian X, Höfler D, Kogosov V, Kaewprag J, Kaufmann AM, et al. Post-Translational Control of IL-1 β via the Human Papillomavirus Type 16 E6 Oncoprotein: A

Novel Mechanism of Innate Immune Escape Mediated by the E3-Ubiquitin Ligase E6-AP and p53. *PLoS Pathog.* 2013;9(8).

- Nobbenhuis MAE, Walboomers JMM, Helmerhorst TJM, Rozendaal L, Remmink AJ, Risse EKJ, et al. Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening: A prospective study. *Lancet.* 1999;354(9172):20–5.
- Onozaki K, Matsushima K, Aggarwal BB, Oppenheim JJ. Human interleukin 1 is a cytotoxic factor for several tumor cell lines. *J Immunol.* 1985;135(6):3962–8.
- Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene.* 1999;18(49):6853–66.
- Palomo J, Dietrich D, Martin P, Palmer G, Gabay C. The interleukin (IL)-1 cytokine family - Balance between agonists and antagonists in inflammatory diseases. Vol. 76, *Cytokine.* 2015. p. 25–37.
- Papillomavirus Episteme (PaVE): the papillomavirus knowledge source. Disponível em: <https://pave.niaid.nih.gov/>. Acesso em: 23/03/18.
- Parameswaran N, Patial S. Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2010;20(2):87–103.
- Peitsaro P, Johansson B, Syrjänen S. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *J Clin Microbiol.* 2002;40(3):886–91.
- Perez-Plasencia C, Duenas-Gonzalez A, Alatorre-Tavera B. Second hit in cervical carcinogenesis process: involvement of wnt/beta catenin pathway. *Int Arch Med.* 2008;1(1):10.
- Pett MR, Alazawi WOF, Roberts I, Dowen S, Smith DI, Stanley MA, et al. Acquisition of High-Level Chromosomal Instability Is Associated with Integration of Human Papillomavirus Type 16 in Cervical Keratinocytes. *Cancer Res.* 2004;64(4):1359–68.
- Philip R, Epstein LB. Tumour necrosis factor as immunomodulator and mediator of monocyte cytotoxicity induced by itself, gamma-interferon and interleukin-1. *Nature.* 1986;323(6083):86–9.
- Piantá CD. A influência do polimorfismo do superóxido dismutase dependente de manganês 2 na morbi-mortalidade pós-operatória de pacientes submetidos a cirurgias oncológicas. 2005. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
- Portier M, Zhang XG, Ursule E, Lees D, Jourdan M, Bataille R, Klein B. Cytokine gene expression in human multiple myeloma. *Br J Haematol.* 1993; 85:514-20.

- Rabelo-Santos SH, Termini L, Boccardo E, Derchain S, Longatto-Filho A, Andreoli MA, Costa MC, Lima Nunes RA, Lucci Ângelo-Andrade LA, Villa LL, Zeferino LC. Strong SOD2 expression and HPV-16/18 positivity are independent events in cervical cancer. *Oncotarget*. 2018; 9: 21630-21640.
- Rider P, Carmi Y, Guttman O, Braiman A, Cohen I, Voronov E, et al. IL-1 and IL-1 Recruit Different Myeloid Cells and Promote Different Stages of Sterile Inflammation. *J Immunol*. 2011;187(9):4835–43.
- Rogers RJ, Monnier JM, Nick HS. Tumor necrosis factor-alpha selectively induces MnSOD expression via mitochondria-to-nucleus signaling, whereas interleukin-1beta utilizes an alternative pathway. *J Biol Chem*. 2001;276:20419-27.
- Rozendaal L, Walboomers JMM, Van Der Linden JC, Voorhorst FJ, Kenemans P, Helmerhorst TJM, et al. PCR-based high-risk HPV test in cervical cancer screening gives objective risk assessment of women with cytomorphologically normal cervical smears. *Int J Cancer*. 1996;68(6):766–9.
- 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.
- Schiffman MH, Burk RD, Evans A, Kaslow R. Human papillomaviruses, viral infections of humans, epidemiology and control, Part III. Viral infections and malignant diseases. New York Plenum. 1997; 983-1023.
- Schlesinger PH, Gross A, Yin XM, Yamamoto K, Saito M, Waksman G, et al. Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94(21):11357-62.
- Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J*. 1991;10(8):2247–58.
- Simi A, Tsakiri N, Wang P, Rothwell NJ. Interleukin-1 and inflammatory neurodegeneration. *Biochem Soc Trans*. 2007; 35: 1122-1126.
- Singh AK, Dobashi K, Gupta MP, Asayama K, Singh I, Orak JK. Manganese superoxide dismutase in rat liver peroxisomes: biochemical and immunochemical evidence. *Mol Cell Biochem*. 1999; 197:7–12.
- Shen H, Kreisel D, Goldstein DR. Processes of Sterile Inflammation. *J Immunol*. 2013;191(6):2857–63.
- Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *Jama*.

2002;287(16):2114–9.

- Stanley M. Immune responses to human papillomavirus. Vol. 24, Vaccine. 2006.
- Stanley M. Immunobiology of HPV and HPV vaccines. Gynecol Oncol. 2008;109(2 SUPPL.).
- Stanley M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. Vol. 117, Gynecologic Oncology. 2010.
- Stanley MA. Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. Vol. 25, Clinical Microbiology Reviews. 2012. p. 215–22.
- Stenlund A. Initiation of DNA replication: Lessons from viral initiator proteins. Vol. 4, Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2003. p. 777–85.
- Stylianou E & Saklatvala J. Interleukin-1. International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 1998; 30:1075–1079.
- Sugino N, Karube-Harada A, Sakata A, Takiguchi S, Kato H. Nuclear factor-kappa B is required for tumor necrosis factor-alpha-induced manganese superoxide dismutase expression in human endometrial stromal cells. J Clin Endocrinol Metab. 2002;87(8):3845–50.
- Surviladze Z, Dziduszko A, Ozbun MA. Essential roles for soluble virion-associated heparan sulfonated proteoglycans and growth factors in human papillomavirus infections. PLoS Pathog. 2012;8(2).
- Suzaki Y, Yoshizumi M, Kagami S, Koyama AH, Taketani Y, Houchi H, Tsuchiya K, Takeda E, and Tamaki T. Hydrogen peroxide stimulates c-Src-mediated big mitogenactivated protein kinase 1 (BMK1) and the MEF2C signaling pathway in PC12 cells: potential role in cell survival following oxidative insults. J Biol Chem. 2002; 277: 9614–21.
- Szatmáry Z. Tumor necrosis factor-alpha: molecular-biological aspects minireview. Neoplasma. 1999;46(5):257–66.
- Takada Y, Hachiya M, Park SH, Osawa Y, Ozawa T, Akashi M. Role of reactive oxygen species in cells overexpressing manganese superoxide dismutase: mechanism for induction of radioresistance. Mol Cancer Res. 2002; 1:137–46.
- Taylor GM, Raghuwanshi SK, Rowe DT, Wadowsky RM, Rosendorff A. Endoplasmic reticulum stress causes EBV lytic replication. Blood. 2011;118(20):5528–39.
- Termini L, Boccardo E, Esteves GH, Hirata R, Martins WK, Colo AEL, et al. Characterization of global transcription profile of normal and HPV-immortalized keratinocytes and their response to TNF treatment. BMC Med Genomics. 2008;1(1):29.
- Termini L, Filho AL, MacIag PC, Etlinger D, Alves VAF, Nonogaki S, et al. Deregulated expression of superoxide dismutase-2 correlates with different stages of cervical neoplasia.

Dis Markers. 2011;30(6):275–81.

- Termini L, Fregnani JH, Boccardo E, Da Costa WH, Longatto-Filho A, Andreoli MA, et al. SOD2 immunoexpression predicts lymph node metastasis in penile cancer. *BMC Clin Pathol*. 2015;15(1).
- Tindle RW. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(1):59–64.
- Thomas M, Narayan N, Pim D, Tomaic V, Massimi P, Nagasaka K, et al. Human papillomaviruses, cervical cancer and cell polarity. *Oncogene*. 2008;27(55):7018–30.
- Tjiong MY, Van Der Vange N, Ter Schegget JS, Burger MPM, Ten Kate FWJ, Out TA. Cytokines in cervicovaginal washing fluid from patients with cervical neoplasia. *Cytokine*. 2001;14(6):357–60.
- Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature*. 2002; 420 (6917):853-859.
- Tsakogiannis D, Gartzonika C, Levidiotou-Stefanou S, Markoulatos P. Molecular approaches for HPV genotyping and HPV-DNA physical status. Vol. 19, *Expert Reviews in Molecular Medicine*. 2017.
- Tsai WL, Chung RT. Viral hepatocarcinogenesis. Vol. 29, *Oncogene*. 2010. p. 2309–24.
- Uhlik M, Good L, Xiao G, Harhaj EW, Zandi E, Karin M, et al. NF-kappaB-inducing kinase and IkappaB kinase participate in human T- cell leukemia virus I Tax-mediated NF-kappaB activation. *JBiolChem*. 1998;273(33):21132–6.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(39):44–84.
- Van Seters M, Beckmann I, Heijmans-Antonissen C, Van Beurden M, Ewing PC, Zijlstra FJ, et al. Disturbed patterns of immunocompetent cells in usual-type vulvar intraepithelial neoplasia. *Cancer Res*. 2008;68(16):6617–22.
- Vander Heiden MG, Chandel NS, Williamson EK, Schumacker PT, Thompson CB. Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. 1997; 91(5):627-37.
- Vesey D a, Cheung C, Cuttle L, Endre Z, Gobe G, Johnson DW. Interleukin-1beta stimulates human renal fibroblast proliferation and matrix protein production by means of a transforming growth factor-beta-dependent mechanism. *J Lab Clin Med*. 2002;140(5):342–50.
- Vieira KB, Goldstein DJ, Villa LL. Tumor necrosis factor alpha interferes with the cell cycle of normal and papillomavirus-immortalized human keratinocytes . *Cancer Res* . 1996;56(10):2452–7.
- Vinokurova S, Wentzensen N, Kraus I, Klaes R, Driesch C, Melsheimer P, et al. Type-

dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. *Cancer Res.* 2008;68(1):307–13.

- Visalli G, Riso R, Facciola A, Mondello P, Caruso C, Picerno I, et al. Higher levels of oxidative DNA damage in cervical cells are correlated with the grade of dysplasia and HPV infection. *J Med Virol.* 2016;88(2):336–44.
- Villa LL, Schlegel R. Differences in transformation activity between HPV-18 and HPV-16 map to the viral LCR-E6-E7 region. *Virology.* 1991;181(1):374–7.
- 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(1):5–9.
- Vinothkumar KR, Zhu J, Hirst J. Architecture of mammalian respiratory complex I. *Nature.* 2014;515(7525):80–4.
- Voronov E, Shouval DS, Krelm Y, Cagnano E, Benharroch D, Iwakura Y, Dinarello CA, Apte RN. IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100:2645-50.
- Xiao G, Harhaj EW, Sun SC. Domain-specific interaction with the I κ B kinase (IKK) regulatory subunit IKK γ is an essential step in tax-mediated activation of IKK. *J Biol Chem.* 2000;275(44):34060–7.
- Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, et al. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest.* 1998; 101(2):311–20.
- Xu Y, Fang F, Dhar SK, Bosch A, St. Clair WH, Kasarskis EJ, et al. Mutations in the SOD2 Promoter Reveal a Molecular Basis for an Activating Protein 2-Dependent Dysregulation of Manganese Superoxide Dismutase Expression in Cancer Cells. *Mol Cancer Res.* 2008;6(12):1881–93.
- Yankovskaya V, Horsefield R, Törnroth S, Luna-Chavez C, Miyoshi H, Léger C, et al. Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science* (80-). 2003;299(5607):700–4.
- Yoneda M, Katsumata K, Hayakawa M, Tanaka M, Ozawa T. Oxygen stress induces an apoptotic cell death associated with fragmentation of mitochondrial genome. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; 209(2):723-9.
- Yerramothu P, Vijay AK, Willcox MDP. Inflammasomes, the eye and anti-inflammasome therapy. *Eye (Lond).* 2017;241: Epub ahead of print.
- Ylitalo N, Josefsson a, Melbye M, Sörensen P, Frisch M, Andersen PK, et al. A prospective study showing long-term infection with human papillomavirus 16 before the development

of cervical carcinoma in situ. *Cancer Res.* 2000;60(21):6027–32.

- Young IS, Woodside J V. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol.* 2001;54:176–86.
- Yu T, Ferber MJ, Cheung TH, Chung TKH, Wong YF, Smith DL. The role of viral integration in the development of cervical cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 2005;158(1):27–34.
- Wajant H, Scheurich P. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2 and its role in TNF signaling. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001;33(1):19–32.
- **Walboomers JM, Meijer CJ. Do HPV-negative cervical carcinomas exist? *J Pathol.* 1997;181(3):253-254.**
- Walboomers JMM, Jacobs M V., Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah K V., et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999;189(1):12–9.
- Wallace NA, Galloway DA. Novel Functions of the Human Papillomavirus E6 Oncoproteins. *Annu Rev Virol.* 2015;2(1):403–23.
- Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev Y V, Kovalenko a V, Boldin MP. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol.* 1999;17:331–67.
- Wang X, Helfer CM, Pancholi N, Bradner JE, You J. Recruitment of Brd4 to the human papillomavirus type 16 DNA replication complex is essential for replication of viral DNA. *J Virol.* 2013;87(7):3871–84.
- Wang W, Jia H-L, Huang J-M, Liang Y-C, Tan H, Geng H-Z, et al. Identification of biomarkers for lymph node metastasis in early-stage cervical cancer by tissue-based proteomics. *Br J Cancer* 2014;110(7):1748–58.
- Warowicka A, Kwasniewska A, Gozdzicka-Jozefiak A. Alterations in mtDNA: A qualitative and quantitative study associated with cervical cancer development. *Gynecol Oncol.* 2013;129(1):193–8.
- Weisiger RA, Fridovich I. Mitochondrial superoxide dismutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem.* 1973; 248:4793–96.
- Wieland SF, Chisari F V. Stealth and Cunning: Hepatitis B and Hepatitis C Viruses. *J Virol.* 2005;79(15):9369–80.
- Willcox JK, Ash SL, Catignani GL. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2004;44(4):275–95.
- Williams VM, Filippova M, Soto U, Duerksen-Hughes PJ. HPV-DNA integration and carcinogenesis: putative roles for inflammation and oxidative stress. *Future Virol.* 2011;6(1):45–57.

- Williams VM, Filippova M, Filippov V, Payne KJ, Duerksen-Hughes P. Human papillomavirus type 16 E6* induces oxidative stress and DNA damage. *J Virol*. 2014;88(12):6751–61.
- Wong GH, Goeddel DV. Induction of manganous superoxide dismutase by tumor necrosis factor: possible protective mechanism. *Science*. 1988; 242(4880):941-4.
- World Health Organization. Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer. Fact sheet N°380, September 2013. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/>. Acesso em 02 de janeiro de 2018.
- Woodman CBJ, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: Unresolved issues. Vol. 7, *Nature Reviews Cancer*. 2007. p. 11–22.
- Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. Vol. 33, *Free Radical Biology and Medicine*. 2002. p. 337–49.
- Zhang B, Li P, Wang E, Brahmi Z, Dunn KW, Blum JS, et al. The E5 protein of human papillomavirus type 16 perturbs MHC class II antigen maturation in human foreskin keratinocytes treated with interferon- γ . *Virology*. 2003;310(1):100–8.
- Zhou J, Frazer IH. Papovaviridae: capsid structure and capsid protein function. In: Lacey C, editor. *Papillomavirus: current research on papillomavirus*. London Leeds University Press. 1996;10:93-100.
- Zhu CH, Huang Y, Oberley LW, Domann FE. A Family of AP-2 Proteins Down-regulate Manganese Superoxide Dismutase Expression. *J Biol Chem*. 2001;276(17):14407–13.
- Zinkernagel RM, Ehl S, Aichele P, Oehen S, Kündig T, Hengartner H. Antigen localisation regulates immune responses in a dose- and time-dependent fashion: a geographical view of immune reactivity. *Immunol Rev*. 1997;156:199–209.
- zur Hausen H. Papillomavirus infections — a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. 1996;1288(2):F55–78.
- zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(5):342–50.

