JIMENA PAOLA HOCHMANN VALLS

**Análise do impacto das proteínas E6/E7 de diferentes variantes
moleculares de HPV-16 sobre as vias de transdução de sinal mediadas
por MAPK**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Oncologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Laura Sichero Vettorazzo

São Paulo

2016

JIMENA PAOLA HOCHMANN VALLS

**Análise do impacto das proteínas E6/E7 de diferentes variantes
moleculares de HPV-16 sobre as vias de transdução de sinal mediadas
por MAPK**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Oncologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Laura Sichero Vettorazzo

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Hochmann Valls, Jimena Paola

Análise do impacto das proteínas E6/E7 de diferentes variantes moleculares de HPV-16 sobre as vias de transdução de sinal mediadas por MAPK / Jimena Paola Hochmann Valls. -- São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Oncologia.

Orientadora: Laura Cristina Sichero Vettorazzo.

Descritores: 1.Papillomaviridae 2.Papillomavirus humano 16 3.Proteínas quinases ativadas por mitógeno 4.Fosfatidilinositol 3-quinases 5.Heterogeneidade genética 6.Migração celular 7.Transformação celular viral

USP/FM/DBD-180/16

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho,

À meus pais, por o incentivo e apoio desde a distancia, especialmente a mama, por seu apoio incondicional, e por me transmitir os valores mais importantes da vida, humildade, honestidade, amizade, e estar sempre todos os dias me apoiando de longe e aconselhando-me sempre o melhor.

Aos meus adorados irmãos, Mati e Agus, por entenderam minha ausência e me apoiarem sempre nessa carreira longa, me dando todo seu carinho.

À minha querida avó Aba, por me brindar amor sempre a distância e ser um suporte importante na minha vida.

Meus eternos agradecimentos e carinho a vocês!

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos primeiramente à **Profa. Dra. Laura Sichero**, por me orientar, pela amizade ao longo destes anos, e pela oportunidade de poder trabalhar no seu laboratório, e me transmitir essa paixão pelo estudo das variantes do HPV-16, que tanto adoro, me deu muito prazer em trabalhar com você!

Ao **João Simão Sobrinho** pela amizade, companheirismo e pela imensa ajuda com os Westerns Blots ao longo do meu trabalho.

À **Neide** pela amizade, apoio, e inúmeros cafés, com certeza foi bem mais divertido meus momentos aqui em São Paulo.

À todo meu grupo tão querido de Biologia Molecular, CMN, e ICB **Lucas, Emily, Ema, Lanre, Rafa, Ricardo, Mirian, Walason** meus eternos agradecimentos pelo apoio, abraço amigo, brincadeiras, com certeza foi mais divertido compartilhar esses anos com vocês.

À minha amiga **Naty**, muito obrigada por sua amizade e apoio incondicional sempre, com você com certeza tudo foi melhor aqui.

Aos meus amigos do complexo CTO, **Nai, Liz, Carol, Angelica, Maira, Maria, Tharcisio**, obrigada por compartilharem conversas, risos e tristezas, culto de sexta, é um prazer ter a amizade de vocês.

Às minhas amigas da vida, **Xime B, Xime C, Ana, Vicky, Vane, Lau, Majo, Flor**, pela amizade de tantos anos, por me apoiar em todo momento, tanto nos momentos felizes e em aqueles não tão felizes.

À **Profa. Dra. Luisa Villa**, por me transmitir todo esse conhecimento acerca do HPV com tanta sabedoria e humildade. Meus eternos agradecimentos.

Ao **Prof. Dr. Roger Chammas**, pela oportunidade que me brindou de poder fazer meu doutorado no melhor Instituto do Câncer que poderia estar. Sempre estarei eternamente agradecida à você.

Ao **Prof. Dr. Enrique Boccardo** pela ajuda com as discussões científicas.

À **todo o CTO** pela amizade de todos vocês, companherismo eterno, e as grandes discussões científicas.

Ao **CTO**, por fornecerem apoio burocrático, a **Lara e Taynah** pela ajuda burocrática com a prestação de contas da FAPESP, ao pessoal de lavagem de materiais e reuniões científicas, que possibilitaram a realização deste trabalho. Muito obrigada aprendi muito com vocês.

À **Universidade de São Paulo**, era um sonho fazer parte dessa estrutura e levar esse nome na minha formação.

Às agências de fomento **FAPESP** (processos n°: 2013/01538-4 e 12/16283-9), e à **CAPES** pelo apoio financeiro.

Por todas as experiências vividas, tudo já valeria a pena, obrigada a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“La utopía está en el horizonte. Camino dos pasos, ella se aleja dos pasos y el horizonte se corre diez pasos más allá. ¿Entonces para que sirve la utopía? Para eso, sirve para caminar.”

Eduardo Galeano

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

Esta 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*.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RESUMO

ABSTRACT

CAPITULO I

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O papilomavírus humano	2
1.2. Estrutura do HPV	3
1.3. Proteínas virais	4
1.4. Ciclo de vida do HPV	10
1.5. Epidemiologia e transmissão do HPV	12
1.6. Taxonomia e evolução do HPV	14
1.7. Diferenças no potencial oncogênico entre as variantes moleculares de HPV-16	17
1.8. Vias de sinalização celular	20
1.8a. Vias de sinalização celular mediadas por MAPK	20
1.8b. Via de sinalização celular mediada por de PI3K/AKT	22
2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA	24
2.1. Objetivos específicos	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1. Construção e cultivo das linhagens celulares	28
3.2. <i>Western blot</i>	30
3.3. Microarranjo de anticorpos	32
3.4. Imunofluorescência	32
3.5. Atividade dos fatores de transcrição	33
3.6. Ensaio de proliferação celular	34
3.7. Ensaio de crescimento independente de ancoragem	34
3.8. Ensaio de migração celular	35
3.9. Ensaio de invasão celular	35

3.10. Análises estatísticas	36
3.11. Considerações éticas	36
4. RESULTADOS	37
4.1. Caracterização dos queratinócitos imortalizados por diferentes variantes de HPV-16	38
4.2. Análise dos níveis de ativação de proteínas da via de sinalização MAPK-ERK em queratinócitos imortalizados por diferentes variantes de HPV-16	41
4.3. Análise dos níveis de ativação de proteínas das vias de sinalização mediadas por MAPK-p38, JNK, e PI3K/AKT em queratinócitos imortalizados por diferentes variantes moleculares de HPV-16	44
4.4. Análise dos níveis de β -catenina nos queratinócitos imortalizados por diferentes variantes moleculares de HPV-16	46
4.5. Análise dos níveis de ativação de fatores de transcrição em queratinócitos imortalizados por diferentes variantes de HPV-16	50
4.6. Análise de processos celulares importantes para a carcinogênese em queratinócitos imortalizados por diferentes variantes de HPV-16	53
4.6a. Proliferação celular	53
4.6b. Migração celular	54
4.6c. Potencial transformante	56
4.6d. Invasão celular	57
4.6e. Transição epitélio-mesenquima	57
4.7. Impacto da inibição da via MAPK-ERK sobre a capacidade de migração celular	59
5. DISCUSSÃO	61
6. CONCLUSÕES	73

CAPITULO II

1. INTRODUÇÃO	75
2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA	79
2.1. Objetivos específicos	80
3. MATERIAS E MÉTODOS	81
3.1. Vetor lentiviral e transdução de c-MYC	82
3.2. PCR em tempo Real	83
3.3. <i>Western blot</i>	84
3.4. Ensaio de proliferação celular	85
3.5. Ensaio de migração celular	85
3.6. Ensaio de crescimento independente de ancoragem	86

3.7. Ensaio de invasão	86
3.8. Análise estatística	86
4. RESULTADOS	87
4.1. Caracterização dos queratinócitos imortalizados pelas variantes AA e E-350G de HPV-16 co-transduzidos com c-MYC	88
4.2. Análises dos níveis de ativação de proteínas efetoras da via de MAPK nos queratinócitos imortalizados pelas variantes AA e E-350G de HPV-16 co-transduzidos com c-MYC	90
4.3. Análise de processos celulares importantes para a carcinogênese em queratinócitos imortalizados pelas variantes AA e E-350G de HPV-16 co-transduzidos com c-MYC	91
4.3a. Proliferação celular	91
4.3b. Migração celular	92
4.3c. Crescimento independente de ancoragem	93
4.3d. Invasão celular	94
5. DISCUSSÃO	96
6. CONCLUSÕES	99
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
8. ANEXOS	117
ANEXO 1. Comprovante do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Protocolo de Pesquisa N 248/13	118
ANEXO 2. Manuscrito - Hochmann <i>et al.</i> , 2016.	120