7 ANEXOS**ANEXO A**

Súmula Curricular – Gabriela Ávila Fernandes Silva

Informações Pessoais

Nome: Gabriela Ávila Fernandes Silva
Nascimento: 08 de Dezembro de 1988
São Paulo – SP, Brasil
Telefone: 11 2662-7554 / 11 2661/8097
E-mail: gabi-avila@hotmail.com
Endereço Currículo Lattes: http://lattes.cnpq.br/0600311205997366

Formação Acadêmica

2015- Mestrado

Departamento de Radiologia e Oncologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) - USP, São Paulo, Brasil.

“Estudo do papel da proteína Superóxido Dismutase 2 (SOD2) no processo de transformação celular mediado por HPV.” – Projeto FAPESP, processo: #2015/26327-1

Início: Dezembro de 2015 – Conclusão: Maio de 2018.

2012-2014-Iniciação científica em Bioquímica

Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQUSP), São Paulo, Brasil – Departamento de Bioquímica – Laboratório de Sinalização Celular

“Identificação de novas interações proteína-proteína da PKC β I.” – Projeto FAPESP, processo: #2012/17279-5

2011-2014- Graduação. Química – Bacharel em Química

Faculdades Oswaldo Cruz (FOC) – São Paulo, SP, Brasil.

“Identificação de novas interações proteína-proteína da PKC β I”

Concluído em 2014.

Formação Complementar

2015 – Curso Básico de Radioproteção – Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP)

2015 - Cervical Cancer Prevention Course (e-oncologia), elaborado pelo Institut Català d’Oncologia e pela International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO).

2016 – Radicais livres em sistemas biológicos – Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQUSP).

2016 - Mecanismos de carcinogênese – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

2016 – Cell Biology: Mitochondria – Harvard University

Idiomas

Inglês – Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Certificados de proficiência de língua inglesa: TOEFL IBT e IELTS.

Alemão - Compreende Pouco, Fala Pouco, Lê Pouco, Escreve Pouco.

Espanhol - Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Lê Razoavelmente, Escreve Razoavelmente.

Artigos submetidos (Mestrado)

-**SILVA GAF**, NUNES RAL, MORALE MG, AGUAYO F, TERMINI L Therapy approaches for cervical cancer treatment. Clinics. CLINICS-2017-0548.

-NUNES RAL, MORALE MG, **SILVA GAF**, VILLA LL, TERMINI L. Innate Immunity and HPV: friends or foes. Clinics. CLINICS-2017-0549.R1. Artigo aceito para publicação em 05/06/2018.

Resumos publicados em anais de congressos (Mestrado)

SILVA, G Á; NUNES, R. A. L. ; Enrique Boccardo ; VILLA, L. L. ; TERMINI, L. . Estudo do papel da proteína superóxido dismutase 2 (SOD2) no processo de transformação celular mediado por HPV. In: VIII Jornada da Pós-Graduação em Oncologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP)/Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, 2016, São Paulo. VIII Jornada da Pós-Graduação em Oncologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP)/Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, 2016.

NUNES, R. A. L. ; **SILVA, G. A. F.** ; FERREIRA, S. A. ; ANDRETTE, R. ; SICHERO, L. ; VILLA, L. L. ; BOCCARDO, E. ; TERMINI, L. . ROLE OF CHRONIC INFLAMMATION AND OXIDATIVE STRESS IN HPV-MEDIATED CELL TRANSFORMATION. In: 31st International Papillomavirus Conference (HPV 2017), 2017.

SILVA, G Á F; NUNES, R. A. L. ; Enrique Boccardo ; VILLA, L. L. ; TERMINI, L. . Study of Superoxide Dismutase 2 (SOD2) protein in HPV-mediated cell transformation .In: AACR International Conference On Translational Cancer Medicine, 2017.

SILVA, G Á F; NUNES, R. A. L. ; Enrique Boccardo ; VILLA, L. L. ; TERMINI, L. . Study of Superoxide Dismutase 2 (SOD2) protein in HPV-mediated cell transformation .In:3rd ICGB Workshop on Human Papillomavirus and associated malignancies: biology, prevention and therapy, 2017.

SILVA, G Á F; NUNES, R. A. L. ; Enrique Boccardo ; VILLA, L. L. ; TERMINI, L. . Estudo do papel da proteína superóxido dismutase 2 (SOD2) no processo de transformação celular mediado por HPV. In: IX Jornada da Pós-Graduação em Oncologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP)/Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, 2016, São Paulo. VIII Jornada da Pós-Graduação em Oncologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP)/Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, 2017.

Atividades Acadêmicas Realizadas/ Participação em eventos, congressos, exposições e feiras (Mestrado)

- **SILVA, GAF.** Envolvimento do estresse oxidativo e de citocinas pró-inflamatórias no processo de traenvolvimento do estresse oxidativo e de citocinas pró-inflamatórias no processo de transformação celular mediado por HPV. 2015. (Apresentação de Trabalho/Seminário).
- Apresentação de pôster (Estudo do papel da proteína Superóxido Dismutase 2 no processo de transformação celular mediado por HPV) na VIII Jornada da Pós-Graduação em Oncologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) /Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) recebendo **menção honrosa** no final do evento (2016).
- Participação na VIII Jornada da Pós-Graduação em Oncologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) /Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) como **avaliadora** do pôster Imagem PET de neuroinflamação e conteúdo de mielina em modelo animal de esclerose múltipla (2016).
- Participação no Curso de Verão IV Curso de Oncologia Molecular (Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) e Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), como **ministrante** da aula O Metabolismo da Célula Tumoral. 2016.
- CELLebration: Ferramentas e novidades em biologia celular. 2016. (Seminário)
- Participação no evento *Innovation in Cancer Research Symposium*. 2016. (Simpósio – ouvinte).
- AACR International Conference on Translational Cancer Medicine. Study of Superoxide Dismutase-2 protein in HPV-mediated cell transformation. 2017. (Congresso – Apresentação de pôster)
- 3rd ICGB Workshop on Human Papillomavirus and associated malignancies: biology, prevention and therapy, 2017 (Congresso – Apresentação Oral).
- Apresentação de pôster (Estudo do papel da proteína Superóxido Dismutase 2 no processo de transformação celular mediado por HPV) na IX Jornada da Pós-Graduação em Oncologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) /Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), 2017.
- Participação na VIII Jornada da Pós-Graduação em Oncologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) /Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) como **avaliadora** do pôster *Role of PHLDA1 (Pleckstrin homology-like domain, family A, member 1) in migration and invasion in breast cancer cells* (2017).
- **Pesquisadora associada** no projeto FAPESP: Eficácia da auto-coleta cervicovaginal no rastreamento do câncer do colo do útero (processo #2016/16847-0).

ANEXO B

Documento fornecido pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo declarando ciência perante a execução do Projeto n° 0054/17

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 08/03/2017, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 0054/17 intitulado: "ESTUDO DO PAPEL DA PROTEÍNA SUPERÓXIDO DISMUTASE 2 (SOD2) NO PROCESSO DE TRANSFORMAÇÃO CELULAR MEDIADO POR HPV," apresentado pelo Departamento de RADIOLOGIA E ONCOLOGIA

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466/12, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Lara Termini

Pesquisador (a) Executante: Gabriela Ávila Fernandes Silva

CEP-FMUSP, 08 de Março de 2017.

Profa. Dra. Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo C

Revisão submetida à revista *Clinics* intitulada “Oxidative Stress: Therapy approaches for cervical cancer treatment” – Gabriela Ávila Fernandes Silva (1ª autora)

CLINICS

ICESP - Oxidative Stress: Therapy approaches for cervical cancer treatment

Journal:	CLINICS
Manuscript ID:	CLINICS-2017-0548.R1
Manuscript Type:	Review Article
Date Submitted by the Author:	07-May-2018
Complete List of Authors:	<p>Silva, Gabriela; Universidade de Sao Paulo Faculdade de Medicina Hospital das Clinicas Instituto do Cancer; Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Departamento de Radiologia e Oncologia</p> <p>Nunes, Rafaela; Universidade de Sao Paulo Faculdade de Medicina Hospital das Clinicas Instituto do Cancer; Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Departamento de Radiologia e Oncologia</p> <p>Morale, Mirian; Universidade de Sao Paulo Faculdade de Medicina Hospital das Clinicas Instituto do Cancer; Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Departamento de Radiologia e Oncologia</p> <p>Boccardo, Enrique; Universidade de Sao Paulo Instituto de Ciencias Biomedicas, Microbiology Aguayo, Francisco; Departamento de Oncologia Básico Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile; Centro Avanzado de Enfermedades Crónicas (ACCDIS), Facultad de Medicina, Universidad de Chile</p> <p>Termini, Lara; Universidade de Sao Paulo Faculdade de Medicina Hospital das Clinicas Instituto do Cancer</p>
Keyword - Click <A HREF='http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html'	tumor markers, Human Papillomavirus, Redox System, cervical cancer

Oxidative Stress: Therapy approaches for cervical cancer treatment

RUNNING TITLE: Oxidative Stress and Cervical Cancer

3

Gabriela Ávila Fernandes Silva^{1,2}, Rafaela Almeida Lima Nunes^{1,2},

Mirian Gallote Morale^{1,2}, Enrique Boccardo³, Francisco Aguayo^{4,5}, Lara Termini¹

6

¹Instituto do Cancer do Estado de Sao Paulo ICESP, Centro de Investigação Translacional em Oncologia, Hospital das Clinicas HC, Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo FMUSP, Av. Dr. Arnaldo 251, Sao Paulo, SP, CEP 01246-000, Brazil.

²Departamento de Radiologia e Oncologia, Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil.

³Laboratory of Oncovirology, Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

⁴Centro Avanzado de Enfermedades Crónicas (ACCDiS), Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

⁵Departamento de Oncología Básico Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Authors' contributions:

Silva, Gabriela A F: Contributed to: Abstract, Introduction, Figure, Therapeutic approaches and Conclusion. Revised the text and references.

Nunes, Rafaela A L: Contributed to: Prepared and revised the text.

Morale, Mirian G: Contributed to: Introduction, revised the text and references

Aguayo, Francisco and Enrique Boccardo: Revised the text

Termini, Lara: Prepared and revised the text

27

1 Oxidative Stress: Therapy approaches for cervical cancer treatment

2

3 Gabriela Ávila Fernandes Silva^{1,2}, Rafaella Almeida Lima Nunes^{1,2},

4 Mirian Gallote Morale^{1,2}, Enrique Boccardo³, Francisco Aguayo^{4,5}, Lara Termini¹

5

6 ¹Instituto do Cancer do Estado de Sao Paulo ICESP, Centro de Investigaçao
7 Translacional em Oncologia, Hospital das Clinicas HC, Faculdade de Medicina da
8 Universidade de Sao Paulo FMUSP, Av. Dr. Arnaldo 251, Sao Paulo, SP, CEP 01246-
9 000, Brazil.

10 ²Departamento de Radiologia e Oncologia, Faculdade de Medicina da Universidade de
11 Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil.

12 ³Laboratory of Oncovirology, Department of Microbiology, Institute of Biomedical
13 Sciences, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

14 ⁴Centro Avanzado de Enfermedades Crónicas (ACCDiS), Facultad de Medicina,
15 Universidad de Chile, Santiago, Chile.

16 ⁵Departamento de Oncología Básico Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de
17 Chile, Santiago, Chile.

18

19 Authors' contributions:

20 Silva, Gabriela A F: Contributed to: Abstract, Introduction, Figure, Therapeutic
21 approaches and Conclusion. Revised the text and references.

22 Nunes, Rafaella A L: Contributed to: Prepared and revised the text.

23 Morale, Mirian G: Contributed to: Introduction, revised the text and references

24 Aguayo, Francisco and Enrique Boccardo: Revised the text

25 Termini, Lara: Prepared and revised the text

26

Abstract

Oxidative stress (OS) results from an imbalance between oxidant species generation and elimination which results in DNA, RNA and protein damage, leading to the accumulation of genetic alterations that can favor malignant transformation. Persistent infection with high-risk human papillomavirus types (HR-HPV) is associated with inflammatory responses and ROS production. In this context OS, chronic inflammation and HR-HPV can act in a synergistic way. To counteract the harmful effects of oxidant species, protective molecules, known as antioxidant defenses, are produced by cells to maintain redox homeostasis, controlling the equilibrium between generation and removal of oxygen and nitrogen reactive molecules. During the last years, the use of natural antioxidants as therapeutic strategies for cancer treatment has attracted the attention of the scientific community. The present review focus on the discussion of the molecular mechanisms underlying the antitumoral effects of natural antioxidants such as curcumin, epigallocatechin-3-gallate, resveratrol, ascorbic acid and α -tocopherol for cervical cancer prevention or treatment.

Introduction

Oxidative stress: general aspects

Oxidative stress (OS) results from an unbalanced formation and elimination of oxidant species. Accumulation of these molecules may lead to cell dysfunction as a consequence of oxidative modifications accumulated in several biomolecules (1). Free radicals generation represents a continuous physiological process that results from biological functions, including metabolism and inflammation. In the mitochondria, cytochrome P450 and peroxisomes are the major endogenous factors leading to reactive

1 oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) formation. Other exogenous
 2 factors such as radiation, tobacco smoking, chemotherapy and diet are also important
 3 inductors of free radicals production (2). Intermediate reactive species naturally
 4 produced under physiological conditions have a crucial role in the regulation of
 5 metabolism, cell cycle and intracellular signaling pathways (3). In order to maintain
 6 redox homeostasis, protective molecules called "antioxidant defenses" act to preserve
 7 the balance between formation and removal of ROS and RNS.

8 Cellular antioxidant systems are currently divided into enzymatic and non-
 9 enzymatic groups. The enzymatic group comprises catalase, superoxide dismutase
 10 (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione-S-transferase (GST). The non-
 11 enzymatic group is composed by molecules such as vitamins C and E, lipoic acid,
 12 carotenoids, flavonoids and others (4). The excess of not neutralized free radicals and
 13 cellular active intermediates is the main cause of OS (5–7). The presence of high
 14 concentrations of oxidized biomolecules is associated with alterations in aerobic
 15 metabolism, inflammatory response, exposure to UV radiation, hypoxia, anomalous cell
 16 proliferation and viral infections, among others. Therefore, OS is a factor directly
 17 associated with several pathological conditions including tumors caused by Human
 18 papillomavirus (HPV) infection (Figure 1) (8–10).

19 20 Human papillomavirus infection and cancer

21 Persistent infection with high-risk HPV types is the main etiological cause for
 22 the development of several epithelial tumors at different anatomic locations. The most
 23 strongly HPV-associated malignancy is cervical carcinoma, where almost all tumors are
 24 positive for viral DNA (11). Cervical carcinoma is the second most common type of
 25 cancer in women worldwide, with about 530,000 new cases and 270,000 deaths per

1 year, of which more than 85% occur in developing countries. Besides, HPV infection is implicated in a variable, although consistently high, proportion of vaginal, vulvar, anal, penile and head and neck carcinomas. (12,13).

Besides HPV infection, several co-factors contribute to cervical cancer development. These include low socioeconomic status, early sexual initiation, multiple sexual partners, smoking, multiparity, immunosuppression and the use of oral contraceptives (14,15). Cervical cancer is mostly a consequence of the continuous evolution of non-invasive precursor lesions called cervical intraepithelial neoplasias (CIN) and characterized by different degrees of cellular atypia (dysplasias) (16). Consequently, CIN are divided into: CIN 1, mild dysplasia; CIN 2, moderate dysplasia; and CIN 3, carcinoma *in situ*, characterized by a severe dysplasia that may progress to an invasive squamous cell carcinoma (SCC). Moreover, changes in the glandular epithelium caused by HPV and other cofactors are associated with the development of adenocarcinoma (16,17).

Cervical neoplasia caused by HPV occurs in individuals with persistent infection, since HPV-induced carcinogenesis involves genetic and epigenetic changes that affect the expression of different cellular proto-oncogenes and tumor suppressor genes. Usually, this process takes a long time to accumulate enough alterations to trigger and sustain tumor development (18,19). Therefore, immune system evasion and HPV persistence are crucial factors for tumorigenesis (20). This is highlighted by the fact that the great majority of HPV infections are self-limited and spontaneously resolved in few months, and cancer development affects only a small proportion of infected individuals.

The E6 and E7 viral oncoproteins have a central function on tumor development. In high-grade lesions and tumors these proteins are upregulated mainly due to the loss or

1 disruption of the viral E2 gene (see below), which normally restricts the expression of
 2 the viral oncogenes (21). E6 and E7 interact with several tumor suppressor factors and
 3 cell cycle regulators, as p53 and pRB, leading to their deregulation and consequently to
 4 cell immortalization. In addition, E6 and E7 affect other cellular proteins with several
 5 regulatory activities, promoting immune evasion, resistance to apoptosis and epithelium
 6 cells proliferation (22). The pleiotropic function of these oncoproteins deserves to be
 7 pointed out, since it is the result of a well-adapted evolutionary relationship between
 8 virus and host, and it is essential when considering HPV tumorigenesis (23).

9 Persistent viral infections associated to chronic inflammatory responses lead to
 10 ROS production (24). In high-risk human papillomavirus (HR-HPV) infected cells, OS
 11 is caused by abnormal metabolism of keratinocytes expressing E6 and E7 oncoproteins
 12 and by the non-effective chronic inflammatory response, contributing to the cell
 13 transformation process (25).

14 Alterations in the expression and activity of some antioxidant proteins including
 15 peroxiredoxins, catalase, quinone oxidoreductase-1 and SOD family proteins can be
 16 detected in pre-neoplastic and neoplastic tissues associated to HPV infections. For
 17 example, the expression of SOD2, a crucial antioxidant enzyme responsible for the
 18 redox status regulation of normal and tumor cells, is up-regulated in several HPV-
 19 associated tumors, including penile and cervical carcinomas, in comparison to normal
 20 tissues (26–29). Besides, results from different studies have established that HR-HPV
 21 E6 and E7 oncoproteins can modulate OS process favoring the accumulation of
 22 mutations, a fact that is directly related to cell transformation (23,30,31).

23 Oxidative Stress and Inflammasomes

Importantly, OS generated during viral infections can be modulated both by intracellular production of ROS and by activated neutrophils and macrophages ROS release (32–34). Moreover, ROS regulate inflammasomes in response to oncogenic virus infections such as HR-HPV (35–37). Inflammasomes are important because they activate caspase-1 in response to invading pathogens. Therefore, caspase-1 will cooperate with apoptosis-associated speck-like protein containing a C-terminal caspase-recruitment domain (ACS), processing proinflammatory cytokines interleukin 1 beta (IL-1 β) and interleukin 18 (IL-18) into its mature forms (38).

Furthermore, the protein absent in melanoma-2 (AIM2) will activate caspase-1 and inflammasomes by binding to foreign cytoplasmic double stranded DNA (dsDNA) and its adaptor ACS (39–41). Interestingly, HPV16 activates AIM2 inflammasomes and promotes up-regulation of proinflammatory factors, such as, IL-1 β , IL-1 α , and IL-18, which are increased in lesions that evolve to cervical cancer (36).

Oxidative Stress and DNA damage

A crucial event in HPV-mediated malignant transformation is the integration of HR-HPV DNA into the cell genome. This event determines E6 and E7 oncogenes overexpression that leads to the destabilization of p53 and pRb tumor suppressor proteins, respectively (42). HR-HPV integration is facilitated by the DNA damage/double strand breaks (DSBs) generation (43). It is important to point out that DNA damage causes oxidation of DNA, leading to a plethora of genome alterations which include deletions, insertions, point mutations, DSBs and translocations (44,45).

It was previously described that genome oxidative damage is strongly involved in epigenetic alterations (46). In an elevated oxidative DNA damage environment, the production of 8-oxo-2'-deoxyguanosine (major product of DNA oxidation) coincides

1 with increased HPV infection, viral-host integration and cervical dysplasia (47).
 2 Furthermore, HR-HPV integration into the cell genome generally causes the disruption
 3 of HPV E2 ORF, resulting in E2 gene inactivation and up-regulation of E6 and E7
 4 transcription (43).

5 DNA repair pathways can be affected by HPV oncoproteins resulting in the
 6 inactivation of important groups of genes such as base excision repair (BER), nucleotide
 7 excision repair (NER), DNA mismatch repair (MMR), Microhomology-mediated end
 8 joining (MMEJ), Fanconi anaemia (FA), ataxia-telangiectasia mutated (ATM), and the
 9 ATM and Rad3-related (ATR) (48). These pathways are implicated in HR-HPV-
 10 mediated cervical cancer (49,50).

11 It is known that during HR-HPV infection, apoptosis is hindered by disruption of
 12 many regulatory pathways, which results in altered cell proliferation associated to
 13 accumulation of mutations and alterations in gene expression (24). In HPV16-related
 14 invasive cervical cancer, E2 binding sites (E2BSs) at the Long Control Region (LCR)
 15 are epigenetically regulated by hypermethylation, dampening E2 protein expression and
 16 resulting in the upregulation of E6 and E7 expression (51–53). Moreover, DNA
 17 methylation could also work as a barrier protecting the virus from the immune
 18 surveillance (54,55). In summary, theoretical considerations suggests that OS, chronic
 19 inflammation, epigenetic alterations and HR-HPV can act in a synergistic way during
 20 the oncogenesis process.

21

22 **Therapeutic approaches**

23

24 Oxidative stress control: natural antioxidants

1 Recently, natural compounds with chemopreventive and chemotherapeutic
2 properties, which presents antioxidant features, have been received more attention (56).
3 Currently, an inverse association was observed between antioxidant factors present in
4 the diet and HPV tumorigenesis, suggesting that natural antioxidants may protect
5 against HPV persistence and tumor development (57,58). Besides, studies using natural
6 compounds present in plant extracts, such as curcumin and resveratrol, sensitize tumor
7 cells to radio and chemotherapy. These observations indicate that natural antioxidants
8 have the potential to reduce the establishment and progression of precursor lesions.
9 Besides, it is tempting to speculate that molecules with these properties may be used as
10 a complementary approach for cancer treatment (59,60).

12 *Curcumin*

13 The value has been widely addressed and discussed in the scientific literature.
14 This compound presents anti-inflammatory, antitumoral, antioxidant, cardioprotective
15 and several other properties (61–68). Curcumin can act in all the steps of the
16 tumorigenic process, from initiation to cancer progression (59). This molecule has the
17 ability to inhibit nuclear factor kappa B (NF- κ B), downregulating components of the
18 inflammatory response. Moreover, curcumin downregulates other crucial transcription
19 factors responsible for the regulation of cell growth and survival pathways including
20 STAT3, COX2, Akt, antiapoptotic proteins and AP1 (59,69,70). In addition, this
21 compound has the capacity to downregulate angiogenesis *in vivo*, inhibiting the activity
22 of pro-angiogenic molecules such as fibroblast growth factor 2 (FGF-2), matrix
23 metalloproteases and cyclooxygenase-2 (COX-2) (71,72). Finally, curcumin can induce
24 the expression of antioxidant enzymes through NRF2 activation (57).

Due to the biological properties and its low toxicity, curcumin is an interesting alternative to therapeutic agents used for the treatment of several types of cancer (73–75). Various studies have addressed the effect of curcumin anti-tumor properties in experimental models of cervical cancer. For instance, it was observed that the HPV16-positive cervical cancer derived cell line, SiHa, can be sensitized to cisplatin treatment by curcumin co-administration. This leads to inhibition of NF- κ B activity and increased cell-death (76). Treatment with curcumin also sensitizes cervical cancer derived cells and HPV-positive tumors to taxol and paclitaxel, respectively. Again, these effects involve the downregulation of survival signals regulated by NF- κ B and Akt such as phosphorylation of MAPKs and induction of Cyclin-D1, Cox-2, XIAP and cIAP1 (77–79). A recent study showed that pirin, another NF- κ B regulator and OS sensor, is overexpressed in cervical cancer derived cell lines and in oral mucosal keratinocytes expressing HPV16 oncogenes (80). This observation shows another mechanism for HR-HPV-dependent NF- κ B activation in cervical cancer cells and further supports the potential use of this factor as a therapeutic blank.

Finally, curcumin was shown to downregulate HPV18 transcription in HeLa cells, inhibiting AP-1 pathway and reversing the expression pattern of c-fos and fra-1 (81). In addition, it was suggested that depending on the concentration and time of treatment with curcumin, a cytotoxic effect can be observed in cervical cancer cells which is higher when cells are HPV positive (82). Interestingly, another study showed that thioredoxin reductase plays a role in the radio-sensitizing effect that curcumin exerts on cervical cancer cells (83).

Epigallocatechin-3-gallate (ECGC)

Another important polyphenol with anticancer properties is epigallocatechin-3-gallate (EGCG). This potent antioxidant scavenges ROS, and has antiproliferative, antiangiogenic, antimetastatic and proapoptotic effects in several tumor models (84–94). In addition, it was observed that its antiproliferative effect is related to the accumulation of cells at G1 phase of the cell cycle, followed by apoptosis (95). Interestingly, this compound can also induce apoptosis in cervical cells extracted from fresh tissues (96). A recent study showed that EGCG exhibits free radical scavenging properties in cells isolated from cervical cancer biopsies, decreasing cell proliferation and increasing antioxidant enzymes activity as SOD and GPx (97).

Besides targeting cell growth and apoptosis, EGCG can further inhibit telomerase action, impairing initiation and development of cervical lesions (98,99). As mentioned before, EGCG also displays antiangiogenic features through inhibition of hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 α) and of vascular endothelial growth factor (VEGF), as a result of proteasome activity and blockage of PI3K/Akt and ERK1/2 regulated pathways (100).

Resveratrol

Resveratrol, another natural polyphenol, shows an anti-tumor effect by interacting with several molecules involved in tumor development, for example, Fas, Rb-E2F/DP, MAPK, NF- κ B and AP-1 (101). Resveratrol presents antiproliferative activity on cervical cancer derived cell lines. This effect was characterized by accumulation of cells in S-phase of the cell cycle (60). This result was further confirmed by another study, using a double dosage of resveratrol capable of inducing a transient and reversible blockage of S-phase in HeLa cells (102).

1 Recently, it was reported that the glycoprotein cyclooxygenase (COX) pathway
 2 is a crucial target of resveratrol. However, resveratrol apparently does not directly
 3 regulate COX expression. Instead, it may regulate other enzymes related to
 4 prostaglandin synthesis, therefore acting downstream of COX pathway (103).

5 Interestingly, resveratrol can reduce the active form of Akt, leading SiHa and
 6 HeLa cells to autophagy, cell cycle arrest and apoptosis. Moreover, resveratrol has the
 7 capacity to destabilize lysosomes, resulting in cathepsin L (cat L) translocation to the
 8 cytosol (101,103–105). When cat L presents increased enzymatic activity in cytosol,
 9 cytochrome c is released from mitochondria leading to cell death by apoptosis. To
 10 trigger apoptosis through cat L, resveratrol activates autophagy, resulting in lysosome
 11 membrane permeabilization and release of its proteases to the cytosol. (104). Studies
 12 conducted by Rezk *et al.* (106) showed that resveratrol improves the effectiveness of
 13 cisplatin and doxorubicin chemotherapy, supporting the possibility of its use in cervical
 14 cancer treatment.

15 *Ascorbic acid (Vitamin C)*

16 Recent data shows that vitamin C, another antioxidant molecule, is capable to
 17 increase the effect of chemotherapeutic agents without augmenting their toxicity in
 18 normal cells. When tested on SiHa cells, it was observed that the association of vitamin
 19 C and cisplatin enhanced cisplatin-mediated apoptosis induction in SiHa cells through a
 20 p53-mediated pathway. Therefore, lower concentrations of cisplatin were required to
 21 induce cancer cells death. Therefore, it is tempting to speculate that in combination with
 22 vitamin C lower amounts of cisplatin could be used in cancer patients, resulting in its
 23 side effects reduction (107).

1 Interestingly, ascorbyl stearate (ASC-S), a fatty acid ester derivative from
 2 ascorbic acid, exhibits a potent pro-apoptotic activity. Recently, Mane and co-workers
 3 (108) described the pro-apoptotic effect of this molecule on HeLa cells due to the
 4 induction of changes in the mitochondria membrane permeability, cytochrome c release
 5 and activation of caspase-3 and NF- κ B.

6 Finally, the direct impact of ascorbic acid on cervical carcinogenesis has been
 7 suggested. A cross-sectional study published by Hwang (109) showed that a dietary
 8 supplementation including vitamin C might reduce the risk of CIN in women with HR-
 9 HPV infection.

11 *α -Tocopherol (Vitamin E)*

12 Results from previous studies suggest the existence of an association between α -
 13 tocopherol (also known as Vitamin E) plasma levels and HPV infection status. For
 14 instance, it was reported that women with CIN exhibit decreased plasma levels of this
 15 antioxidant that may reflect the existence of elevated oxidative stress (110,111). Similar
 16 results showed that patients with cervical cancer have low levels of vitamin E (112).
 17 Additionally, Hu and co-workers (113) suggested that vitamin E intake or higher levels
 18 of circulating vitamin E may reduce the risk of CIN and cervical cancer. Also, a study
 19 published by Palan and co-workers (114) supports previous data suggesting that α -
 20 tocopherol and other antioxidants might have an important protective role *in vivo*. In
 21 addition, the maintenance and regeneration of α -tocopheryl quinone (a non-oxidized
 22 form of α -tocopherol) may also have an important role in CIN and in cervical cancer.
 23 However, further investigations about α -tocopheryl quinone as a potential marker of OS
 24 in precancerous lesions and cervical cancer are strongly needed (114).

1 Oxidative stress induction: traditional chemotherapy

2 Despite the positive results with the use of antioxidant compounds described
3 above, traditional cancer chemotherapy still relies on the induction of OS triggered by
4 ROS levels higher than tumor elimination capacity, contributing to tumor cell death
5 (115). Nevertheless, there are evidences that upregulation of antioxidant enzymes by
6 cancer cells has a relevant role in OS control and possibly in resistance to drugs (116).

7 One of the most important systems involved in cell protection against elevated
8 levels of free radicals, including those induced by chemotherapy and radiotherapy, is
9 composed by glutathione (GSH) and GSH-related enzymes (117). Regarding this issue,
10 a study analyzed the role of GSH redox system in glioblastoma multiforme cells drug
11 resistant. Temozolomide (TMZ)-resistant glioma cells showed low levels of ROS and
12 high GSH and glutathione reductase levels, exhibiting greater antioxidant capacity than
13 sensitive cells, suggesting that this redox system may be an important therapeutical
14 target (118). Interestingly, HPV proteins are also able to modulate ROS by regulating
15 GSH and SOD levels (119). In fact, it was observed a relationship between GSH levels
16 in cervical cancer cells and resistance to doxorubicin treatment, an anticancer drug that
17 induces DNA damage and ROS production (120).