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Organização genômica do HPV.	4
Figura 2. Interações entre as oncoproteínas E6 e E7 de HPVs de alto risco oncogênico e proteínas celulares.	8
Figura 3. Ciclo de vida do HPV.	12
Figura 4. Árvore filogenética de HPV-16.	15
Figura 5. Representação esquemática das vias de sinalização mediadas por MAPK.	22
Figura 6. Caracterização dos queratinócitos primários expressando E6/E7 de três diferentes variantes moleculares de HPV-16.	40
Figura 7. Nível das proteínas MEK1 e MEK2 total e fosforilada (ativa) nos queratinócitos imortalizados pelas diferentes variantes moleculares de HPV-16.	42
Figura 8. Níveis de fosforilação de proteínas celulares envolvidas na via de MAPK-ERK nos queratinócitos imortalizados pelas diferentes variantes moleculares de HPV-16.	43
Figura 9. Expressão de proteínas celulares envolvidas na via de MAPK-p38 (A), PI3K/AKT (B), e JNK (C), nos queratinócitos imortalizadas pelas diferentes variantes moleculares de HPV-16.	45
Figura 10. Expressão de β -catenina em extratos proteicos total e nuclear dos queratinócitos imortalizados pelas diferentes variantes moleculares de HPV-16.	48
Figura 11. Distribuição celular de β -catenina em queratinócitos imortalizados por diferentes variantes moleculares de HPV-16.	49
Figura 12. Perfil de expressão e atividade de fatores de transcrição celulares envolvidos nas vias de sinalização mediadas por MAPK e PI3K/AKT nos queratinócitos imortalizados pelas diferentes variantes moleculares de HPV-16.	52
Figura 13. Curva de proliferação dos queratinócitos imortalizados pelas diferentes variantes de HPV-16.	53
Figura 14. Migração celular dos queratinócitos imortalizados por diferentes variantes moleculares de HPV-16.	55
Figura 15. Crescimento independente de ancoragem em PHKs imortalizados pelas diferentes variantes de HPV-16.	56

Figura 16. Invasão celular e fenótipo EMT dos queratinócitos imortalizados pelas diferentes variantes de HPV-16.	58
Figura 17. Efeito da inibição da via MAPK-ERK sobre a migração celular nos queratinócitos imortalizados pelas diferentes variantes de HPV-16.	60
Figura 18. Detecção do plasmídeo pCDH-puro-c-Myc por PCR nos queratinócitos imortalizados pelas variantes AA e E-350G de HPV-16 e co-transduzidos com c-MYC.	88
Figura 19. Expressão de c-MYC nos queratinócitos normais ou imortalizados pelas variantes AA e E-350G de HPV-16 co-transduzidos com c-MYC.	90
Figura 20. Expressão de MEK1 e MEK2 total e fosforilada (forma ativada) nos queratinócitos normais ou imortalizados pelas variantes AA e E-350G de HPV-16 co-transduzidos com c-MYC.	91
Figura 21. Curvas de proliferação de queratinócitos normais, e imortalizados pelas variantes AA e E-350G de HPV-16 e co-transduzidos com c-MYC.	92
Figura 22. Migração celular dos queratinócitos imortalizados pelas variantes AA e E-350G de HPV-16 e co-transduzidos com c-MYC.	93
Figura 23. Crescimento independente de ancoragem em PHKs imortalizados pelas variantes AA e E-350G de HPV-16 e co-transduzidos com c-MYC.	94
Figura 24. Invasão celular dos queratinócitos imortalizados pelas variantes AA e E-350G de HPV-16 e co-transduzidos com c-MYC.	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variação nucleotídica e de aminoácido das variantes moleculares de HPV-16. 38

Tabela 2. Expressão de c-MYC nos queratinócitos normais ou imortalizados pelas variantes AA e E-350G de HPV-16 co-transduzidos com c-MYC. 89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa aminoácidos

AA Asiático Americana (*Asian American*)

ADA-3 Alteração deficiência em ativação-3 (*alteration/deficiency in activation 3*)

ATF-2 Fator de transcrição ativador-2 (*Activator transcription Factor -2*)

AP-1 Proteína ativadora 1 (*activating protein-1*)

AKT1 *v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*

AKT2 *v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2*

AKT3 *v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3*

BPV-1 Papilomavirus bovino-1 (*Bovine Papillomavirus-1*)

BPE Extrato de pituitária bovina (*Bovine pituitary bovine*)

BSA Albumina sérica bovina (*bovine serum albumin*)

μl microlitro

μM micromolar

ng nanograma

°C graus Celsius

CO₂ dióxido de carbono

cDNA DNA complementar (*complementary DNA*)

CDK2 Quinase dependente de ciclinas 2 (*Cyclin dependent kinase-2*)

c-JUN proteínas quinases c-JUN N-terminal (*c-JUN N terminal protein kinase*)

c-MYC Homologo do oncogene viral v-myc de mielocitomatose aviária (*v-myc avian myelocytomatosis viral oncogen homolog*)

DNA ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)

DMEM Medio Eagle's modificado por Dulbecco's (*Dulbecco's Modified Eagle's médium*)

ECM matriz extracelular (*extracellular matrix*)

E6BP Proteína de união a E6 (*E6 Binding protein*)

E6AP Proteína associada a E6 (*E6 Associated protein*)

EGFR Receptor do fator de crescimento epidérmico (*Epidermic growth factor receptor*)

E Europeia (*European*)

EGF Fator epidérmico de crescimento (*Epidermic growth fator*)

ELISA Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

EMSA Ensaio de mobilidade eletroforética (*electrophoretic mobility shift assay*)

EMT...Transição Epitélio-Mesênquima (*Epithelial-Mesenchymal Transition*)

ERK1 Quinase regulada por sinal extracelular 1 (*extracellular-signal-regulated kinase 1*)

ERK2 Quinase regulada por sinal extracelular (*extracellular-signal-regulated kinases 2*)

FADD Proteína associada a Fas com domínio de morte (*Fas-associated protein with Death Domain*)

FBS Soro fetal bovino (*Fetal Bovine Serum*)

GADD153 Fator de transcrição 153 induzível pela parada do crescimento e dano ao DNA (*Growth arrest and DNA damage inducible transcription fator*)

GAPDH Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*)

GDP Disfosfato de guanosina (*Guanosine diphosphate*)

GTP Trifosfato de guanosina (*Guanosine triphosphate*)

GRB2 Proteína 2 de ligação ao receptor do fator de crescimento (*growth factor receptor-bound protein 2*).

GSK3β Glicogénio quinase sintase 3 beta (*Glycogen synthase kinase 3 beta*)

HDAC Histona deacetilase (*histone deacetylase*)

HPV Papilomavírus Humano (*Human Papillomavirus*)

IARC Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (*International Agency for Research in Cancer*)

IgG Imunoglobulina G

IRF-3 Fator 3 regulado por interferón (*Interferon regulatory factor-3*)

JNK/SAPK Quinases aminoterminal de c-Jun/Quinases ativadas por *stress* (*Jun aminoterminal Kinases/Stress activated protein kinases*)

kDa quilodalton (*Kilodalton*)

KSFM Meio livre de soro de queratinócitos (*Keratinocyte serum-free medium*)

LCR Região longa de controle (*long control region*)

LPS Lipopolissacarídeo (*Lipopolysaccharide*)

M molar

mTOR Alvo de rapamicina em mamífero (*mammalian target of rapamycin*)

MHC Complexo principal de histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex*)

MAPK Proteína-quinases ativadas por mitógenos (*Mitogen Activated Protein Kinases*) -

mg miligrama

ml mililitro

mM milimolar

MTT 3-(4,5-Dimethylthiazol-2)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide

Mplx Megapixels

MEK1 proteína quinase quinase ativada por mitógenos 1 (*mitogen-activated protein kinase kinase 1*)

MEK2 proteína quinase quinase ativada por mitógenos 2 (*mitogen-activated protein kinase kinase 2*)

MKK3 proteína quinase quinase ativada por mitógenos 3 (*mitogen-activated protein kinase kinase 3*)

MKK6 proteína quinase quinase ativada por mitógenos 6 (*mitogen-activated protein kinase kinase 6*)

MSK proteína quinase ativada por mitógenos e *stress* (*Mitogen- and Stress-activated protein Kinases*)

µg micrograma

nm nanômetro

nM nanomolar

NaCl Cloreto de sódio

O₂ oxigênio

OMS Organização Mundial da Saúde

PCR reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

PHK queratinócitos humanos primários (*primary human keratinocytes*)

PBS tampão fosfato-salino (*phosphate-buffered saline*)

p16 inibidor de ciclina dependente de quinase 2A (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*)

PTB dominós de ligação á resíduos fosforilados (*phosphotyrosine-binding (PTB) domains*)

p53...proteína supressora de tumores p53(*tumor supressor protein 53*)

pb pares de bases (*pair base*)

PDK Piruvato desidrogenase quinase (*pyruvate dehydrogenase kinase*)

PIP3 Fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato (*phosphatidylinositol 3,4,5 trisphosphate*)

pRb proteína do retinoblastoma (*retinoblastoma protein*)

p70S6K proteína quinase S6 ribossômica (*ribosomal protein S6 kinase*)

p300/CBP Proteína de união a CREB (*CREB Binding protein*)

PDFV fluoreto de polivinilideno

RNA ácido ribonucleíco (*ribonucleic acid*)

RNA_m RNA mensageiro

RSK6 Quinase S6 ribossomal (*Ribosomal S6 kinase*)

rpm Revoluções por minuto

RTK Receptor de tirosin quinases (*Receptor tyrosin kinases*)

qRT-PCR PCR quantitativa em tempo real (*quantitative real time PCR*).

SAP-1a Proteína acessória de resposta a soro (*Serum accesory protein 1a*)

SDS dodecil sulfato de sódio (*sodium dodecyl sulfate*)

SH2 domínios com homologia a SRC2 (*Src homology 2 domains*)

Tris-HCl Tris- Hidrocloreto (*Tris-Hydrochloride*)

TBS-T Tampão Salina Tris com Tween 20 (*Tris Buffered Saline-Tween 20*)

TCF Fator do complexo ternário (*Ternary complex factor*)

TNFR-1 Receptor de fator 1 de necrose tumoral (*Tumor necrosis factor receptor-1*)

VLPs Partículas semelhantes ao vírus (*Virus like particles*)

RESUMO

Hochmann Valls JP. *Análise do impacto das proteínas E6/E7 de diferentes variantes moleculares de HPV-16 sobre as vias de transdução de sinal mediadas por MAPK* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

A infecção persistente por HPV-16 está fortemente associada ao risco de desenvolvimento de neoplasias do colo do útero, vagina, vulva, pênis, canal anal e orofaringe. O estudo detalhado da variabilidade nucleotídica intra-típica de HPV-16 resultou em importantes achados no que concerne à filogenia e evolução viral, e à história natural das infecções. Variantes Asiático-Americanas (AA) e E-350G de HPV-16 foram associadas com maior risco de persistência da infecção viral e desenvolvimento de câncer de colo de útero quando comparadas à variante Européia protótipo (E-P ou E-350T), embora esta ainda apresente alto risco quando comparada aos outros tipos virais. Mais recentemente, diferenças funcionais entre as proteínas E6/E7 das distintas variantes moleculares de HPV-16 estão sendo descritas, a fim de explicar as diferenças nas associações epidemiológicas observadas. Dados do nosso grupo apontaram para a transcrição aumentada do gene *MEK2* especificamente em queratinócitos humanos primários (PHKs) transduzidos com *E6/E7* da variante E-350G. Pelo exposto, objetivou-se: (1) Analisar os níveis de ativação de proteínas efetoras das vias de transdução de sinal mediadas por MAPK e PI3K/AKT em queratinócitos imortalizados por E6/E7 de três variantes moleculares de HPV-16 (AA, E-P, E-350G); (2) Analisar os efeitos das proteínas E6/E7 dessas variantes sob as vias de MAPK quanto à indução de fatores de transcrição; (3) Analisar o potencial transformante de PHKs imortalizados pelas diferentes variantes, e em cooperação com a proteína celular c-MYC; (4) Analisar o potencial de migração e invasão em PHKs imortalizados pelas diferentes variantes de HPV-16, e em cooperação com a proteína celular c-MYC. Neste estudo observou-se que a variante AA de HPV-16 induziu a maior ativação das vias de sinalização estudadas (MAPK, e PI3K/AKT). Ademais, PHKs imortalizados por esta variante apresentaram maior capacidade de migração, de invasão através de uma matriz de colágeno, além de maior potencial transformante. Adicionalmente, as células imortalizadas pela variante AA apresentaram maior expressão da proteína mesenquimal vimentina e diminuição dos níveis da proteína epitelial E-caderina, sugerindo ativação parcial de Transição Epitélio Mesênquima (EMT) nestes queratinócitos. Ademais, quando o oncogene c-MYC foi co-transduzido nas diferentes linhagens infectadas por E6/E7 de HPV-16, foi observado que em PHKs imortalizados pela variante AA também houve maior ativação da via de MAPK-ERK, maior migração, e um potencial transformante semelhante, em relação às células co-transduzidas pela variante E-350G e c-MYC. Em conjunto, estes dados sugerem que a variante AA de HPV-16 possui vantagem seletiva sob as outras variantes em promover transformação celular, migração e invasão, e isto poderia explicar, ao menos em parte, a maior prevalência desta variante no câncer cervical. Os resultados gerados neste estudo são de extrema relevância para avaliar o impacto da variabilidade intra-típica de HPV-16 sobre o potencial oncogênico observado em estudos epidemiológicos

Descritores: *Papillomaviridae*; Papillomavirus humano 16; Proteínas quinases ativadas por mitógeno; Fosfatidilinositol 3-quinases; Heterogeneidade genética; Migração celular; Transformação celular viral.

ABSTRACT

Hochmann Valls JP. *Analysis of the impact of E6/E7 proteins of different molecular variants of HPV-16 upon MAPK signaling pathways* [Thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2016.

Persistent infection with HPV-16 is strongly associated with risk of developing neoplasia in the uterine cervix, vagina, vulva, penis, anal canal and oropharynx. The detailed study of HPV-16 intra-typical nucleotide variability resulted in important findings regarding phylogeny and viral evolution, and the natural history of infections. Asian-American (AA) and E-350G variants of HPV-16 were associated with increased risk of persistent viral infection and development of cervical cancer compared to the European prototype (E-P or E-350T), although this variant still presents higher risk when compared to other viral types. More recently, functional differences between the E6/E7 proteins of distinct molecular variants of HPV-16 are being described, in order to explain the differences in the epidemiological associations observed. Data from our group pointed to increased transcription of the *MEK2* gene specifically in primary human keratinocytes (PHKs) transducing E6/E7 of the E-350G variant. Consequently, the aims of this study were: 1) To examine the activation levels of effector proteins of the signal transduction pathways mediated by MAPK and PI3K/AKT in PHKs immortalized by E6/E7 of three different molecular variants of HPV-16 (AA, E-P, E-350G); (2) To analyze the effects of E6/E7 of different molecular variants of HPV-16 upon MAPK pathways concerning the induction of transcription factors; (3) To analyze the transforming potential of PHKs immortalized by different molecular variants of HPV-16, and in cooperation with the cellular protein c-MYC; (4) To analyze the potential of migration and invasion in PHKs immortalized by different molecular variants of HPV-16, and in cooperation with the cellular protein c-MYC. In this study we observed that the AA variant of HPV-16 induced higher activation of both signaling pathways studied (MAPK, and PI3K/AKT). Furthermore, this variant presented increased migration capacity, higher invasion through a collagen matrix, and greater transforming potential. Moreover, cells immortalized by the AA variant showed higher expression of the mesenchymal protein vimentin and a decrease of the epithelial protein E-cadherin, suggesting partial activation of Epithelial Mesenchymal Transition (EMT). In addition, when the c-MYC oncogene was co-transduced in the different cells lines infected with HPV-16 E6/E7, we observed that in PHKs immortalized by the AA variant there was also an enhanced activation of the MAPK-ERK pathway, a higher ability to migrate, and similar transformation potential in comparison with cells co-transduced with the E-350G variant and c-MYC. Taken together, this data suggest that the AA molecular variant of the HPV-16 has a selective advantage over the other variants to promote cell transformation, migration and invasion, and this could partly explain the higher prevalence of this variant in cervical cancer. The results generated in this study are very important to assess the impact of intra-typical variability of HPV-16 on the oncogenic potential observed in epidemiological studies.

Descriptors: *Papillomaviridae*; Human papillomavirus 16; Mitogen-activated protein kinases; Phosphatidylinositol 3-kinases; Genetic Heterogeneity; Cell movement; Cell transformation viral.

Capítulo I

Introdução

1.INTRODUÇÃO

A infecção persistente por Papilomavírus Humano (HPV) tipo 16 está fortemente associada ao risco de desenvolvimento de neoplasias do colo do útero, vagina, vulva, pênis, canal anal e orofaringe. Desde 1995, a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) da Organização Mundial de Saúde considera que existem evidências biológicas e epidemiológicas suficientes para considerar os HPVs 16 e 18 como sendo carcinogênicos em humanos (revisado por IARC, 2012). Mundialmente, o HPV-16 é o tipo mais prevalente em amostras de colo de útero citologicamente normal, e em neoplasias intra-epiteliais e carcinomas cervicais (Walboomers *et al.*, 1999).

Células epiteliais escamosas são o hospedeiro natural de HPV, e foi demonstrado que as proteínas E6 e E7 de HPVs de alto risco oncogênico cooperam tanto na imortalização de queratinócitos humanos primários (PHKs) quanto na inibição da diferenciação terminal destas células induzida por soro e cálcio (Münger *et al.*, 1989; Villa e Schlegel, 1991). Isso se deve principalmente à associação destas oncoproteínas virais com proteínas celulares envolvidas no controle do ciclo celular como p53 (proteína supressora de tumor p53) e pRb (proteína do retinoblastoma) (Dyson *et al.*, 1989; Scheffner *et al.*, 1993). Adicionalmente, foi demonstrado que a proteína c-MYC (Homólogo do oncogene viral v-MYC da mielocitomatose aviária) é capaz de cooperar com E6/E7 de HPV-16 na transformação de PHKs (Subramanyam *et al.*, 2006).