18 An alternative treatment for cervical cancer considers molecules capable to
19 inhibit antioxidant pathways. For example, exposure of HeLa cells to pinostrobin, a
20 dietary bioflavonoid, was associated to reduced cell viability and downregulation of
21 GSH and NO^{2-} levels. Pinostrobin caused cell death involves upregulation of
22 components of the apoptotic extrinsic and intrinsic pathways, DNA and mitochondrial
23 damage probably as a consequence of ROS accumulation (121). Another compound,
24 Auranofin, an inhibitor of thioredoxin reductase, is also capable to trigger apoptosis
25 while depleting GSH and increasing ROS intracellular levels. In addition, its effect on

1 cervical cancer cell lines can be intensified by combining it with a GSH synthesis
2 inhibitor, L. buthionine sulfoximine (122). By inhibiting antioxidant effects, these
3 treatments overcome HPV resistance to ROS induction, leading to cell death. Finally,
4 therapeutic approaches using ROS inducers or anti-oxidant molecules, as SOD and
5 SOD-mimetics combined with radiotherapy or chemotherapy have been investigated
6 and may constitute viable alternatives for cancer treatment in the future (123).

7 8 Enzyme inhibitors

9 The use of enzyme inhibitors such as tyrosine kinase inhibitors (TKIs) to
10 modulate ROS effects constitutes an important alternative to cancer therapies currently
11 under investigation. Sunitinib, for instance, is the most common TKI administered in
12 clinical medicine and effectively blocks VEGF receptors (124–126), platelet-derived
13 growth factor receptor (PDGFR) *alfa* and *beta*, and c-Kit (127). According to some
14 published data, Sunitinib could have an antioxidant activity due to improvement of lipid
15 peroxidation and also, because of the augment of GSH levels after cisplatin treatment,
16 reducing OS-triggered side effects and improving chemotherapy efficacy (128). When
17 combined with chloroquine, Sunitinib augments NOS production, causing an
18 accumulation of RNS and triggering apoptosis, while it can also increase the levels of
19 GSH, which in turn can interrupt apoptosis (129). In addition, combination of
20 chloroquine and Sunitinib induces higher toxicity in breast, cervical, colorectal,
21 hepatocellular, laryngeal and prostate cancer cell lines as well as in mice tumor models
22 (129). However, based on the current knowledge, it is still unclear the potential impact
23 of these effects on patients' outcome.

1 Conclusion

Oxidative stress is a consequence of an imbalance between pro and antioxidants factors. The antioxidant system maintains the oxidative process within physiological limits, preventing oxidative injury that can culminate in irreparable systemic damage and diseases.

Signaling pathways related to redox control in HPV-mediated carcinogenesis represent promising targets for cancer treatment. Some antioxidant molecules, including natural compounds, are possibly useful preventive or therapeutic alternatives. Despite the antioxidant compounds positive results, OS induction is still an effective therapeutic approach used in traditional chemotherapy. This approach aims to upregulate the production of reactive species to levels that overcome the tumor elimination capacity and causes cell death. However, there are evidences that an increase of antioxidants enzymes by cancer cells has a relevant role in OS control and possibly in drug resistance.

Current knowledge indicates that several molecules and enzyme inhibitors act to modulate ROS, and that they can be considered some of the most significant therapeutic targets for anticancer compounds development and as an essential field for extensive study as well.

References

1. Devasagayam TPA, Tilak JC, Boloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India*. 2004 Oct;52:794–804.
2. Bhattacharyya A, Chattopadhyay R, Mitra S, Crowe SE. Oxidative Stress: An Essential Factor in the Pathogenesis of Gastrointestinal Mucosal Diseases. *Physiol Rev*. 2014 Apr;94(2):329–54.
3. Nathan C. Specificity of a third kind: Reactive oxygen and nitrogen intermediates in cell signaling. Vol. 111, *Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation; 2003. p. 769–78.
4. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTDD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007 Jan;39(1):44–84.
5. Sies H. Oxidative Stress: Introductory Remarks. In: *Oxidative Stress*. Elsevier; 1985. p. 1–8.
6. Sies H, Cadenas E, Symons MCR, Scott G. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1985 Dec 17;311(1152):617–31.
7. Sies H. Biochemistry of Oxidative Stress. Vol. 25, *Angewandte Chemie International Edition in English*. Hüthig & Wepf Verlag; 1986. p. 1058–71.
8. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol*. 2004 May;142(2):231–55.
9. Xu Y, Fang F, Dhar SK, Bosch A, St Clair WH, Kasarskis EJ, et al. Mutations in the SOD2 promoter reveal a molecular basis for an activating protein 2-dependent dysregulation of manganese superoxide dismutase expression in cancer cells. *Mol Cancer Res*. 2008 Dec 1;6(12):1881–93.
10. Gallagher CJ, Ahn K, Knipe AL, Dyer A-M, Richie JP, Lazarus P, et al. Association between haplotypes of manganese superoxide dismutase (SOD2), smoking, and lung cancer risk. *Free Radic Biol Med*. 2009 Jan 1;46(1):20–4.
11. Bosch FX, Broker TR, Forman D, Moscicki A-B, Gillison ML, Doorbar J, et al. *Comprehensive Control of Human Papillomavirus Infections and Related Diseases*.

- 1
 - 2
 - 3
 - 4
 - 5
 - 6
 - 7
 - 8
 - 9
 - 10
 - 11
 - 12
 - 13
 - 14
 - 15
 - 16
 - 17
 - 18
 - 19
 - 20
 - 21
 - 22
 - 23
 - 24
 - 25
 - 26
 - 27
 - 28
 - 29
 - 30
 - 31
 - 32
 - 33
 - 34
 - 35
 - 36
 - 37
 - 38
 - 39
 - 40
 - 41
 - 42
 - 43
 - 44
 - 45
 - 46
 - 47
 - 48
 - 49
 - 50
 - 51
 - 52
 - 53
 - 54
 - 55
 - 56
 - 57
 - 58
 - 59
 - 60
- 1 Vaccine. 2013 Dec 30;31:G1–31.
- 2 12. Woodman CBJ, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection:
3 unresolved issues. *Nat Rev Cancer*. 2007 Jan 1;7(1):11–22.
- 4 13. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. GLOBOCAN
5 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase. No. 11. Vol.
6 11, Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2013. p.
7 <http://globocan.iarc.fr>.
- 8 14. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJLM, Shah K V. The causal relation between
9 human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*. 2002 Apr;55(4):244–65.
- 10 15. Cotton SC, Sharp L, Seth R, Masson LF, Little J, Cruickshank ME, et al. Lifestyle and
11 socio-demographic factors associated with high-risk HPV infection in UK women. *Br J*
12 *Cancer*. 2007 Jul 22;97(1):133–9.
- 13 16. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application.
14 *Nat Rev Cancer*. 2002 May 1;2(5):342–50.
- 15 17. WHO, ICO. Human Papillomavirus and Related Diseases Report - WORLD. HPV Inf
16 Cent. 2014;(Albania):1–138.
- 17 18. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer.
18 *Clin Sci (Lond)*. 2006 May 1;110(5):525–41.
- 19 19. Bodily J, Laimins LA. Persistence of human papillomavirus infection: keys to malignant
20 progression. *Trends Microbiol*. 2011 Jan;19(1):33–9.
- 21 20. Crosbie EJ, Einstein MH, Franceschi S, Kitchener HC. Human papillomavirus and
22 cervical cancer. *Lancet*. 2013 Sep 7;382(9895):889–99.
- 23 21. Von Knebel Doeberitz M. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic
24 chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *European Journal of*
25 *Cancer* Nov, 2002 p. 2229–42.
- 26 22. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, et al. The Biology and
27 Life-Cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine*. 2012 Nov 20;30:F55–70.
- 28 23. Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to
29 transformation. *Nat Rev Cancer*. 2010 Aug 1;10(8):550–60.
- 30 24. Kgatle MM, Spearman CW, Kalla AA, Hairwadzi HN. DNA Oncogenic Virus-Induced
31 Oxidative Stress, Genomic Damage, and Aberrant Epigenetic Alterations. Vol. 2017,

- 1
 - 2
 - 3
 - 4
 - 5
 - 6
 - 7
 - 8
 - 9
 - 10
 - 11
 - 12
 - 13
 - 14
 - 15
 - 16
 - 17
 - 18
 - 19
 - 20
 - 21
 - 22
 - 23
 - 24
 - 25
 - 26
 - 27
 - 28
 - 29
 - 30
 - 31
 - 32
 - 33
 - 34
 - 35
 - 36
 - 37
 - 38
 - 39
 - 40
 - 41
 - 42
 - 43
 - 44
 - 45
 - 46
 - 47
 - 48
 - 49
 - 50
 - 51
 - 52
 - 53
 - 54
 - 55
 - 56
 - 57
 - 58
 - 59
 - 60
- 1 Oxidative Medicine and Cellular Longevity. Hindawi; 2017. p. 1–16.
- 2 25. Williams VM, Filippova M, Soto U, Duerksen-Hughes PJ. HPV-DNA integration and
- 3 3 carcinogenesis: putative roles for inflammation and oxidative stress. *Future Virol.* 2011
- 4 4 Jan 1;6(1):45–57.
- 5 26. Holley AK, Dhar SK, Xu Y, St. Clair DK. Manganese superoxide dismutase: beyond life
- 6 6 and death. *Amino Acids.* 2012 Jan 8;42(1):139–58.
- 7 27. Kinnula VL, Crapo JD. Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors.
- 8 8 *Free Radic Biol Med.* 2004 Mar 15;36(6):718–44.
- 9 28. Termini L, Filho AL, Maciag PC, Etlinger D, Alves VAF, Nonogaki S, et al.
- 10 10 Deregulated expression of superoxide dismutase-2 correlates with different stages of
- 11 11 cervical neoplasia. *Dis Markers.* 2011;30(6):275–81.
- 12 29. Termini L, Fregnani JH, Boccardo E, da Costa WH, Longatto-Filho A, Andreoli MA, et
- 13 13 al. SOD2 immunoexpression predicts lymph node metastasis in penile cancer. *BMC Clin*
- 14 14 *Pathol.* 2015 Dec 3;15(1):3.
- 15 30. Kaina B. DNA damage-triggered apoptosis: Critical role of DNA repair, double-strand
- 16 16 breaks, cell proliferation and signaling. In: *Biochemical Pharmacology.* 2003. p. 1547–
- 17 17 54.
- 18 31. Williams VM, Filippova M, Filippov V, Payne KJ, Duerksen-Hughes P. Human
- 19 19 Papillomavirus Type 16 E6* Induces Oxidative Stress and DNA Damage. *J Virol.* 2014
- 20 20 Jun 15;88(12):6751–61.
- 21 32. Levitsky V, Masucci MG. Manipulation of immune responses by Epstein-Barr virus.
- 22 22 Vol. 88, *Virus Research.* Elsevier; 2002. p. 71–86.
- 23 33. Tindle RW. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nat*
- 24 24 *Rev Cancer.* 2002 Jan 1;2(1):59–64.
- 25 34. Wieland SF, Chisari F V. Stealth and Cunning: Hepatitis B and Hepatitis C Viruses. *J*
- 26 26 *Virol.* 2005 Aug 1;79(15):9369–80.
- 27 35. Torres MA. Reactive Oxygen Species Signaling in Response to Pathogens. *PLANT*
- 28 28 *Physiol.* 2006 Jun 1;141(2):373–8.
- 29 36. Reinholz M, Kawakami Y, Salzer S, Kreuter A, Dombrowski Y, Koglin S, et al. HPV16
- 30 30 activates the AIM2 inflammasome in keratinocytes. *Arch Dermatol Res.* 2013 Oct
- 31 31 14;305(8):723–32.

- 1 37. Pontillo A, Bricher P, Leal VNC, Lima S, Souza PRE, Crovella S. Role of
2 inflammasome genetics in susceptibility to HPV infection and cervical cancer
3 development. *J Med Virol*. 2016 Sep;88(9):1646–51.
- 4 38. Lamkanfi M, Dixit VM. Mechanisms and functions of inflammasomes. Vol. 157, *Cell*.
5 2014. p. 1013–22.
- 6 39. Du W, Zhen J, Zheng Z, Ma S, Chen S. Expression of AIM2 is high and correlated with
7 inflammation in hepatitis B virus associated glomerulonephritis. *J Inflamm (Lond)*. 2013
8 Dec 10;10(1):37.
- 9 40. Han Y, Chen Z, Hou R, Yan D, Liu C, Chen S, et al. Expression of AIM2 is correlated
10 with increased inflammation in chronic hepatitis B patients. *Virol J*. 2015 Aug
11 20;12(1):129.
- 12 41. Zhen J, Zhang L, Pan J, Ma S, Yu X, Li X, et al. AIM2 mediates inflammation-
13 associated renal damage in hepatitis B virus-associated glomerulonephritis by regulating
14 caspase-1, IL-1 β , and IL-18. *Mediators Inflamm*. 2014 Feb 20;2014:190860.
- 15 42. Hu Z, Zhu D, Wang W, Li W, Jia W, Zeng X, et al. Genome-wide profiling of HPV
16 integration in cervical cancer identifies clustered genomic hot spots and a potential
17 microhomology-mediated integration mechanism. *Nat Genet*. 2015 Jan 12;47(2):158–63.
- 18 43. Chiang C-M, Ustav M, Stenlund A, Ho TF, Broker TR, Chow LT. Viral E1 and E2
19 proteins support replication of homologous and heterologous papillomaviral origins.
20 *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992 Jul 1;89(13):5799–803.
- 21 44. Karanjawala ZE, Murphy N, Hinton DR, Hsieh CL, Lieber MR. Oxygen metabolism
22 causes chromosome breaks and is associated with the neuronal apoptosis observed in
23 DNA double-strand break repair mutants. *Curr Biol*. 2002 Mar 5;12(5):397–402.
- 24 45. COOKE MS. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J*.
25 2003 Jul 1;17(10):1195–214.
- 26 46. O'Hagan HM, Mohammad HP, Baylin SB. Double strand breaks can initiate gene
27 silencing and SIRT1-dependent onset of DNA methylation in an exogenous promoter
28 CpG island. Lee JT, editor. *PLoS Genet*. 2008 Aug 15;4(8):e1000155.
- 29 47. Visalli G, Riso R, Facciola A, Mondello P, Caruso C, Picerno I, et al. Higher levels of
30 oxidative DNA damage in cervical cells are correlated with the grade of dysplasia and
31 HPV infection. *J Med Virol*. 2016 Feb 1;88(2):336–44.
- 32 48. Boccardo E. HPV-Mediated Genome Instability: At the Roots of Cervical