1.1 O Papilomavirus Humano

Os HPVs são vírus pequenos sem envelope, cujo genoma é composto por uma cadeia de DNA dupla fita circular de aproximadamente 8.000 pares de bases (pb) associada às histonas celulares (revisado por IARC, 2012). Os HPVs infectam o epitélio mucoso e da

pele em uma ampla variedade de vertebrados. Até o momento mais de 200 tipos de HPV já foram descritos, dos quais aproximadamente 40 infectam o trato anogenital (revisado por Doorbar *et al.*, 2015). Alguns tipos de HPV são comumente detectados em amostras de câncer cervical, enquanto outros são detectados em baixa frequência podendo causar proliferações benignas incluindo verrugas ou papilomas genitais, sendo possível desta forma categorizar os tipos virais em HPVs em alto e baixo risco oncogênico (revisado por IARC, 2012). Atualmente a Organização Mundial da Saúde considera que há evidências experimentais e epidemiológicas suficientes para considerar 13 tipos de HPVs como sendo os principais agentes carcinogênicos na cérvix uterina: HPVs 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 66.

1.2 Estrutura do HPV

Os HPV são vírus não-envelopados e icosaédricos. O capsídeo é formado por duas proteínas estruturais, L1 (55 kDa) e L2 (70 kDa) codificadas pelo próprio vírus. O genoma de HPV apresenta oito genes que são transcritos a partir de uma única fita do DNA (ácido desoxirribonucleico). O genoma viral está funcionalmente dividido em três partes: uma região denominada precoce (E ou *early*) que codifica proteínas (E1-E7) envolvidas no controle da transcrição e replicação viral; uma região tardia (L ou *late*) que codifica as proteínas estruturais do capsídeo (L1 e L2), além de uma região reguladora não codificante denominada de LCR (região longa de controle) (Figura 1). A LCR abrange aproximadamente 10% do genoma viral e contém elementos de ligação de fatores de transcrição celulares e virais necessários para o controle da replicação e transcrição do DNA viral (revisado por Bernard, 2002). Em HPVs de alto risco oncogênico as proteínas precoces e tardias são expressas a partir de promotores distintos. Por exemplo, em HPV-31 as proteínas precoces e tardias são expressas a partir dos promotores P97 e P742,

respectivamente (Fehrmann e Laimins, 2003). As proteínas virais E1 e E2 reconhecem sítios de ligação específicos na LCR e se ligam a fim de ativar a replicação e transcrição viral.

Figura 1. Organização genômica do HPV. Representação esquemática do genoma circular do HPV-16, onde se visualiza os genes de replicação precoce (E), os genes de replicação tardia (L), e a região longa de controle (LCR) (adaptada de D'Abramo *et al.*, 2011).

1.3 Proteínas virais

E1

A proteína E1 é altamente conservada, e possui atividade de helicase ATP-dependente sendo essencial para a replicação viral. A proteína E1 forma complexos com a proteína E2, e recruta fatores celulares de replicação, incluindo o fator de replicação A, a DNA polimerase α e a topoisomerase I, formando assim um replissoma (Lace *et al.*, 2008). Esta proteína é responsável pela manutenção do genoma viral na forma episomal em

baixas cópias, e também facilita a correta segregação dos genomas durante a divisão celular. Além disso, E1 é responsável pela amplificação do genoma viral nas camadas superficiais do epitélio anteriormente ao empacotamento em partículas infecciosas (virions). Esta fase de amplificação do genoma viral em HPV-16 é controlada pelo promotor tardio P670 (revisado por Doorbar *et al.*, 2015).

E2

A proteína E2 também está envolvida na replicação celular junto com E1 por auxiliar a ligação de E1 à LCR. Ademais, E2 é o principal regulador transcricional viral dos HPVs; esta proteína se une a dois sítios de ligação à E2 próximos do promotor precoce P97, recruta fatores de remodelação de cromatina (Schweiger *et al.*, 2007), resultando na repressão da transcrição de *E6* e *E7*. A integração do genoma viral geralmente ocorre com interrupção dos genes *E1* e *E2*, levando à expressão constitutiva de *E6* e *E7* (Bellanger *et al.*, 2011; revisado por McBride, 2013).

E4

A proteína E4 localiza-se no citoplasma celular e interage com o citoesqueleto de queratina, auxiliando o empacotamento e liberação dos virions nas camadas mais superficiais do epitélio (Bryan e Brown, 2000; revisado por Doorbar, 2013; Nakahara *et al.*, 2005). Além disso, esta proteína também contribui na amplificação do genoma viral. A proteína E4 é expressa em níveis aumentados nas células durante etapas avançadas da infecção (camadas suprabasais do epitélio) a fim de manter a amplificação do genoma viral. A proteína E4 pode servir como um biomarcador da infecção ativa do vírus, e no caso dos HPVs de alto risco oncogênico também foi sugerido servir como marcador da severidade das lesões malignas do colo de útero (Griffin *et al.*, 2012).

E5

Esta é a principal proteína transformante de BPV-1 (papilomavírus bovino) (Schiller *et al.*, 1986). Nas células infectadas por HPV foi observado que a proteína E5 amplifica o sinal mitogênico do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), já que se associa com este receptor ativando-o (Pim *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 2002). Esta é uma proteína hidrofóbica de membrana de 83 aminoácidos (aa), que se associa com o aparelho de Golgi, retículo endoplasmático e membrana nuclear (Kell *et al.*, 1994). A proteína E5 coopera com as oncoproteínas E6 e E7 de HPV na indução do fenótipo maligno. Esta proteína também permite à célula infectada escapar do sistema imune, pois interage diretamente com a cadeia pesada do Complexo Maior de Histocompatibilidade-1 (MHC1) inibindo a apresentação dos antígenos às células T efectoras. Assim, em conjunto com outros mecanismos, como a não indução da inflamação, contribui para a evasão da resposta imune hospedeira (revisado por Venuti *et al.*, 2011).

E6 e E7

Estas constituem as oncoproteínas virais, e tem um papel fundamental na transformação maligna associadas ao HPV (Barbosa e Schlegel, 1989; Halbert *et al.*, 1991; Hawley-Nelson *et al.*, 1989; Münger *et al.*, 1989). Estas proteínas de HPVs de alto risco oncogênico estimulam a proliferação celular por interagir com e suprimir as funções de proteínas celulares envolvidas no controle desta. O produto do gene *E6* consiste de uma proteína nuclear de 158 aa cuja função mais estudada é a sua associação com a proteína nuclear p53 (Werness *et al.*, 1990) levando à sua degradação pela via de proteólise dependente de ubiquitina (Scheffner *et al.*, 1990, 1993). Esta interação ocorre da seguinte maneira: E6 se une com a proteína E6-AP (proteína associada a E6) através de uma sequência aminoacídica rica em leucinas (LxxLL) presentes em E6-AP, e isto conduz ao

recrutamento, poliubiquitinação e a degradação de p53 (Martinez-Zapien *et al.*, 2016). Apenas as proteínas E6 de HPVs de alto risco oncogênico são capazes de eficientemente degradar p53 (Lechner e Laimins, 1994); foi observado que E6 de HPV-11 também é capaz de degradar p53, entretanto, com menor intensidade que a proteína de HPV-16 (Storey *et al.*, 1998). Adicionalmente, através de um peptídeo na extremidade carboxi-terminal, a proteína E6 de HPVs de alto risco oncogênico interage com um conjunto de proteínas celulares que possuem um domínio PDZ, sendo em seguida ubiquitinizadas por E6-AP e degradadas pelo proteossomo (revisado por Vande Pol, 2015). Embora a degradação de p53 seja um fator importante na transformação celular induzida por E6, estudos adicionais identificaram diversos alvos celulares de E6, cuja interação também tem um papel importante na carcinogênese (Figura 2A).

Foi observado que E6 de HPV-16 ativa a telomerase em PHKs e células epiteliais mamárias em estágios precoces da infecção, e independentemente da degradação de p53 (Klingelutz *et al.*, 1996). Além disso, a proteína viral E6 de HPV-16 interage com uma proteína celular denominada E6-BP (proteína de união ao E6), com a paxilina que é uma proteína envolvida na organização e diferenciação do epitélio (revisado por Tong e Howley, 1997), com o co-ativador transcricional p300/CBP (proteína de união a CREB) (Patel *et al.*, 1999), com outras proteínas envolvidas na regulação da transcrição e replicação do DNA, como IRF-3, ADA3, com proteínas envolvidas na apoptose e evasão do sistema imune, como BAK, o receptor de TNF-1 (TNF-R1), e FADD (proteína associada a FAS com domínio de morte) (revisado por Yim e Park, 2005) (Figura 2A).

Figura 2. Interações entre as oncoproteínas E6 e E7 de HPVs de alto risco oncogênico e proteínas celulares. (A). Interações de E6 e (B) E7 com diferentes proteínas celulares. (adaptado de Moody e Laimins, 2010).

A proteína E7 é uma fosfoproteína cuja principal e mais estudada interação é com a forma hipofosforilada de pRb (Dyson *et al.*, 1989). A proteína pRb é regulada negativamente pela proteína p16, já que esta é inibida por quinases dependentes de ciclinas que fosforilam pRb, e desta forma, p16 inibe a fosforilação de pRb. Assim, pRb em seu estado inativo se une ao fator de transcrição E2F inibindo a progressão do ciclo celular (Khleif *et al.*, 1996). Como resultado da degradação da proteína pRb pela proteína viral E7, a proteína p16 está superexpressa em amostras de câncer cervical e tem sido utilizada como um biomarcador de câncer de colo uterino (Klaes *et al.*, 2001; revisado por zur Hausen,

2000), A proteína E7 de HPVs de alto risco oncogênico se liga à pRb com maior afinidade que aquelas de HPVs de baixo risco. Além de se ligar a pRb, a proteína E7 de HPVs de alto risco se associa à proteínas envolvidas no ciclo celular como p107 e p130, ciclina A, CDK2 (quinase dependente de ciclina 2), e os inibidores de quinase dependentes de ciclina p21 e p27. Ademais, se associa à fatores de transcrição celulares como as HDAC (histona deacetilase), e p48 (Mammas *et al.*, 2008; Tommasino *et al.*, 1993; Yim e Park, 2005) (Figura 2B).

L1

A proteína L1 possui 55 kDa, e é a proteína mais abundante do cápsideo do vírus (L1 constitui 80% do total das proteínas virais). Esta proteína é expressa nas camadas mais superficiais do tecido infectado logo após o término da amplificação viral. A proteína L1 possui epítomos tipos-específicos e é altamente imunogênica, além de possuir habilidade de se auto empacotar em partículas semelhantes aos vírus (VLPs). Estas VLPs refletem morfologicamente os virions maduros, e são altamente imunogênicas, o que permitiu que a imunização com estas partículas desencadeie uma resposta robusta de anticorpos a fim de prevenir a infecção por HPVs 6, 11, 16, 18 (revisado por Buck *et al.*, 2013). Durante a fase tardia da infecção, as proteínas L1 e L2 são sintetizadas no citoplasma das células diferenciadas sendo em seguida transportadas ao núcleo para o empacotamento do DNA viral replicado.

L2

A proteína L2 é a proteína viral menos abundante. Esta tem um papel importante no empacotamento das partículas virais e no processo infeccioso. Enquanto L1 compõe a maior parte do capsídeo e pode se auto empacotar em VLPs, a proteína L2 não é capaz de

formar VLPs, apesar de colaborar com o empacotamento de L1 em VLPs. A proteína L2 tem também um papel importante na incorporação do DNA viral dentro do vírion, através da adição gradual de proteínas do capsídeo ao redor do genoma (Raff *et al.*, 2013; revisado por Wang e Roden, 2013; Wiens e Smith, 2014).

1.4 Ciclo de vida do HPV

Os HPVs são vírus epiteliotrópicos uma vez que estabelecem infecções no epitélio estratificado da pele, do trato anogenital e da cavidade oral. O ciclo de vida do HPV segue rigorosamente o programa de diferenciação da célula hospedeira, os queratinócitos. Inicialmente, o genoma pode permanecer latente na forma episomal por períodos prolongados, sem produzir lesões detectáveis, ou pode ser amplificado durante a diferenciação dos queratinócitos. Para que ocorra a infecção do epitélio estratificado, o vírus deve atingir as células basais indiferenciadas. Acredita-se que o HPV infecta os tecidos epiteliais através de micro abrasões que facilitariam o acesso à essas células epiteliais basais. No capsídeo, a maior parte de L2 está protegida, embora exista uma porção da região amino-terminal de L2 exposta na superfície. Durante a infecção, o vírus inicialmente se liga a proteoglicanos de heparina sulfato na matriz extracelular através de L1. Em seguida, L1 sofre uma alteração conformacional que deixa L2 exposta. Posteriormente na superfície da célula, as ciclofilinas celulares se ligam à L2 e expõe a porção amino-terminal que contem um sítio de clivagem à furina. Após a clivagem de L2, o vírus entra na célula através de um receptor secundário que media a internalização por endocitose mediada por vesículas revestidas de clatrina e/ou caveolina, dependendo do tipo viral infectante. Em seguida, o vírus se desloca mediante o sistema endosomal até o trans-Golgi. Durante este processo ocorre acidificação das proteínas L1 e L2, além de alterações conformacionais que resultam na dissociação das duas proteínas. Finalmente o complexo

de L2 junto ao genoma viral é transferido até o núcleo onde permanece na forma episssomal (Day *et al.*, 2003;Wiens e Smith,2014). Os genes precoces são então transcritos permitindo a replicação inicial do genoma viral até um número de cópias de 50-100 genomas virais por célula. A partir deste ponto, o genoma viral é replicado em média uma vez por ciclo celular quando as células basais se dividem e os genomas virais são distribuídos igualmente entre as células filhas. Durante esta fase, o promotor P97 (em HPV-16) dirige a expressão dos genes *E6* e *E7* que induzem a entrada da célula na fase S do ciclo celular. As células basais iniciam o processo de diferenciação à medida que migram para as camadas mais superficiais do epitélio, onde ocorre aumento da replicação do DNA viral, e o promotor P670 que é altamente regulado nas camadas superficiais da célula controla a expressão das proteínas virais de replicação E1, E2, E4, e E5, as quais aumentam em abundância facilitando a amplificação dos genomas virais (revisado por Doorbar, 2012). Além disso, nas camadas mais diferenciadas do epitélio os genes tardios *L1* e *L2* são expressos, e forma-se o capsídeo que engloba os genomas virais amplificados. Os virions maduros são liberados quando ocorre descamação das células mortas da pele (revisado por Baseman e Koutsky, 2005) (Figura 3).

Figura 3. Ciclo de vida do HPV. Representação esquemática do padrão de expressão de genes do HPV-16 após a infecção da célula hospedeira (queratinócito) (adaptado de Doorbar *et al.*, 2005).

1.5 Epidemiologia e transmissão do HPV

O câncer do colo uterino é um problema de saúde grave, pois representa o segundo câncer mais comum em mulheres no mundo todo, com 528 mil novos casos e 266 mil mortes (GLOBOCAN, 2012). A incidência desta neoplasia varia nas diferentes populações, entretanto as maiores taxas de incidência e mortalidade são observadas nos países em desenvolvimento onde a combinação de fatores sociais, políticos, culturais e econômicos juntamente com o registro inadequado e desconhecimento da doença, tornaram-se um problema de saúde pública. As regiões de alto risco, com taxas de incidência estimadas de 30 por 100.000 habitantes estão na África. As taxas mais baixas se encontram na Austrália, Nova Zelândia, e em Ásia. Calcula-se que quase 80% das pessoas sexualmente ativas vão contrair HPV durante a vida. Aproximadamente 23% destas infecções são por HPV-16 e 8,5% por HPV-18 (de Sanjose *et al.*, 2007). Os HPVs 16 e 18 causam a maioria dos casos de câncer de colo do útero em todo o mundo (cerca de 70%). Estes são responsáveis também por até 90% dos casos de câncer de canal anal, 60% dos

cânceres de vagina e até 50% dos casos de tumor vulvar. Já os HPV's 6 e 11, de baixo risco oncogênico, causam aproximadamente 90% das verrugas genitais (revisado por IARC, 2012). Observou-se que o HPV-16 ocorre em 30% das amostras com citologia normal HPV positivas, enquanto que pode ocorrer em 50 a 90% das lesões neoplásicas HPV positivas (Bulk *et al.*, 2006). Assim, o HPV-16 é o tipo mais prevalente tanto em neoplasias intra-epiteliais quanto em carcinomas escamosos invasivos (revisado por IARC 2007; Walboomers *et al.*, 1999), por outro lado, o HPV-18 é mais prevalente em amostras de adenocarcinomas (Bulk *et al.*, 2006).

Em torno de 20% das mulheres saudáveis tem infecção assintomática por HPV. Uma pequena proporção destas mulheres desenvolverá alguma lesão causada pelo HPV que, se não for tratada, poderá resultar em câncer de colo do útero, em geral 10 ou 20 anos após a infecção pelo HPV. As maiores taxas de prevalência de infecção por HPV's de alto risco oncogênico são observadas na África e na América Latina (revisado por Muñoz, 2002). O HPV-16 é o tipo mais comum no mundo com exceção da Indonésia e Argélia onde o HPV-18 é o mais comum.