- 1 Carcinogenesis. *Cytogenet Genome Res.* 2010;128(1-3):57-65.
- 2
- 3
- 4
- 5 2 49. Peitsaro P, Hietanen S, Johansson B, Lakkala T, Syrjanen S. Single copy heterozygote
- 6 3 integration of HPV 33 in chromosomal band 5p14 is found in an epithelial cell clone
- 7 4 with selective growth advantage. *Carcinogenesis.* 2002 Jun;23(6):1057-64.
- 8
- 9
- 10 5 50. Pett MR, Herdman MT, Palmer RD, Yeo GSH, Shivji MK, Stanley MA, et al. Selection
- 11 6 of cervical keratinocytes containing integrated HPV16 associates with episome loss and
- 12 7 an endogenous antiviral response. *Proc Natl Acad Sci.* 2006 Mar 7;103(10):3822-7.
- 13
- 14
- 15 8 51. Kim K, Garner-Hamrick PA, Fisher C, Lee D, Lambert PF. Methylation patterns of
- 16 9 papillomavirus DNA, its influence on E2 function, and implications in viral infection. *J*
- 17 10 *Virol.* 2003 Dec;77(23):12450-9.
- 18
- 19
- 20 11 52. Stucki M, Clapperton JA, Mohammad D, Yaffe MB, Smerdon SJ, Jackson SP. MDC1
- 21 12 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA
- 22 13 double-strand breaks. *Cell.* 2005 Dec 29;123(7):1213-26.
- 23
- 24
- 25 14 53. Bhattacharjee B, Sengupta S. CpG methylation of HPV 16 LCR at E2 binding site
- 26 15 proximal to P97 is associated with cervical cancer in presence of intact E2. *Virology.*
- 27 16 2006 Oct 25;354(2):280-5.
- 28
- 29
- 30 17 54. Fernandez AF, Rosales C, Lopez-Nieva P, Graña O, Ballestar E, Ropero S, et al. The
- 31 18 dynamic DNA methylomes of double-stranded DNA viruses associated with human
- 32 19 cancer. *Genome Res.* 2009 Dec 22;19(3):438-51.
- 33
- 34
- 35 20 55. Fernandez AF, Esteller M. Viral epigenomes in human tumorigenesis. *Oncogene.* 2010
- 36 21 Mar 11;29(10):1405-20.
- 37
- 38
- 39 22 56. Thomasset SC, Berry DP, Garcea G, Marczylo T, Steward WP, Gescher AJ. Dietary
- 40 23 polyphenolic phytochemicals - Promising cancer chemopreventive agents in humans? A
- 41 24 review of their clinical properties. Vol. 120, *International Journal of Cancer.* 2007. p.
- 42 25 451-8.
- 43
- 44
- 45 26 57. Siegel EM, Salemi JL, Villa LL, Ferenczy A, Franco EL, Giuliano AR. Dietary
- 46 27 consumption of antioxidant nutrients and risk of incident cervical intraepithelial
- 47 28 neoplasia. *Gynecol Oncol.* 2010 Sep;118(3):289-94.
- 48
- 49
- 50 29 58. Tomita LY, Longatto Filho A, Costa MC, Avilla Andreoli MA, Villa LL, Franco EL, et
- 51 30 al. Diet and serum micronutrients in relation to cervical neoplasia and cancer among
- 52 31 low-income Brazilian women. *Int J Cancer.* 2010 Feb 1;126(3):703-14.
- 53
- 54
- 55 32 59. Goel A, Aggarwal BB. Curcumin, the golden spice from Indian saffron, is a
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60

- 1
 - 2
 - 3
 - 4
 - 5
 - 6
 - 7
 - 8
 - 9
 - 10
 - 11
 - 12
 - 13
 - 14
 - 15
 - 16
 - 17
 - 18
 - 19
 - 20
 - 21
 - 22
 - 23
 - 24
 - 25
 - 26
 - 27
 - 28
 - 29
 - 30
 - 31
 - 32
 - 33
 - 34
 - 35
 - 36
 - 37
 - 38
 - 39
 - 40
 - 41
 - 42
 - 43
 - 44
 - 45
 - 46
 - 47
 - 48
 - 49
 - 50
 - 51
 - 52
 - 53
 - 54
 - 55
 - 56
 - 57
 - 58
 - 59
 - 60
- 1 chemosensitizer and radiosensitizer for tumors and chemoprotector and radioprotector
- 2 for normal organs. Vol. 62, Nutrition and Cancer. 2010. p. 919–30.
- 3 60. Zoberi I, Bradbury CM, Curry HA, Bisht KS, Goswami PC, Roti Roti JL, et al.
- 4 Radiosensitizing and anti-proliferative effects of resveratrol in two human cervical tumor
- 5 cell lines. *Cancer Lett.* 2002 Jan 25;175(2):165–73.
- 6 61. Brouet I, Ohshima H. Curcumin, an anti-tumour promoter and anti-inflammatory agent,
- 7 inhibits induction of nitric oxide synthase in activated macrophages. Vol. 206,
- 8 Biochemical and biophysical research communications. 1995. p. 533–40.
- 9 62. Chan MMY, Adapala NS, Fong D. Curcumin overcomes the inhibitory effect of nitric
- 10 oxide on Leishmania. *Parasitol Res.* 2005 Apr 17;96(1):49–56.
- 11 63. Deodhar SD, Sethi R, Srimal RC. Preliminary study on antirheumatic activity of
- 12 curcumin (diferuloyl methane). *Indian J Med Res.* 1980 Apr;71:632–4.
- 13 64. Khafif A, Lev-Ari S, Vexler A, Barnea I, Starr A, Karaush V, et al. Curcumin: A
- 14 potential radio-enhancer in head and neck cancer. *Laryngoscope.* 2009
- 15 Oct;119(10):2019–26.
- 16 65. Lin JK, Lin-Shiau SY. Mechanisms of cancer chemoprevention by curcumin. *Proc Natl*
- 17 *Sci Counc Repub China B.* 2001 Apr;25(2):59–66.
- 18 66. Sreejayan, Rao MN. Nitric Oxide Scavenging by Curcuminoids. *J Pharm Pharmacol.*
- 19 1997 Jan;49(1):105–7.
- 20 67. Srivastava R, Dikshit M, Srimal RC, Dhawan BN. Anti-thrombotic effect of curcumin.
- 21 *Thromb Res.* 1985 Nov 1;40(3):413–7.
- 22 68. Venkatesan N. Curcumin attenuation of acute adriamycin myocardial toxicity in rats. *Br*
- 23 *J Pharmacol.* 1998 Jun;124(3):425–7.
- 24 69. Han S-S, Keum Y-S, Seo H-J, Surh Y-J. Curcumin suppresses activation of NF-kappaB
- 25 and AP-1 induced by phorbol ester in cultured human promyelocytic leukemia cells. *J*
- 26 *Biochem Mol Biol.* 2002 May 31;35(3):337–42.
- 27 70. Kang G, Kong P-J, Yuh Y-J, Lim S-Y, Yim S-V, Chun W, et al. Curcumin suppresses
- 28 lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression by inhibiting activator protein
- 29 1 and nuclear factor kappaB bindings in BV2 microglial cells. *J Pharmacol Sci.* 2004
- 30 Mar;94(3):325–8.
- 31 71. Plummer SM, Holloway KA, Manson MM, Munks RJ, Kaptein A, Farrow S, et al.
- 32 Inhibition of cyclo-oxygenase 2 expression in colon cells by the chemopreventive agent

- 1 curcumin involves inhibition of NF-kappaB activation via the NIK/IKK signalling
- 2 complex. *Oncogene*. 1999 Oct 26;18(44):6013–20.
- 3 72. Plummer SM, Hill KA, Festing MF, Steward WP, Gescher AJ, Sharma RA. Clinical
- 4 development of leukocyte cyclooxygenase 2 activity as a systemic biomarker for cancer
- 5 chemopreventive agents. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001
- 6 Dec;10(December):1295–9.
- 7 73. Ann-Li C, Hsu C-H, Lin J-K, Hsu M-M, Ho Y-F, Shen T-S, et al. Phase I Clinical Trial
- 8 of Curcumin, a Chemopreventive Agent, in Patients with High-risk or Pre-malignant
- 9 Lesions. *Anticancer Res*. 2001;21(NOVEMBER):2895–900.
- 10 74. Kawamori T, Lubet R, Steele VE, Kelloff GJ, Kaskey RB, Rao C V, et al.
- 11 Chemopreventive effect of curcumin, a naturally occurring anti-inflammatory agent,
- 12 during the promotion/progression stages of colon cancer. *Cancer Res*. 1999 Feb
- 13 1;59(3):597–601.
- 14 75. Rao C V, Rivenson A, Simi B, Reddy BS. Chemoprevention of Colon Carcinogenesis by
- 15 Dietary Curcumin, a Naturally Occurring Plant Phenolic Compound. *Cancer Res*. 1995
- 16 Jan 15;55(2):259–66.
- 17 76. Venkatraman M, Anto RJ, Nair A, Varghese M, Karunakaran D. Biological and
- 18 chemical inhibitors of NF-kB sensitize SiHa cells to cisplatin-induced apoptosis. *Mol*
- 19 *Carcinog*. 2005 Sep;44(1):51–9.
- 20 77. Bava S V., Puliappadamba VT, Deepti A, Nair A, Karunakaran D, Anto RJ.
- 21 Sensitization of taxol-induced apoptosis by curcumin involves down-regulation of
- 22 nuclear factor-??B and the serine/threonine kinase Akt and is independent of tubulin
- 23 polymerization. *J Biol Chem*. 2005 Feb 25;280(8):6301–8.
- 24 78. Sreekanth CN, Bava S V, Sreekumar E, Anto RJ. Molecular evidences for the
- 25 chemosensitizing efficacy of liposomal curcumin in paclitaxel chemotherapy in mouse
- 26 models of cervical cancer. *Oncogene*. 2011 Jul 14;30(28):3139–52.
- 27 79. Bava S V., Sreekanth CN, Thulasidasan AKT, Anto NP, Cheriyan VT, Puliappadamba
- 28 VT, et al. Akt is upstream and MAPKs are downstream of NF-kB in paclitaxel-induced
- 29 survival signaling events, which are down-regulated by curcumin contributing to their
- 30 synergism. *Int J Biochem Cell Biol*. 2011 Mar;43(3):331–41.
- 31 80. Carrillo D, Muñoz JP, Huerta H, Leal G, Corvalán A, León O, et al. Upregulation of PIR
- 32 gene expression induced by human papillomavirus E6 and E7 in epithelial oral and
- 33 cervical cells. *Open Biol*. 2017 Nov 8;7(11):170111.

- 1 81. Prusty BK, Das BC. Constitutive activation of transcription factor AP-1 in cervical
2 cancer and suppression of human papillomavirus (HPV) transcription and AP-1 activity
3 in HeLa cells by curcumin. *Int J Cancer*. 2005 Mar 1;113(6):951-60.
- 4 82. Divya CS, Pillai MR. Antitumor action of curcumin in human papillomavirus associated
5 cells involves downregulation of viral oncogenes, prevention of NFkB and AP-1
6 translocation, and modulation of apoptosis. *Mol Carcinog*. 2006 May;45(5):320-32.
- 7 83. Javvadi P, Hertan L, Kosoff R, Datta T, Kolev J, Mick R, et al. Thioredoxin reductase-1
8 mediates curcumin-induced radiosensitization of squamous carcinoma cells. *Cancer Res*.
9 2010 Mar 1;70(5):1941-50.
- 10 84. Nanjo F, Honda M, Okushio K, Matsumoto N, Ishigaki F, Ishigami T, et al. Effects of
11 dietary tea catechins on alpha-tocopherol levels, lipid peroxidation, and erythrocyte
12 deformability in rats fed on high palm oil and perilla oil diets. *Biol Pharm Bull*. 1993
13 Nov;16(February):1156-9.
- 14 85. Scott BC, Butler J, Halliwell B, Aruoma OI. Evaluation of the antioxidant actions of
15 ferulic acid and catechins. *Free Radic Res Commun*. 1993;19(4):241-53.
- 16 86. Fassina G, Venè R, Morini M, Minghelli S, Benelli R, Noonan DM, et al. Mechanisms
17 of Inhibition of Tumor Angiogenesis and Vascular Tumor Growth by Epigallocatechin-
18 3-Gallate. *Clin Cancer Res*. 2004 Jul 15;10(14):4865-73.
- 19 87. Haenen GRMM, Paquay JBG, Korthouwer REM, Bast A. Peroxynitrite scavenging by
20 flavonoids. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Jul 30;236(3):591-3.
- 21 88. Liang YC, Lin-Shiau SY, Chen CF, Lin JK. Inhibition of cyclin-dependent kinases 2 and
22 4 activities as well as induction of Cdk inhibitors p21 and p27 during growth arrest of
23 human breast carcinoma cells by (-)-epigallocatechin-3-gallate. *J Cell Biochem*. 1999
24 Oct 1;75(1):1-12.
- 25 89. Ahmad N, Cheng P, Mukhtar H. Cell cycle dysregulation by green tea polyphenol
26 epigallocatechin-3-gallate. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Aug 28;275(2):328-
27 34.
- 28 90. Kondo T, Ohta T, Igura K, Hara Y, Kaji K. Tea catechins inhibit angiogenesis in vitro,
29 measured by human endothelial cell growth, migration and tube formation, through
30 inhibition of VEGF receptor binding. *Cancer Lett*. 2002 Jun 28;180(2):139-44.
- 31 91. Nakagawa T, Yokozawa T. Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green
32 tea. *Food Chem Toxicol*. 2002 Dec;40(12):1745-50.

92. Baliga MS, Meleth S, Katiyar SK. Growth inhibitory and antimetastatic effect of green tea polyphenols on metastasis-specific mouse mammary carcinoma 4T1 cells in vitro and in vivo systems. *Clin Cancer Res*. 2005 Mar 1;11(5):1918-27.
93. Nihal M, Ahmad N, Mukhtar H, Wood GS. Anti-proliferative and proapoptotic effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on human melanoma: Possible implications for the chemoprevention of melanoma. *Int J Cancer*. 2005 Apr 20;114(4):513-21.
94. Qanungo S, Das M, Haldar S, Basu A. Epigallocatechin-3-gallate induces mitochondrial membrane depolarization and caspase-dependent apoptosis in pancreatic cancer cells. *Carcinogenesis*. 2005 May 1;26(5):958-67.
95. Ahn WS, Huh SW, Bae S-M, Lee IP, Lee JM, Namkoong SE, et al. A Major Constituent of Green Tea, EGCG, Inhibits the Growth of a Human Cervical Cancer Cell Line, CaSki Cells, through Apoptosis, G₁ Arrest, and Regulation of Gene Expression. *DNA Cell Biol*. 2003 Mar;22(3):217-24.
96. Asif Siddiqui F, Naim M, Islam N. Apoptotic effect of green tea polyphenol (EGCG) on cervical carcinoma cells. *Diagn Cytopathol*. 2011 Jul;39(7):482-8.
97. Hussain S. Comparative efficacy of epigallocatechin-3-gallate against H₂O₂-induced ROS in cervical cancer biopsies and HeLa cell lines. *Contemp Oncol (Poznan, Poland)*. 2017;21(3):209-12.
98. Noguchi M, Yokoyama M, Watanabe S, Uchiyama M, Nakao Y, Hara K, et al. Inhibitory effect of the tea polyphenol, (-)-epigallocatechin gallate, on growth of cervical adenocarcinoma cell lines. *Cancer Lett*. 2006 Mar 28;234(2):135-42.
99. Yokoyama M, Noguchi M, Nakao Y, Pater A, Iwasaka T. The tea polyphenol, (-)-epigallocatechin gallate effects on growth, apoptosis, and telomerase activity in cervical cell lines. *Gynecol Oncol*. 2004 Jan;92(1):197-204.
100. Zhang Q, Tang X, Lu Q, Zhang Z, Rao J, Le AD. Green tea extract and (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibit hypoxia- and serum-induced HIF-1A protein accumulation and VEGF expression in human cervical carcinoma and hepatoma cells. *Mol Cancer Ther*. 2006 May 1;5(5):1227-38.
101. Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seeram NP, Shishodia S, Takada Y. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: Preclinical and clinical studies. Vol. 24, *Anticancer Research*. 2004. p. 2783-840.
102. Kramer MP, Węsierska-Gądek J. Monitoring of Long-Term Effects of Resveratrol on Cell Cycle Progression of Human HeLa Cells after Administration of a Single Dose.

- 1
 - 2
 - 3
 - 4
 - 5
 - 6
 - 7
 - 8
 - 9
 - 10
 - 11
 - 12
 - 13
 - 14
 - 15
 - 16
 - 17
 - 18
 - 19
 - 20
 - 21
 - 22
 - 23
 - 24
 - 25
 - 26
 - 27
 - 28
 - 29
 - 30
 - 31
 - 32
 - 33
 - 34
 - 35
 - 36
 - 37
 - 38
 - 39
 - 40
 - 41
 - 42
 - 43
 - 44
 - 45
 - 46
 - 47
 - 48
 - 49
 - 50
 - 51
 - 52
 - 53
 - 54
 - 55
 - 56
 - 57
 - 58
 - 59
 - 60
- 1 Ann N Y Acad Sci. 2009 Aug;1171(1):257–63.
- 2 103. Harikumar KB, Aggarwal BB. Resveratrol: A multitargeted agent for age-associated
3 chronic diseases. Vol. 7, Cell Cycle. 2008. p. 1020–37.
- 4 104. Hsu KF, Wu CL, Huang SC, Wu CM, Hsiao JR, Yo Y Te, et al. Cathepsin L mediates
5 resveratrol-induced autophagy and apoptotic cell death in cervical cancer cells.
6 Autophagy. 2009 May;5(4):451–60.
- 7 105. Sexton E, Van Themsche C, LeBlanc K, Parent S, Lemoine P, Asselin E. Resveratrol
8 interferes with AKT activity and triggers apoptosis in human uterine cancer cells. Mol
9 Cancer. 2006 Oct 17;5:45.
- 10 106. Rezk YA, Balulad SS, Keller RS, Bennett JA. Use of Resveratrol to improve the
11 effectiveness of cisplatin and doxorubicin: Study in human gynecologic cancer cell lines
12 and in rodent heart. Am J Obstet Gynecol. 2006 May;194(5):e23–6.
- 13 107. Leekha A, Gurjar BS, Tyagi A, Rizvi MA, Verma AK. Vitamin C in synergism with
14 cisplatin induces cell death in cervical cancer cells through altered redox cycling and p53
15 upregulation. J Cancer Res Clin Oncol. 2016 Dec 9;142(12):2503–14.
- 16 108. MANE SD, THOH M, SHARMA D, SANDUR SK, NAIDU KA. Ascorbyl Stearate
17 Promotes Apoptosis Through Intrinsic Mitochondrial Pathway in HeLa Cancer Cells.
18 Anticancer Res. 2016 Dec 1;36(12):6409–18.
- 19 109. Hwang JH, Kim MK, Lee JK. Dietary Supplements Reduce the Risk of Cervical
20 Intraepithelial Neoplasia. Int J Gynecol Cancer. 2010 Apr;20(3):398–403.
- 21 110. Palan PR, Mikhail MS, Goldberg GL, Basu J, Runowicz CD, Romney SL. Plasma levels
22 of beta-carotene, lycopene, canthaxanthin, retinol, and alpha- and tau-tocopherol in
23 cervical intraepithelial neoplasia and cancer. Clin Cancer Res. 1996 Jan;2(1):181–5.
- 24 111. Palan PR, Mikhail MS, Shaban DW, Romney SL. Plasma concentrations of coenzyme
25 Q10 and tocopherols in cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. Eur J
26 Cancer Prev. 2003 Aug;12(4):321–6.
- 27 112. Srivastava A, Srivastava S, Natu S, Gupta A, Pal K, Singh U, et al. Lipid peroxidation
28 and antioxidants in different stages of cervical cancer: Prognostic significance. Indian J
29 Cancer. 2009;46(4):297.
- 30 113. Hu X, Li S, Zhou L, Zhao M, Zhu X. Effect of vitamin E supplementation on uterine
31 cervical neoplasm: A meta-analysis of case-control studies. Sun L-Z, editor. PLoS One.
32 2017 Aug 22;12(8):e0183395.

114. Palan PR, Woodall AL, Anderson PS, Mikhail MS. α -Tocopherol and α -tocopheryl quinone levels in cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *Am J Obstet Gynecol*. 2004 May;190(5):1407–10.
115. Castaldo SA, Freitas JR, Conchinha NV, Madureira PA. The Tumorigenic Roles of the Cellular REDOX Regulatory Systems. Vol. 2016, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016. p. 1–17.
116. Teppo H-R, Soini Y, Karihtala P. Reactive Oxygen Species-Mediated Mechanisms of Action of Targeted Cancer Therapy. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:1–11.
117. Jiao Y, Wang Y, Guo S, Wang G. Glutathione peroxidases as oncotargets. *Oncotarget*. 2017;8(45):80093–102.
118. Yang J, Zhao X, Tang M, Li L, Lei Y, Cheng P, et al. The role of ROS and subsequent DNA-damage response in PUMA-induced apoptosis of ovarian cancer cells. *Oncotarget*. 2017 Apr;8(14):23492–506.
119. Cruz-Gregorio A, Manzo-Merino J, González-García MC, Pedraza-Chaverri J, Medina-Campos ON, Valverde M, et al. Human Papillomavirus Types 16 and 18 Early-expressed Proteins Differentially Modulate the Cellular Redox State and DNA Damage. *Int J Biol Sci*. 2018;14(1):21–35.
120. Drozd E, Krzysztoń-Russjan J, Marczevska J, Drozd J, Bubko I, Bielak M, et al. Up-regulation of glutathione-related genes, enzyme activities and transport proteins in human cervical cancer cells treated with doxorubicin. *Biomed Pharmacother*. 2016 Oct;83:397–406.
121. Jaudan A, Sharma S, Malek SNA, Dixit A. Induction of apoptosis by pinostrobin in human cervical cancer cells: Possible mechanism of action. Hsieh Y-H, editor. *PLoS One*. 2018 Feb 8;13(2):e0191523.
122. YOU BR, SHIN HR, HAN BR, KIM SH, PARK WH. Auranofin induces apoptosis and necrosis in HeLa cells via oxidative stress and glutathione depletion. *Mol Med Rep*. 2015 Feb;11(2):1428–34.
123. Bonetta R. Potential Therapeutic Applications of MnSODs and SOD-Mimetics. *Chem - A Eur J*. 2017 Nov 12;24(20):5032–41.
124. Bauer S, Joensuu H. Emerging Agents for the Treatment of Advanced, Imatinib-Resistant Gastrointestinal Stromal Tumors: Current Status and Future Directions. *Drugs*. 2015 Aug 18;75(12):1323–34.

125. Brown C. Targeted therapy: An elusive cancer target. *Nature*. 2016 Sep 14;537(7620):S106–8.
126. Swain SM, Baselga J, Kim S-B, Ro J, Semiglazov V, Campone M, et al. Pertuzumab, Trastuzumab, and Docetaxel in HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2015 Feb 19;372(8):724–34.
127. Mendel DB, Laird AD, Xin X, Louie SG, Christensen JG, Li G, et al. In vivo antitumor activity of SU11248, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor receptors: determination of a pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship. *Clin Cancer Res*. 2003 Jan;9(1):327–37.
128. Suddek GM. Sunitinib improves chemotherapeutic efficacy and ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity in experimental animals. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011 May 22;67(5):1035–44.
129. Abdel-Aziz AK, Shouman S, El-Demerdash E, Elgendy M, Abdel-Naim AB. Chloroquine synergizes sunitinib cytotoxicity via modulating autophagic, apoptotic and angiogenic machineries. *Chem Biol Interact*. 2014 Jun 25;217:28–40.

Figure 1 legend:

Figure 1. Sources of ROS/RNS. Several factors such as environmental pollutants, chemicals, tobacco smoking, chronic inflammation, among others, generate reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS). Imbalance between oxidant species and antioxidant system results in DNA, RNA and protein damage which may lead to the accumulation of genetic alterations and promote malignant transformation.

Figure 1. Sources of ROS/RNS. Several factors such as environmental pollutants, chemicals, tobacco smoking, chronic inflammation, among others, generate reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS). Imbalance between oxidant species and antioxidant system results in DNA, RNA and protein damage which may lead to the accumulation of genetic alterations and promote malignant transformation.

338x190mm (96 x 96 DPI)

Anexo D

Revisão aceita para publicação à revista *Clinics* intitulada “Innate Immunity and HPV: friends or foes” – Gabriela Ávila Fernandes Silva (3ª autora)

ICESP - Innate Immunity and HPV: friends or foes

Journal:	CLINICS
Manuscript ID:	CLINICS-2017-0549.R1
Manuscript Type:	Review Article
Date Submitted by the Author:	18-Mar-2018
Complete List of Authors:	Nunes, Rafaela; Universidade de Sao Paulo Faculdade de Medicina Hospital das Clinicas Instituto do Cancer; Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Departamento de Radiologia e Oncologia Morale, Mirian; Universidade de Sao Paulo Faculdade de Medicina Hospital das Clinicas Instituto do Cancer; Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Departamento de Radiologia e Oncologia Silva, Gabriela; Universidade de Sao Paulo Faculdade de Medicina Hospital das Clinicas Instituto do Cancer; Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Departamento de Radiologia e Oncologia Villa, Luisa; Universidade de Sao Paulo Faculdade de Medicina Hospital das Clinicas Instituto do Cancer; Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Departamento de Radiologia e Oncologia Termini, Lara; Universidade de Sao Paulo Faculdade de Medicina Hospital das Clinicas Instituto do Cancer
Keyword - Click here to find your MeSH terms.:	Innate Immune System, Human papillomavirus, Cervical cancer

Innate Immunity and HPV: friends or foes

Rafaella Almeida Lima Nunes^{1,2}, Mirian Galliote Morale^{1,2}, Gabriela Ávila Fernandes Silva^{1,2}, Luisa Lina Villa^{1,2}, Lara Termini¹

¹Instituto do Cancer do Estado de Sao Paulo ICESP, Centro de Investigação Translacional em Oncologia, Hospital das Clinicas HC, Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo FMUSP, Av. Dr. Arnaldo 251, Sao Paulo, SP, CEP 01246-000, Brazil.

²Departamento de Radiologia e Oncologia, Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil.

Authors' Contributions:

Nunes, Rafaella A L: Contributed to: Abstract, Introduction, "HPV elimination and persistence", "Tumor progression: cervical cancer" and Conclusion. Revised and corrected all the text and references.

Silva, Gabriela A F: Contributed to: "HPV elimination and persistence" and "Tumor progression: cervical cancer".

Morale, Mirian G: Contributed to: "Prophylaxis and Treatment: Vaccines" and to organize references.

Villa, Luisa L: Prepared, revised and corrected all the text.

Termini, Lara: Prepared, revised and corrected all the text.

Abstract

Most HPV infections are readily cleared by the host immune response. However, in a fraction of individuals HPV can establish persistent infections. Persistence of high-risk HPV (Hr-HPV) is the major risk factor for cervical cancer development. These viruses developed mechanisms to evade the host immune system, an important step for persistence and, ultimately, tumor development. Several cells types, receptors, transcription factors and inflammatory mediators involved in antiviral immune response are targeted by the virus, contributing to tumorigenesis. These include antigens presenting cells (APCs), macrophages, natural killer cells (NK), toll-like receptors (TLRs), nuclear factor kappa B (NF- κ B) and several cytokines and chemokines such as interleukins (ILs), interferon (IFN) and tumor necrosis factor (TNF). In the present review, we address the main innate immune response mechanisms involved in HPV infection clearance as well as the viral strategies to warrant virus persistence that may contribute to cancer development. Finally, we discuss the possibility of exploiting this knowledge to develop effective therapeutic strategies.

Introduction

Human papillomavirus (HPV) are an important group of virus that infects cutaneous and mucosal epithelium. They are responsible for causing diseases associated with significant morbidity and mortality rates, including benign lesions and cancer (1). According to their potential to cause cancer, HPV can be divided into two groups: high- and low-risk types. Low-risk types, mainly represented by HPV 6 and 11, are associated with benign anogenital warts and, although not usually associated with cancer, may cause high morbidity related diseases. High-risk HPV (Hr-HPV), mainly represented by

16, 18, 31, 33, 35, 45 and minor types, are related to cancer and its precursor lesions, and their DNA sequences can be found in virtually all cervical tumors (2).

Cervical cancer is one of the most common cancers affecting women worldwide. Accordingly to the International Agency for Research on Cancer (IARC), the estimated number of new cases and deaths in 2012 were 527.600 and 265.700, respectively. The scenario is worse in less developed countries, where cervical cancer represented the second most common cancer in women, and was estimated to cause 230.200 of total number of deaths in the same year, largely due to less effective screening programs (3).

HPV may also be associated with other anogenital tumors, although in less proportion. It seems to be true in 60-90% of all vaginal and anal cancers (4,5). In regard to vagina and penile carcinomas, the virus can be found in 50% and 30-50% of the cases, respectively (4,6). In addition, HPV is also recognized as an etiologic cause of head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC), mainly associated with HPV16, responsible for 40-80% of oropharyngeal cancers in United States, varying accordingly alcohol and tobacco use, poor oral hygiene and genetics (7,8). In general, HPV positive vulvar and penile carcinomas, as well as oral squamous cell carcinomas, seem to have better prognosis when compared with HPV negative tumors (6,9).

Although most HPV infections are naturally eliminated, persistence of high-risk HPV is the major risk factor for cervical high-grade lesions and cancer development (10). To persist, virus developed mechanisms to evade the host immune system, and this is the first step that, together with its oncogenic potential, leads to cancer (11).

The purpose of this review is to address the main innate immune response mechanisms involved in HPV infection clearance, viral persistence and cancer development, as well as therapeutics possibilities.

HPV Elimination and Persistence

Several immunological factors are involved in HPV recognition and elimination, especially those related to innate immunity pathways, the first line of defense against infections. An efficient triggered immune response is a crucial point between viral clearance and persistence (12,13). As observed in tumors in general, an inappropriate release of pro-inflammatory mediators and a chronic inflammatory response may contribute to cancer development (Figure 1).

As well as innate immune system cells, keratinocytes, known as non-professional immune cells and also targets of HPV infection, present pattern recognition receptors (PRRs). These receptors are able to identify microbial pathogens or damage signals, known as pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) or damage-associated molecular patterns (DAMPs), respectively. Some examples are toll-like receptors (TLRs), nucleotide binding oligomerization domain-like receptors (NLRs), retinoic acid-inducible gene I-like receptors (RLRs) and cytosolic DNA sensors (14,15).

Nucleic acids, which can accumulate during viral replication, are some of microbial molecules recognized by PRRs (15). Previous studies showed that high expression of TLR3, 7, 8 and 9, that sense viral nucleic acids, is associated with HPV elimination and can be used as a predictor of clearance in HPV16 infected women. TLRs in combination with HPV16 E6 specific effector response showed a significant association with viral elimination (12,13). On the other hand, it has been shown that some types of Hr-HPV are capable of compromise innate immune response, not only decreasing the expression of some types of TLRs, but also impairing important pathways involving transcription factors as nuclear factor kappa B (NFkB) and interferon regulatory factor 3 (IRF3), that will be discussed below, contributing to viral immune evasion and persistence (16–18).

Polymorphisms in innate immunity genes related to HPV infection have been reported in the literature, especially involving infection sensors and interleukins (IL). Despite TLR9 has been recognized as a DNA sensor, its polymorphisms seem to have no association with viral clearance or persistence. However, polymorphisms in other innate immunity genes, such as interleukin-1 beta (IL-1 β), interleukin-18 (IL-18) and NLR1 and 3, showed an association with HPV infection and persistence (19,20). Other foreign DNA sensor, interferon gamma inducible protein 16 (IFI16), has been showed to be capable of control HPV18 replication and transcription through chromatin structure changes, reducing viral load and contributing to viral elimination (21).