Os HPV's podem ser transmitidos para qualquer célula da pele ou das mucosas pelo contato, sendo a relação sexual a forma principal de transmissão do vírus na região genital tanto feminina quanto masculina (Burchellet *et al.*, 2006). Além do contato pênis-vagina, o HPV também é transmitido por outras práticas sexuais incluindo relações pênis-canal anal, sexo oral e digital. Foi demonstrado que o uso de preservativo não é totalmente protetor contra a transmissão do HPV, e que a circuncisão está associada à um risco reduzido de infecção no homem (Burchell *et al.*, 2006). De maneira geral, observa-se que o risco de infecção por HPV de alto risco oncogênico se associa às variáveis sexuais, e os HPV's de baixo risco se associam às variáveis sociodemográficas e de higiene (Rousseau *et al.*, 2000).

1.6 Taxonomia e evolução do HPV

A família dos HPVs inclui mais de 200 tipos distintos que estão subagrupados em gêneros (Alfa, Beta, Gama, Mu, Nu) segundo sua sequência genômica. Já foram descritos 65 tipos distintos de Alfa-HPV, que se constituem na maior parte de tipos virais detectados nas mucosas, também chamados HPVs genitais (Bzhalava *et al.*, 2015). Por outro lado, os Beta- e Gama-HPVs foram isolados principalmente de lesões cutâneas, e dentre estes os HPVs 5 e 8 estão associados ao desenvolvimento de verrugas em indivíduos portadores de epidermodisplasia verruciforme (Chan *et al.*, 1995).

Foi definido pelo Comitê de Nomenclatura de Papilomavírus que variações nos genes *L1*, *E6* e *E7* menores que 2% são consideradas como variantes de tipos de HPV, variações entre 2% e 10% como subtipos, e variações maiores que 10% como novos tipos de HPV (revisado por Bernard *et al.*, 2006). Adicionalmente, um estudo recente demonstrou que 4% e 9,9% das sequências nucleotídicas e de aminoácido são variáveis, respectivamente, entre as variantes moleculares de HPV-16 (Chen *et al.*, 2005). É importante ressaltar que a variabilidade genética nos diferentes genes é filogeneticamente compatível, ou seja, mudanças nucleotídicas em um gene encontram correspondência com alterações nucleotídicas em outros genes (Chen *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2011; Yamada *et al.*, 1995).

Os estudos mais relevantes e detalhados acerca da variabilidade genética intratípica foram feitos para HPV-16 (Chan *et al.*, 1992; Ho *et al.* 1991, 1993; Icenogle *et al.*, 1991; Ramesar *et al.*, 1995; Smits *et al.*, 1994; Yamada *et al.*, 1995), os HPVs 18 e 45 (Ong *et al.*, 1993), HPVs 6 e 11 (Heinzel *et al.*, 1995; Kitasatoe *t al.* 1994), HPVs 5 e 8 (Deau *et al.*, 1991, 1993), e HPV-58 (Chan *et al.*, 2002; Raiol *et al.*, 2009). A origem e dispersão destes vírus foram estudadas através da comparação de sequências nucleotídicas, conforme descrito a seguir.

A análise da variabilidade nucleotídica intra-típica de HPV-16 tem sido extensivamente estudada e serve como ferramenta importante para traçar a filogenia e evolução destes vírus, além de ser utilizada em estudos sobre a história natural das infecções por HPV. No início dos anos 90, um fragmento da LCR foi sequenciado de uma compilação de 301 amostras HPV-16 positivas oriundas de 25 países e/ou regiões geográficas, e as sequências geradas foram comparadas à do protótipo (Ho *et al.*, 1993). A sequência protótipo utilizada para comparação é assim denominada simplesmente por ser o primeiro isolado de HPV-16 a ser completamente sequenciado a partir de uma amostra de carcinoma invasivo do colo do útero oriundo da Alemanha (Seedorf *et al.*, 1985). Neste trabalho foram caracterizadas 48 variantes moleculares, distinguidas por 51 substituições pontuais em 48 posições nucleotídicas diferentes em relação à sequência protótipo. A partir das sequências geradas foi construída uma árvore filogenética composta por 5 ramos, e o nome destes ramos reflete a origem da maior parte dos isolados que os compõe: ramos Africano 1 e 2 (Af-1 e Af2), Asiático-Americano (AA), Asiático (As) e Europeu (E).

Figura 4. Árvore filogenética de HPV-16. Esta árvore foi construída a partir da variabilidade nucleotídica de um fragmento da LCR de 301 isolados de HPV-16 provenientes de 25 grupos étnicos e localizações geográficas distintas (Ho *et al.*, 1993).

Estas análises demonstraram que as variantes de HPV-16 não são geradas por processos mutacionais frequentes e ao acaso, sendo consequência de eventos raros e sequenciais. Estudos subsequentes e mais atuais, baseados na análise do genoma completo do HPV-16 expandiram e complementaram esta filogenia. Mais recentemente, a análise da sequência completa do gene *E6* e da LCR de 953 isolados de 27 países diferentes sugeriu que as variantes E e As estão agrupadas filogeneticamente em um ramo E-As, que as variantes Af1 estão subdivididas nas sub linhagens Af1a e Af1b, que as variantes Af2 estão subdivididas nas sub linhagens Af2a e Af2b, e que as variantes AA estão subdivididas nas linhagens AA1 e AA2 (Cornet *et al.*, 2012). Estes dados foram corroborados em dois estudos mais recentes baseados no genoma completo de mulheres que participaram em estudos epidemiológicos no mundo inteiro incluindo países como Costa Rica, Taiwan, Tailândia, Ruanda, Zâmbia (Chen *et al.*, 2011) e de 62 sequências completas do HPV-16, (Smith *et al.*, 2011). De fato, os avanços nas técnicas de sequenciamento em larga escala tem permitido o estudo de genoma completo de outros tipos virais como os HPVs 6, 11, 31, 33, 35, 58 e 67 de isolados obtidos no mundo inteiro (Burk *et al.*, 2009, 2011), para os quais se revelou uma distribuição trimodal de evolução.

Algumas variantes são encontradas por todo o mundo, o que deve representar uma transferência populacional; outras parecem estar associadas a determinados grupos étnicos, sugerindo evolução nessas localizações. A dispersão e a baixa taxa de evolução de HPV-16 sugerem que estes co-evoluíram com os seus hospedeiros naturais em um período de alguns milhões de anos. Desta maneira, a colonização das Américas por europeus e africanos é refletida na composição das variantes de HPV neste continente (Ho *et al.*, 1993). Interessantemente, uma grande prevalência (>80%) de variantes E foi observada em grupos indígenas do Brasil e Argentina (Ho *et al.*, 1993; Picconi *et al.*, 2002, 2003). Observou-se que variantes Af-1 e Af-2 foram detectadas em 92% dos espécimes cervicais

africanos, embora fossem encontradas com frequências entre 0 e 10% nas outras regiões (Yamada *et al.*, 1997). Por outro lado, observou-se que variantes E foram encontradas na sua maioria em outras regiões que não a África, com frequências variando de 60% no Sudeste Asiático a 93% na América do Norte (Yamada *et al.*, 1997). Variantes As foram encontradas em 26% dos espécimes oriundos do Sudeste Asiático, entretanto eram raras ou ausentes nos outros continentes. As variantes AA foram encontrada em isolados provenientes da América Central, e Américas do Norte e do Sul, e na Europa foram detectados apenas em amostras oriundas da Espanha (Cornet *et al.*, 2012). Os isolados E provavelmente entraram na Espanha através dos conquistadores espanhóis vindos das Américas (Burk *et al.*, 2003; Yamada *et al.*, 1997).

De maneira geral, observa-se que nos países que possuem populações miscigenadas, variantes moleculares de HPV-16 pertencentes a diferentes ramos filogenéticos são detectadas (Berumen *et al.*, 2001; Hildesheim *et al.*, 2001; Smits *et al.*, 1994; Xi *et al.*, 1998, 2002, 2006, 2007). Por outro lado, na Europa são detectadas quase que exclusivamente variantes do ramo E. Entretanto, foi observado que variantes E que possuem uma alteração no nucleotídeo 350 do gene *E6* (E-350G) possuem uma distribuição geográfica diferente quando comparadas às variantes que não tem essa mutação (E-350T); as variantes E-350G foram mais frequentemente localizadas na Europa e nas América, por outro lado as variantes E-350T prevalecem em populações do Sudeste Asiático e da África (Yamada *et al.*, 1997).

1.7 Diferenças no potencial oncogênico entre as variantes moleculares de HPV-16

Epidemiologicamente foi descrito que a infecção por variantes não-E (Af, AA e As) de HPV-16 está associada ao risco aumentado de infecção viral persistente e de desenvolvimento de lesão cervical de alto grau (Berumen *et al.*, 2001; Gurgel *et al.*, 2015;

Hildesheim *et al.*, 2001; Sichero *et al.*, 2007a; Xi *et al.*, 2002; Zuna *et al.*, 2011). Também em estudos do tipo caso-controle, incluindo amostras de adenocarcinoma cervical e carcinoma celular escamoso, foi observado que as variantes não-E são menos prevalentes nos controles em comparação aos casos (Burk *et al.*, 2003). Além disso, foi observado em um estudo conduzido no México evidências clínicas e epidemiológicas de que as variantes AA são mais oncogênicas que as variantes E, já que além de serem mais prevalentes em amostras de câncer de colo de útero, também foram detectadas em pacientes jovens com tumores mais agressivos (Berumen *et al.*, 2001; Ortiz-Ortiz *et al.*, 2015).

Interessantemente, a associação de variantes não-E com o risco elevado de desenvolvimento de lesões de alto grau e câncer não foi detectada em populações Européias. Isso se deve a que neste continente existe quase que exclusivamente variantes pertencentes ao ramo E. Entretanto, as variantes E-350G (alteração do aminoácido 83 de leucina para valina-L83V) foram sugeridas estar associadas ao risco aumentado de persistência da infecção viral e de progressão à neoplasia intra-epitelial cervical graus 2/3 (Londesborough *et al.*, 1996). Entretanto, nem todos os estudos posteriores conduzidos em diferentes populações européias mostraram resultados semelhantes (Bontkes *et al.*, 1998; Cornet *et al.*, 2013; Nindl *et al.*, 1999; Terry *et al.*, 1997; van Duin *et al.*, 2000). Por exemplo, em um estudo conduzido na Suécia a variante E-350G foi a mais prevalente em amostras de carcinoma cervical (Zehbe *et al.*, 1998a), entretanto isto não foi observado quando foram estudadas amostras de carcinoma cervical oriundos de uma população italiana (Zehbe *et al.*, 1998b).

Em resumo, não é possível estabelecer uma associação direta entre o polimorfismo E-350G e o risco de desenvolvimento do câncer do colo de útero, já que esta associação varia entre as diferentes populações.

Foi sugerido que o potencial oncogênico das diferentes variantes moleculares poderia estar associado à composição étnica das diferentes populações. Em um estudo conduzido nos Estados Unidos onde foi observado que enquanto as variantes E de HPV-16 persistem mais ao longo do tempo nas mulheres brancas, as variantes Af persistiram por mais tempo nas mulheres afro-americanas (Xi *et al.*, 2006). Entretanto, em estudos realizados no Brasil (Belém e São Paulo), não se observou associação entre a origem étnica da mulher e a detecção das diferentes variantes, e isto poderia ser explicado ao menos em parte porque a população brasileira é uma população muito miscigenada misturada, com diferentes aportes étnicos (Junes-Gill *et al.*, 2008; Sichero *et al.*, 2007b). Estes dados foram corroborados em outro estudo conduzido na Costa Rica (Hildesheim *et al.*, 2001).

A importância da variabilidade nucleotídica de HPV-16 sobre a incidência do câncer do colo do útero ao redor do mundo poderia ser afetada não apenas pela prevalência de cada variante nas diferentes populações, mas também por diferenças funcionais intrínsecas de cada variante. Diferenças na atividade transcricional foram observadas entre variantes dos ramos E e AA de HPV-16 (Kämmer *et al.*, 2000; Sichero *et al.*, 2012a; Veress *et al.*, 1999). Diferenças bioquímicas e biológicas foram também observadas entre as oncoproteínas E6 e E7 de diferentes variantes de HPV-16 (Chakrabarti *et al.*, 2006; Hochmann *et al.*, 2016; Lichtig *et al.*, 2006; Niccoli *et al.*, 2012; Richard *et al.*, 2010; Sichero *et al.* 2012b; Zehbe *et al.*, 2011). Dentre os achados, foi observado que a proteína E6 de HPV-16 estimula a via de transdução de sinal mediada por MAPK (proteínas quinase ativada por mitógenos) (Pérez-Plasencia *et al.*, 2007). Dados do nosso grupo apontaram para a expressão aumentada do RNAm de *MEK2* (proteína quinase quinase ativada por mitógenos 2) especificamente em PHKs infectados com a variante E-350G (ou L83V) (Sichero *et al.*, 2012b).

1.8 Vias de sinalização celular

1.8a Vias de sinalização celular mediadas por MAPK

As vias de sinalização mediadas por MAPK amplificam e integram sinais de diversos estímulos de maneira a obter uma resposta fisiológica adequada no que concerne à proliferação celular, diferenciação, desenvolvimento, além de respostas inflamatórias e apoptose em células de mamíferos. As MAPKs pertencem à diferentes cascatas de sinalização que respondem a diferentes estímulos extracelulares. Existem três subgrupos distintos de proteínas dentro da família das MAPKs: 1) quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK), 2) quinase aminoterminal de c-JUN (JNK), e 3) quinases p38 (p38) (Figura 5) (revisado por Zhang e Liu, 2002).

A via de sinalização MAPK-ERK se inicia com o estímulo de receptores de tirosina quinases (RTKs) que induz a ativação das MAPK em um processo de múltiplos passos. Estes receptores de crescimento são ativados por ligantes, e subsequentemente ocorre autofosforilação nas caudas citoplasmáticas do receptor em resíduos de tirosina. Em seguida, estes resíduos de tirosina fosforilados se unem às proteínas que contêm domínios SH2 (domínios com homologia a SRC2) ou PTB (domínios de ligação a resíduos fosforilados), como por exemplo, a GRB2 (proteína 2 de ligação ao receptor do fator de crescimento). Esta proteína recruta a molécula SOS (*son of sevenless*), que consiste de um fator de intercâmbio de nucleotídeos de guanina, desde o citosol até a membrana plasmática, e em seguida estimula a conversão do GDP (difosfato de guanosina) unido à proteína RAS, a GTP (trifosfato de guanosina). Posteriormente o complexo RAS-GTP pode interagir diretamente com proteínas efetoras, como RAF, ativando-o. A proteína RAF ativada fosforila as proteínas MEK1 e MEK2 (quinase quinase ativadas por mitógenos 1 e 2). Finalmente, MEK1 e MEK2 fosforilam ERK1 e ERK2 ativando-as; estas proteínas quando ativadas são translocadas ao núcleo onde ativam fatores de transcrição como TCF

(fator do complexo ternário), ELK-1, SAP-1a (proteína acessória de resposta a soro), c-MYC, e c-FOS. Desta forma a via das MAPK-ERK modula a expressão gênica em resposta a um estímulo inicial (fatores de crescimento, insulina) promovendo o crescimento, diferenciação celular ou mitose (revisado por Cargnello e Roux, 2011; McCain, 2013).

A via de p38 é ativada por *stress*, radiação UV, lipopolissacárideos (LPS), alto *stress* osmótico, e citocinas pró-inflamatórias, como IL-1. A proteína p38 α foi a primeira a ser isolada e caracterizada como uma proteína de 38 kDa que sofre fosforilação nos resíduos de tirosina em resposta à estimulação por LPS (revisado por Cuadrado e Nebreda, 2010). Atualmente estão descritas quatro variantes de p38 que resultam do processamento alternativo: p38 α , p38 β , p38 γ , e p38 δ . Dentre estas, as proteínas p38 α e p38 β são expressas constitutivamente, por outro lado as isoformas p38 γ e p38 δ são diferencialmente expressas dependendo do tecido. Foi demonstrado que a ativação da via de p38 resulta na fosforilação de alguns fatores de transcrição como ATF-2 (fator de transcrição ativador 2), NF- κ B e GADD153 (fator de transcrição 153 de parada de crescimento e dano ao DNA). Esta via induz os seguintes processos biológicos: apoptose, diferenciação, sobrevivência, proliferação, inflamação, além de outras respostas ao *stress* (revisado por Cuadrado e Nebreda, 2010; Zhang e Liu, 2002).

A cascata de sinalização de JNK está envolvida em múltiplos processos fisiológicos celulares como a morfogênese embrionária, a morte celular programada, diferenciação do sistema hematopoiético, e sobrevivência. A ativação desta via em condições patológicas pode gerar a doença de Parkinson, e acidentes cerebrovasculares. A proteína JNK pode se ligar aos domínios de ativação aminotermiais dos fatores de transcrição c-JUN em resíduos de serina. A transativação de c-JUN induz uma expressão aumentada de genes que possuem elementos de ligação à AP-1 em seus promotores, como o próprio c-JUN. Outros

substratos de JNK incluem o ATF-2, ELK-1, p53, SAP-1a, JUN B, e JUN D (Cui *et al.*, 2007; Rawlings *et al.*, 2004; Zhang e Liu, 2002).

Figura 5. Representação esquemática das vias de sinalização mediadas por MAPK (adaptada de Jeffrey *et al.*, 2007).