Another antiviral mechanism involves the apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like (APOBEC) proteins family, responsible for editing viral genomes, which can inhibit HPV infection. Interestingly, prolonged APOBEC activation during HPV infection can also enhance genome mutagenesis, contributing to HPV related cancer progression (22).

HPV efficiency in infect and persist is associated to several mechanisms developed to evade the immune response. Between these, cytokines and chemokines modulation, downregulation of interferon (IFN) pathways, impairment of antigen presentation and reduction of adherence molecules can be mentioned, directed mainly by E6 and E7 oncoproteins (23). For example, Hr-HPV are able to inhibit cytokines production upon stimuli of the innate immune system by blocking NF κ B activation. Viral oncoproteins can increase the expression of interferon-related developmental regulator 1 (IFRD1), a protein responsible for recruiting histone deacetylase (HDAC) 1 and 3, leading NF- κ B deacetylation and inhibiting its ability to respond to immunological signals (17).

Also, to evade the host innate immunity, Hr-HPV can inhibit PRRs signaling through the induction of ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCHL1) expression, that blocks the activation of NF- κ B and IRF3, both transcription factors that induce pro-inflammatory cytokines and chemokines production (18). Additionally, Hr-HPV can downregulate inflammasome components and other downstream intermediaries of PRRs, such as IL-1 β network genes, compromising not only innate immunity, but the activation of an adaptive response, also mediated by this cytokine (24). Besides that, direct effect of HPV16 E6 has already been shown on IL-1 β through its interaction with and recruitment of E6AP ubiquitin-protein ligase, leading to cytokine degradation by the proteasome system (25).

Other HPV proteins can also have a role on immune escape, such as HPV16 E2, that can modulate the expression of 92 genes involved in innate immune response, including stimulator of interferon genes (STING), interferon kappa (IFN- κ) and interferon stimulated genes (ISGs) (26).

Impairment of IFN mediated response is another resource used by HPV to evade the immune system. Viral oncoproteins reduce IFN secretion by keratinocytes, impair the phosphorylation of IFN pathway intermediates and compromise signaling through interferon regulatory factors (IRFs). For example, there is a reduction of IRF1 expression in cervical tissues and cancer cell lines, as well as a reduced phosphorylation of IRF3 associated with Hr-HPV infection. It should be noted that IFN is an important component of innate immune response against virus (18,27,28).

Finally, it is important to emphasize that HPV can interfere with the migration and adhesion of innate immune cells, besides interfering in the cell phenotype definition. Regarding to that, antigen presenting cells (APCs), macrophages and natural killer cells (NK) can have their functions compromised by HPV infection (29-32).

Dendritic cells (DC), professional APCs that act inducing T-cell immune response, were found reduced in cervical intraepithelial neoplasia (CIN) (29). In addition, programmed death-ligand 1 (PD-L1), that interacts with programmed cell death protein 1 (PD-1) promoting T cell anergy, is more expressed in DC cells from Hr-HPV positive patients (33,34).

An inefficient innate immune response can contribute to HPV persistence. Indeed, persistence is a well-known cause of cell transformation and tumor progression initiated by HPV infection.

Tumor Progression: Cervical Cancer

In cervical cancer, Hr-HPV oncoproteins expression is essential for cell transformation, and HPV DNA integration into the host genome contributes to this (35,36). These oncoproteins, especially E6 and E7, induce continuous cell proliferation and prevent apoptosis, favoring the accumulation of mutations in the host genome due to the inhibition of pRb and p53 functions (36). However, viral oncoproteins do not only affect cell cycle regulatory mechanisms, but also have a negative impact on innate immune response (37). Together, viral persistence and accumulation of cellular alterations allow high-grade lesions development and tumor progression.

The immune system has a central role in determining HPV infection outcome and its components are important in both viral clearance and tumorigenesis (38,39), what is true not only in HPV related cancers. For example, macrophages present in solid tumor microenvironment, although can perform an antitumor function, may also play an important role in cancer progression. Its already known that tumor associated macrophages (TAMs) may promote cell proliferation, angiogenesis and immune defenses restriction (40). It can be explained by the identification of two macrophages

phenotypes: the M1 pro-inflammatory macrophages and M2 immunomodulatory macrophages. In order to help in tissue repair M2 macrophages present a profile that elicits an increased production of vascular endothelial growth factor (VEGF) and matrix metalloproteinase 9 (MMP9). However, when activated by tumor, these cells can induce basement membrane disruption, tumor growth, and metastasis (41–43).

M2 macrophages are linked to a pro-tumor response in many different ways. It is known that anti-tumor properties of M1 macrophages are mostly due to interleukin 12 (IL-12) dominant cytokine milieu they produce (44). When these immune cells assume a M2-like phenotype, they are not able to produce IL-12, a required cytokine to the activation of an anti-tumor response mediated by natural killer cells (NK), type 1 T helper cells (Th1) and cytotoxic T cells (CTLs). Instead, they produce interleukin 10 (IL-10), that induces type 2 T helper cell (Th2) polarization, stimulating M2 macrophages in a positive feedback through interleukin 4 (IL-4) production (44, 45). The immunoregulatory cytokine, transforming growth factor beta (TGF- β), are also linked to Th2 response, and its precursor form can be processed by TAMs in order to release the active molecule (46,47).

Another important mechanism that contributes to tumor expansion is Treg cells attraction by M2-derived C-C motif chemokine ligand 22 (CCL22). Once in tumor microenvironment, Treg activity is maintained by high local levels of IL-10, also induced by M2 macrophages as mentioned before. IL-10, at the same time, promotes differentiation of naive T cells to Tregs cells (45,48-50). TAMs PDL-1 can also directly induce T cell apoptosis after binding its receptor (51).

Finally, macrophages loss of antigen presenting capabilities is related to the down-regulation of class II major histocompatibility complex (class II MHC) in M2 cells (52,53). In fact, when cervical lesions progress, the number of macrophages

increases, and M2 macrophages are the main population in HPV-associated tumors (30,31).

It is known that NK cells are an important part of innate immune response against viral attack, and able to lyse cancer cells even without the need of tumor-antigens presentation (54). NK cell activation occurs through an interaction between triggering receptors such as NKp30, NKp44, NKp46 and natural killer group 2D (NKG2D) with tumor cell ligands, in a fine balance between inhibitory receptors and co-receptors (55). The loss of class I MHC in cervical cancer compromises the ability of tumor cells in presenting viral antigens to CTLs, but may turns tumor cell susceptible to NK cells. It was also recently reported that CD155, an activating NK cell receptor, is upregulated in squamous cervix carcinoma (56). However, other study showed that in high-grade squamous intraepithelial lesions (HSILs) and cervical cancer associated to HPV16 infection, the NK-activating receptors NKp30, NKp45 and NKG2D (only in cancer) are considerably decreased, what affects the cell cytolytic functionality, and may contributes to tumor progression (57).

Whereas acute inflammation can promote anti-tumor immunity in the cervix, chronic inflammation can be associated with a pro-tumor effect, partly through provision of growth factors for the tumor. It has been shown that inflammatory nitric oxide, COX, IL-1 β and tumor necrosis factor (TNF), when produced, enhances the HPV-mediated tumorigenesis (40,58-61). Actually, the resistance of Hr-HPV infected cells to the cytostatic or cytotoxic effect of some cytokines produced in a chronic inflammatory environment could be a key step for HPV associated tumor development.

In cervical cancer, the expression of cyclooxygenase 2 (COX-2), an enzyme involved in the production of pro-inflammatory prostaglandins, is upregulated (62). It was also demonstrated that COX-2 is induced by HPV16 E5 through NF- κ B and

activator protein-1 (AP-1) (63). Besides that, NF- κ B levels may be elevated in cervical cancer epithelial cells, being associated with a poor prognosis (64). Indeed, another study have shown an increase of NF- κ B activity by HPV16 E6 and E7 oncoproteins (65).

Previous studies showed that, despite anti-proliferative effect of TNF on primary and HPV16-immortalized keratinocytes, keratinocytes immortalized by HPV18 may be resistant to this effect (66,67). Besides that, genes associated to inflammatory responses, cell differentiation, cell death, proliferation, extracellular matrix remodeling and DNA repair were identified differentially expressed in HPV-immortalized keratinocytes that had differential response to the cytostatic effect of TNF (68). Altogether, these data support the notion that the acquisition of resistance to TNF by HPV-infected cells may represent an important step towards malignancy.

The complete understanding of immunological aspects of HPV infection and cervical cancer microenvironment, which includes host immunity components, HPV evasion and defense tactics and pro-tumor factors constitute an important step to the development of new preventive and therapeutic options.

Prophylaxis and Treatment: Vaccines

Considering the important role of innate immune response in inflammatory processes, many studies have been carried out using receptor agonists to improve the immune response in prophylactic and therapeutic vaccines against HPV related diseases (Table 1).

Indeed, there are three approved HPV vaccines, Gardasil, Gardasil-9 and Cervarix, the first two using only aluminum as adjuvant and the last one using also a LPS derivative that stimulates the innate immune system, activating TLR4 and helping

to promote HPV-infected cells death by the activation of dendritic cells (DCs) and NK cells (69). Despite Cervarix induces higher levels of neutralizing antibodies, there is no evidence of its being more effective than Gardasil (70-72).

In previous studies, lipopeptides acting through TLR2 were used to stimulate cytotoxic T response against HPV associated tumors. Although useful in a prophylactic model, it was not able to inhibit tumor growth efficiently in a therapeutic context. The authors suggest that depletion of immunosuppressive factors could improve therapeutic effects of the vaccine (73). In another therapeutic vaccine model, the use of a TLR3 agonist in a complex with an E7 peptide, demonstrated a more potent antitumor effect, inducing a strong specific cytotoxic T lymphocyte response (74).

Interestingly, using a DNA vector containing virus-like particle sequence fused to a non-oncogenic mutated E7, the results obtained in mice demonstrated an effect on established tumors only when the vaccine was combined with TLR7 and TLR9 agonists (75). In addition, adding TLR3 and TLR7 agonists in a DNA vaccine containing HPV16 E7 sequence, promoted significant tumor regression on mice (76). Furthermore, the topical application of imiquimod (TLR7 activator) associated with an intramuscular administration of a DNA vector containing HPV16 E7 fused to calreticulin, increased recruitment of CD8⁺ T cells in genital tract on an orthotopic HPV16 E6/E7 syngeneic tumor (77).

The use of flagellin as an adjuvant to induce a strong specific immune response through TLR5 activation was also a studied alternative. When tested mixed with an intranasal antitumor vaccine, flagellin induced a cytotoxic response and conferred protection on mice challenged with HPV transformed cells (78).

Additionally, high mobility group box 1 (HMGB1) protein is related to innate immunity, activating TLR2/4 or receptor for advanced glycation end products (RAGE),

being capable to promote T cell activation. Moreover, a HMGB1 peptide showed adjuvant properties in a mouse model in a combined administration with an E7 antigen. The data showed a high level of protection on prophylactic and therapeutic assays and activation of Th1 cellular immune response and IFN- γ release (79).

Apart from the agonists used on prophylactic vaccines, there is no other use on vaccines approved for current use on clinic for therapeutic purpose against HPV positive tumors. Nevertheless, its potential must be investigated since there is still a long way to go to establish an efficient therapeutic option.

Conclusion

Persistent HPV infection is associated to the modulation of immune cells, receptors, transcription factors, cytokines, chemokines and other immune mediators. These factors have a crucial role in inducing an effective immune response against the virus. Moreover, HPV has developed several mechanisms to evade or down-regulate innate immune response, including PRRs response modulation, antiviral molecules inhibition and transcription blockage of genes associated to immune response. In addition, during HPV-associated tumor development, innate immune cells can contribute to its establishment and progression. Regarding the important role of innate immune response in inflammatory processes and tumorigenesis, it is still relevant to invest in studies that use this system as a target to provide better prophylaxis results against HPV infection and to elicit efficient therapeutic responses in HPV related tumors.

References

1. zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology*. 2009;384:260–5.
2. Stanley MAA, Pett MRR, Coleman N. HPV: from infection to cancer. *Biochem Soc Trans*. 2007 Dec 1;35(Pt 6):1456–60.
3. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase. No. 11. Vol. 11, Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2013. p. <http://globocan.iarc.fr>.
4. Madsen BS, Jensen HL, van den Brule AJC, Wohlfahrt J, Frisch M. Risk factors for invasive squamous cell carcinoma of the vulva and vagina—Population-based case-control study in Denmark. *Int J Cancer*. 2008 Jun 15;122(12):2827–34.
5. Frisch M, Biggar RJ. Aetiological parallel between tonsillar and anogenital squamous-cell carcinomas. *Lancet*. Elsevier; 1999 Oct 23;354(9188):1442–3.
6. Lont AP, Kroon BK, Horenblas S, Gallee MPW, Berkhof J, Meijer CJLM, et al. Presence of high-risk human papillomavirus DNA in penile carcinoma predicts favorable outcome in survival. *Int J Cancer*. 2006 Sep 1;119(5):1078–81.
7. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, et al. Case-Control Study of Human Papillomavirus and Oropharyngeal Cancer. *N Engl J Med*. Massachusetts Medical Society; 2007 May 10;356(19):1944–56.
8. Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA. HPV-associated head and neck cancer: A virus-related cancer epidemic. *The Lancet Oncology*. 2010;11:781–9.
9. Psyrri A, DiMaio D. Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer. *Nat Clin Pract Oncol*. 2008 Jan;5(1):24–31.
10. Liaw KL, Hildesheim A, Burk RD, Gravitt P, Wacholder S, Manos MM, et al. A prospective study of human papillomavirus (HPV) type 16 DNA detection by polymerase chain reaction and its association with acquisition and persistence of other HPV types. *J Infect Dis*. 2001 Jan 1;183(1):8–15.
11. Christensen ND. HPV disease transmission protection and control. *Microb Cell Shared Science Publishers*; 2016 Sep 5;3(9):475–89.
12. Daud II, Scott ME, Ma Y, Shiboski S, Farhat S, Moscicki AB, et al. Association between toll-like receptor expression and human papillomavirus type 16 persistence. *Int J Cancer*. 2011;128(4):879–86.
13. Scott ME, Ma Y, Farhat S, Moscicki AB. Expression of nucleic acid-sensing Toll-like receptors predicts HPV16 clearance associated with an E6-directed cell-mediated response. *Int J Cancer*. 2015 May 15;136(10):2402–8.
14. Thompson MR, Kaminski JJ, Kurt-Jones EA, Fitzgerald KA. Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection. *Viruses*. 2011;3:920–40.
15. Jo E-K, Kim JK, Shin D-M, Sasakawa C. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. *Cell Mol Immunol*. 2016 Mar 9;13(2):148–59.

16. Hasan UA, Bates E, Takeshita F, Biliato A, Accardi R, Bouvard V, et al. TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. *J Immunol.* 2007;178(5):3186–97.
17. Tummers B, Goedemans R, Pelascini LPL, Jordanova ES, van Esch EMG, Meyers C, et al. The interferon-related developmental regulator 1 is used by human papillomavirus to suppress NFκB activation. *Nat Commun.* 2015 Mar 13;6:6537.
18. Karim R, Tummers B, Meyers C, Biryukov JL, Alam S, Backendorf C, et al. Human Papillomavirus (HPV) Upregulates the Cellular Deubiquitinase UCHL1 to Suppress the Keratinocyte's Innate Immune Response. Hiscott J, editor. *PLoS Pathog.* 2013 May 23;9(5):e1003384.
19. Oliveira LB, Louvanto K, Ramanakumar A V, Franco EL, Villa LL. Polymorphism in the promoter region of the Toll-like receptor 9 gene and cervical human papillomavirus infection. *J Gen Virol.* 2013;94(Pt 8):1858–64.
20. Pontillo A, Bricher P, Leal VNC, Lima S, Souza PRE, Crovella S. Role of inflammasome genetics in susceptibility to HPV infection and cervical cancer development. *J Med Virol.* 2016 Sep;88(9):1646–51.
21. Lo Cigno I, De Andrea M, Borgogna C, Albertini S, Landini MM, Peretti A, et al. The Nuclear DNA Sensor IFI16 Acts as a Restriction Factor for Human Papillomavirus Replication through Epigenetic Modifications of the Viral Promoters. Ross SR, editor. *J Virol.* 2015 Aug 1;89(15):7506–20.
22. Warren C, Westrich J, Doorslaer K, Pyeon D. Roles of APOBEC3A and APOBEC3B in Human Papillomavirus Infection and Disease Progression. *Viruses.* 2017 Aug 21;9(8):233.
23. Kanodia S, Fahey L, Kast WM. Mechanisms Used by Human Papillomaviruses to Escape the Host Immune Response. *Curr Cancer Drug Targets.* 2007 Feb;7(1):79–89.
24. Karim R, Meyers C, Backendorf C, Ludigs K, Offringa R, van Ommen GJB, et al. Human papillomavirus deregulates the response of a cellular network comprising of chemotactic and proinflammatory genes. Jin D-Y, editor. *PLoS One.* 2011 Mar 14;6(3):e17848.
25. Niebler M, Qian X, Höfler D, Kogosov V, Kaewprag J, Kaufmann AM, et al. Post-Translational Control of IL-1β via the Human Papillomavirus Type 16 E6 Oncoprotein: A Novel Mechanism of Innate Immune Escape Mediated by the E3-Ubiquitin Ligase E6-AP and p53. Gack MU, editor. *PLoS Pathog.* 2013 Aug 1;9(8):e1003536.
26. Sunthamala N, Thierry F, Teissier S, Pientong C, Kongyingyoes B, Tangsiriwatthana T, et al. E2 proteins of high risk human papillomaviruses down-modulate STING and IFN-κ transcription in keratinocytes. Zhang L, editor. *PLoS One.* 2014 Mar 10;9(3):e91473.
27. Le Bon A, Tough DF. Links between innate and adaptive immunity via type I interferon. *Curr Opin in Immunol.* 2002;14: 432–6.
28. Um S-J, Rhyu J-W, Kim E-J, Jeon K-C, Hwang E-S, Park J-S. Abrogation of

42. Quatromoni JG, Eruslanov E. Tumor-associated macrophages: function, phenotype, and link to prognosis in human lung cancer. *Am J Transl Res*. 2012;4(4):376–89.
43. Tang X, Mo C, Wang Y, Wei D, Xiao H. Anti-tumour strategies aiming to target tumour-associated macrophages. *Immunology*. 2013 Feb;138(2):93–104.
44. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol*. 2012 Mar 22;12(4):253–68.
45. DeNardo DG, Barreto JB, Andreu P, Vazquez L, Tawfik D, Kolhatkar N, et al. CD4+ T Cells Regulate Pulmonary Metastasis of Mammary Carcinomas by Enhancing Protumor Properties of Macrophages. *Cancer Cell*. 2009 Aug 4;16(2):91–102.
46. Quatromoni JG, Wang Y, Vo DD, Morris LF, Jazirehi AR, McBride W, et al. T cell receptor (TCR)-transgenic CD8 lymphocytes rendered insensitive to transforming growth factor beta (TGFβ) signaling mediate superior tumor regression in an animal model of adoptive cell therapy. *J Transl Med*. 2012 Jun 19;10(1):127.
47. Chong H, Vodovotz Y, Cox GW, Barcellos-Hoff MH. Immunocytochemical localization of latent transforming growth factor-beta1 activation by stimulated macrophages. *J Cell Physiol*. 1999 Mar;178(3):275–83.
48. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*. 2004 Sep 22;10(9):942–9.
49. Murai M, Turovskaya O, Kim G, Madan R, Karp CL, Cheroutre H, et al. Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nat Immunol*. 2009 Nov 27;10(11):1178–84.
50. Bolpetti A, Silva JS, Villa LL, Lepique AP. Interleukin-10 production by tumor infiltrating macrophages plays a role in Human Papillomavirus 16 tumor growth. *BMC Immunol*. 2010 Jun 7;11(1):27.
51. Kuang D-M, Zhao Q, Peng C, Xu J, Zhang J-P, Wu C, et al. Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1. *J Exp Med*. 2009 Jun 8;206(6):1327–37.
52. Eruslanov E, Daurkin I, Ortiz J, Vieweg J, Kusmartsev S. Pivotal Advance: Tumor-mediated induction of myeloid-derived suppressor cells and M2-polarized macrophages by altering intracellular PGE2 catabolism in myeloid cells. *J Leukoc Biol*. 2010 Nov 1;88(5):839–48.
53. Heusinkveld M, de Vos van Steenwijk PJ, Goedemans R, Ramwadhoebe TH, Gorter A, Welters MJP, et al. M2 macrophages induced by prostaglandin E2 and IL-6 from cervical carcinoma are switched to activated M1 macrophages by CD4+ Th1 cells. *J Immunol*. 2011 Aug 1;187(3):1157–65.
54. Lanier LL. Evolutionary struggles between NK cells and viruses. *Nat Rev Immunol*. 2008 Apr 14;8(4):259–68.

55. Moretta L, Bottino C, Pende D, Castriconi R, Mingari MC, Moretta A. Seminars in Immunology. 2006 Jun;18(3):151–8.
56. Textor S, Dürst M, Jansen L, Accardi R, Tommasino M, Trunk MJ, et al. Activating NK cell receptor ligands are differentially expressed during progression to cervical cancer. *Int J Cancer*. 2008 Nov 15;123(10):2343–53.
57. Garcia-Iglesias T, del Toro-Arreola A, Albarran-Somoza B, del Toro-Arreola S, Sanchez-Hernandez PE, Ramirez-Dueñas MG, et al. Low NKp30, NKp46 and NKG2D expression and reduced cytotoxic activity on NK cells in cervical cancer and precursor lesions. *BMC Cancer*. 2009 Jun 16;9(1):186.
58. Woodworth CD, McMullin E, Iglesias M, Plowman GD. Interleukin-1-Alpha and Tumor-Necrosis-Factor-Alpha Stimulate Autocrine Amphiregulin Expression and Proliferation of Human Papillomavirus-Immortalized and Carcinoma-Derived Cervical Epithelial-Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Mar 28;92(7):2840–4.
59. Young JL, Jazaeri AA, Darus CJ, Modesitt SC. Cyclooxygenase-2 in cervical neoplasia: A review. *Gynecologic Oncology*. 2008;109:140–5.
60. Sappayatosok K, Maneerat Y, Swasdison S, Viriyavejakul P, Dhanuthai K, Zwang J, et al. Expression of pro-inflammatory protein, iNOS, VEGF and COX-2 in Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC), relationship with angiogenesis and their clinico-pathological correlation. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2009 Jul 1;14(7):E319-24.
61. Wei L, Gravitt PE, Song H, Maldonado AM, Ozbun MA. Nitric oxide induces early viral transcription coincident with increased DNA damage and mutation rates in human papillomavirus-infected cells. *Cancer Res*. 2009 Jun 1;69(11):4878–84.
62. Khunamornpong S, Settakorn J, Sukpan K, Srisomboon J, Ruangvejvorachai P, Thormer PS, et al. Cyclooxygenase-2 expression in squamous cell carcinoma of the uterine cervix is associated with lymph node metastasis. *Gynecol Oncol*. 2009 Jan;112(1):241–7.
63. Kim Su-Hyeong, Oh Jung-Min, No Jae-Hong, Bang Yung-Jue, Juhnn Yong-Sung, Song Yong-Sang. Involvement of NF- κ B and AP-1 in COX-2 upregulation by human papillomavirus 16 E5 oncoprotein. *Carcinogenesis*. 2009 Mar 25;30(5):753–7.
64. Beglin M, Melar-New M, Laimins L. Human Papillomaviruses and the Interferon Response. *J Interf Cytokine Res*. 2009 Sep;29(9):629–35.
65. Textor S, Accardi R, Havlova T, Hussain I, Sylla BS, Gissmann L, et al. NF- κ B-dependent upregulation of ICAM-1 by HPV16-E6/E7 facilitates NK cell/target cell interaction. *Int J cancer*. 2011 Mar 1;128(5):1104–13.
66. 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(1):5–9.
67. Boccardo E, Noya F, Broker TR, Chow LT, Villa LL. HPV-18 confers resistance to TNF-alpha in organotypic cultures of human keratinocytes. *Virology*.

- Academic Press; 2004 Oct 25;328(2):233–43.
68. Termini L, Boccardo E, Esteves GH, Hirata R, Martins WK, Colo AEL, et al. Characterization of global transcription profile of normal and HPV-immortalized keratinocytes and their response to TNF treatment. *BMC Med Genomics*. BioMed Central; 2008 Jun 27;1(1):29.
 69. Van Den Bergh MJM, Guerti K, Willemen Y, Lion E, Cools N, Goossens H, et al. HPV vaccine stimulates cytotoxic activity of killer dendritic cells and natural killer cells against HPV-positive tumour cells. *J Cell Mol Med*. 2014;18(7):1372–80.
 70. Zurek Munk-Madsen M, Toft L, Kube T, Richter R, Ostergaard L, Søgaard OS, et al. Cellular immunogenicity of human papillomavirus vaccines Cervarix and Gardasil in adults with HIV infection. *Hum Vaccin Immunother*. 2017 Nov 27;1–8.
 71. Einstein MH, Baron M, Levin MJ, Chatterjee A, Edwards RP, Zepp F, et al. Comparison of the immunogenicity and safety of CervarixTM and Gardasil[®] human papillomavirus (HPV) cervical cancer vaccines in healthy women aged 18–45 years. *Hum Vaccin*. 2009 Oct;5(10):705–19.
 72. Haghsheenas MR, Mousavi T, Kheradmand M, Afshari M, Moosazadeh M. Efficacy of human papillomavirus L1 protein vaccines (cervarix and gardasil) in reducing the risk of cervical intraepithelial neoplasia: A meta-analysis. *Int J Prev Med*. 2017 Jun 1;8:44.
 73. Shen KY, Song YC, Chen IH, Chong P, Liu SJ. Depletion of tumor-associated macrophages enhances the anti-tumor immunity induced by a Toll-like receptor agonist-conjugated peptide. *Hum Vaccin Immunother*. 2014;10(11):3241–50.
 74. Chen S, Ou R, Tang J, Deng X, Wu Y, van Velkinburgh JC, et al. Enhanced anti-tumor effects of HPV16E7(49–57)-based vaccine by combined immunization with poly(I:C) and oxygen-regulated protein 150. *Cancer Epidemiol*. 2013;37(2):172–8.
 75. Lescaille G, Pitoiset F, Macedo R, Baillou C, Huret C, Klätzmann D, et al. Efficacy of DNA vaccines forming e7 recombinant retroviral virus-like particles for the treatment of human papillomavirus-induced cancers. *Hum Gene Ther*. 2013;24(5):533–44.
 76. Sajadian A, Tabarraei A, Soleimanjahi H, Fotouhi F, Gorji A, Ghaemi A. Comparing the effect of Toll-like receptor agonist adjuvants on the efficiency of a DNA vaccine. *Arch Virol*. 2014;159(8):1951–60.
 77. Soong RS, Song L, Trieu J, Knoff J, He L, Tsai YC, et al. Toll like receptor agonist imiquimod facilitates antigen-specific CD8⁺ T cell accumulation in the genital tract leading to tumor control through interferon-gamma. *Clin Cancer Res*. 2014 Nov 1;20(21):5456–67.
 78. Nguyen CT, Hong SH, Ung TT, Verma V, Kim SY, Rhee JH, et al. Intranasal immunization with a flagellin-adjuvanted peptide anticancer vaccine prevents tumor development by enhancing specific cytotoxic T lymphocyte response in a mouse model. *Clin Exp Vaccine Res*. 2013;2(2):128–34.

79. Talebi S, Bolhassani A, Sadat SM, Vahabpour R, Agi E, Shahbazi S. Hp91 immunoadjuvant: An HMGB1-derived peptide for development of therapeutic HPV vaccines. *Biomed Pharmacother*. 2017 Jan 1;85:148–54.

Figure 1- Several stimuli, including HPV infection, can trigger the release of inflammatory mediators. Different balance between these mediators may favor tumor suppression or tumor promotion. PAMPs: pathogen-associated molecular pattern molecules; DAMPs: damage-associated molecular pattern molecules.

For Review Only

Figure 1- Several stimuli, including HPV infection, can trigger the release of inflammatory mediators. Different balance between these mediators may favor tumor suppression or tumor promotion. PAMPs: pathogen-associated molecular pattern molecules; DAMPs: damage-associated molecular pattern molecules.

338x190mm (96 x 96 DPI)

Anexo E

Gabriela Ávila Fernandes Silva - Pesquisadora associada no projeto: Eficácia da auto-coleta cervicovaginal no rastreamento do câncer do colo do útero (FAPESP processo # 2016/16847-0).

Identificação do Processo	Dados Gerais do Projeto	R\$ / US\$	Documentos	Observações / Manifestações
Grupo de Financiamento	Auxílio à Pesquisa			
Linha de Fomento	Programas Regulares / Auxílios a Pesquisa / Projeto de Pesquisa / Projeto de Pesquisa - Regular / Fluxo Contínuo			
Beneficiário	Jose Maria Soares Junior			
Responsável	Jose Maria Soares Junior			
Data de Início	01/05/2017	Duração	24 mês(es)	
Vínculo Institucional do Processo	Instituição de Pesquisa/Empresa:		Faculdade de Medicina/FM/USP	
	Departamento:		Obstetrícia e Ginecologia	
Data de abertura	19/08/2016			
Categoria de pesquisa	Pesquisa Básica com objetivo principal de avançar o conhecimento fundamental, mas cujos resultados têm potencial de aplicação Tecnológica.			

Modelo Formulário: Projeto de Pesquisa

Identificação do Processo	Dados Gerais do Projeto	R\$ / US\$	Documentos	Observações / Manifestações
Identificação	Instituições	Pessoas Envolvidas	Resumo / Descrição	
Equipe				
Nome	Função	Horas Semanais Dedicadas ao Projeto	Vigência	Vínculo Principal
Jose Maria Soares Junior	Pesquisador Responsável *	20	01/05/2017 a 30/04/2019	Faculdade de Medicina/FM/USP
Carla Cristina Maganhin	Pesquisador Associado	10	01/05/2017 a 30/04/2019	
Edmund Chada Baracat	Pesquisador Associado	10	01/05/2017 a 30/04/2019	Faculdade de Medicina/FM/USP
Gabriela Ávila Fernandes Silva	Pesquisador Associado	10	01/05/2017 a 30/04/2019	Instituto do Câncer do Estado de São Paulo/ICESP/SSSP
Lara Termini	Pesquisador Associado	20	01/05/2017 a 30/04/2019	Instituto do Câncer do Estado de São Paulo/ICESP/SSSP
Maricy Tacla Alves Barbosa	Pesquisador Associado	10	01/05/2017 a 30/04/2019	Hospital das Clínicas de São Paulo/HC/SSSP
Noely Paula Cristina Lorenzi	Pesquisador Associado	20	01/05/2017 a 30/04/2019	Hospital Universitário/HU/USP
Rafaella Almeida Lima Nunes	Pesquisador Associado	10	01/05/2017 a 30/04/2019	
Adhemar Longatto Filho	Apoio Técnico	8	01/05/2017 a 30/04/2019	Faculdade de Medicina/FM/USP

* Com Benefício Complementar