1.8b Via de sinalização celular mediada por de PI3K/AKT

A via de PI3K/AKT (fosfatidil inositol-3 quinase) está composta por uma família de quinases lipídicas. Nesta via, a ativação de RTK resulta em autofosforilação em resíduos de tirosina. Em seguida, a proteína PI3K é recrutada à membrana pela associação aos resíduos de fosfotirosinas dos receptores, ou através do domínios SH2 de moléculas

adaptadoras, resultando na ativação alostérica da subunidade catalítica da proteína PI3K, e produção do mensageiro secundário PIP3 (fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato). Esta molécula por sua vez recruta a proteína AKT até a membrana plasmática onde é ativada pela quinase-1 dependente de PDK1 (Piruvato desidrogenase quinase), e pelo complexo de mTORC2 (alvo da rapamicina em mamíferos 2) (Mendoza *et al.*, 2011). A proteína AKT ativa regula alvos celulares que controlam a sobrevivência celular, crescimento, angiogênese, síntese de proteínas, metabolismo, ou proliferação (revisado por Hemmings e Restuccia, 2015).

Alterações em ambas as vias de sinalização mediadas por MAPK ou PI3K/AKT podem levar ao desenvolvimento e progressão do câncer. Nos tumores associados à atividade anormal nas vias de sinalização mediadas por MAPK podem ser observadas mutações em RTK (superexpressão ou ativação do receptor), ou mutações nos oncogenes RAS e B-RAF (Dhillon *et al.*, 2007; Kim e Choi, 2010). No que concerne à via de sinalização mediada por PI3K/AKT, as alterações mais importantes observadas em tumores ocorrem no gene *PI3K*, que está localizado na região cromossômica 3q26. Tem sido observado que esta região está frequentemente amplificada em muitos cânceres humanos como o câncer de ovário e cervical (Ma *et al.*, 2000; Shayesteh *et al.*, 1999).

Objetivos e Justificativa

2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

Foi observado que a proteína E6 de HPV-16 estimula a via de transdução de sinal mediada por MAPK (Pérez-Plasencia *et al.*, 2007) e que esta via está mais ativa em células expressando a proteína E6 da variante E-350G (ou L83V) quando comparado à variante E-P (Chakrabarti *et al.*, 2004). As vias de sinalização mediadas por MAPK amplificam e integram sinais de diversos estímulos de maneira a obter uma resposta fisiológica adequada no que concerne à proliferação celular, diferenciação, desenvolvimento, além de respostas inflamatórias e apoptose em células de mamíferos.

Pelo exposto, o presente estudo objetivou analisar o impacto da expressão das proteínas E6/E7 de três diferentes variantes moleculares de HPV-16 (E-P, AA, E-350G) nas vias de transdução de sinal mediadas por MAPK e PI3K/AKT. Ademais foram analisados os potenciais de transformação, migração, e invasão de PHKs imortalizados pelas diferentes variantes moleculares de HPV-16. Finalmente, foi analisada a cooperação entre E6/E7 das variantes AA e E-350G de HPV-16 e o oncogene c-MYC na transformação celular.

2.1 Objetivos específicos

- 1) Analisar os níveis de ativação de proteínas envolvidas na via de MAPK-ERK (MEK1, MEK2, ERK1, ERK2) em PHKs imortalizados com E6/E7 de três diferentes variantes moleculares de HPV-16 (AA, E-P, E-350G).
- 2) Analisar os níveis de ativação de proteínas envolvidas nas vias de MAPK-p38, (p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ), e JNK nos PHKs imortalizados com E6/E7 de três diferentes variantes moleculares de HPV-16 (AA, E-P, E-350G).

- 3) Analisar os níveis de ativação de proteínas envolvidas na via de PI3K/AKT (AKT1, AKT2, AKT3, GSK3 β , p70S6K, mTOR) em PHKs imortalizados com E6/E7 de três diferentes variantes moleculares de HPV-16 (AA, E-P, E-350G).
- 4) Estudar o impacto da ativação das proteínas envolvidas nas vias de sinalização mediadas por MAPK e PI3K/AKT sobre a ativação de diferentes fatores de transcrição.
- 5) Analisar o potencial de migração, invasão e transformação celular dos PHKs imortalizados com E6/E7 de três diferentes variantes moleculares de HPV-16 (AA, E-P, E-350G).

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E METODOS

3.1 Construção e cultivo das linhagens celulares

Os oncogenes *E6/E7* de três variantes moleculares de HPV-16 (E-P, AA e E-350G) foram clonados no vetor retroviral pLXSN. Este consiste de um vetor de aproximadamente 5,8 Kb, sendo o transgene (X) regulado pela LTR retroviral (L), e o gene que confere resistência à neomicina (N) regulado promotor de SV40 (S).

Foram analisadas células transduzidas com *E6/E7* da variante protótipo do ramo Europeu (E-P), da variante Européia contendo apenas uma substituição (E-350G) (gene *E6*: T350G, aa 83 Leu-Val), e da variante do ramo Asiático-Americano (AA) (gene *E6*: G145T, T2860A, A289G, C335T, T350G, A532G; aa 14 Gln-His, aa 78 His-Tir, aa 83 Leu-Val; gene *E7*: T732C, T789C, T795G). Como controle foi utilizado um extrato protéico proveniente de queratinócitos humanos primários não infectados.

Foram utilizados 15µg de cada plasmídeo para transfectar células ecotrópicas Bosc23 por electroporação. Após 48 horas, os sobrenadantes celulares das células Bosc23 transfectadas foram utilizados para transduzir as células anfotrópicas Am-12 na presença de 10 µg/ml de polibreno (Sigma Aldrich, Missouri, EUA), e após 48 horas as células foram selecionadas com 500 µg/ml do antibiótico G418 (Life Technologies, Califórnia, EUA). As células Bosc23 e Am-12 foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Invitrogen, Califórnia, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino (FBS) e antibióticos (D10).

Os títulos virais foram estimados utilizando o ensaio de formação de colônias em células NIH3T3 (Ausubel *et al.*, 2001). Quantidades iguais de partículas (MOI=10) contendo os retrovírus das diferentes variantes moleculares foram utilizadas para transduzir queratinócitos humanos primários oriundos de recém-nascidos (PHKs) em passagem dois em três experimentos independentes. Em seguida, as células foram selecionadas com 200

µg/ml de antibiótico G418 por uma semana. Nesta etapa as colônias de cada infecção independente foram misturadas e passadas até passagem seis, para obter um *pool* de células. Foi utilizado um promotor retroviral (LTR) para facilitar a normalização dos níveis protéicos de E6/E7 entre as três variantes estudadas.

Os PHKs foram obtidos da Clonetics, NJ, EUA, e foram cultivados em meio específico, meio livre de soro para queratinócitos (KSFM, *keratinocyte serum free medium*), suplementado com 5 ng/ml de fator de crescimento epidérmico (EGF), e 50 µg/ml do extrato de pituitária bovino (BPE, Invitrogen, Califórnia, EUA). Os queratinócitos transduzindo as oncoproteínas virais de HPV-16 também foram cultivados nesse meio específico.

Os PHKs em passagem seis foram plaqueados em baixa densidade (500 células) em placas de 10 cm em quadriplicada. Após 14 dias em cultura, duas placas foram coradas com hematoxilina para poder contar as colônias de células formadas, e as outras duas placas foram utilizadas para o isolamento de colônias. Foram isoladas três colônias de cada infecção (nove no total) dos PHKs infectados com cada variante molecular de HPV-16, e estas colônias foram independentemente e continuamente passadas até senescência ou até passagem 30 (consideradas imortalizadas) (Halbert *et al.*, 1991). Em seguida, as células transduzidas foram crescidas até as passagens p5 ou p30 quando um número idêntico de células de diferentes colônias (~5-6) foi misturado e as células crescidas até confluência. Estes experimentos foram realizados anteriormente ao início deste projeto (Sichero *et al.*, 2012b).

A fim de inibir a via de sinalização MAPK-ERK, os PHKs imortalizados com E6/E7 das diferentes variantes moleculares, além dos PHKs não-infectados, foram cultivados por 30 minutos na presença de 10-15 µM de U0126 (Promega, Wisconsin, EUA), que consiste de um inibidor da atividade quinase de MEK1/2.

3.2 Western blot

Para avaliação dos níveis de proteínas envolvidas nas vias de sinalização mediadas por MAPK e PI3K/AKT, as células foram cultivadas previamente por duas horas em meio carenciado de EGF e BPE, uma vez que foi observado que nestas condições de cultivo, ocorre autofosforilação contínua de EGFR em três resíduos de fosforilação distintos, associado a um maior recrutamento de moléculas adaptadoras como GRB2, a maior sinalização da via das MAPK, e pelo exposto facilita-se a observação da ativação desta via (Spangle e Munger, 2013).]

A proteína total dos PHKs expressando *E6/E7* das diferentes variantes moleculares de HPV-16, além dos PHKs não infectados foi extraída. Para isso os precipitados celulares foram lavados uma vez com PBS (tampão fosfato salino) gelado, centrifugados, e os lisados celulares foram extraídos por incubação em gelo por 30 minutos com tampão RIPA (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5% deoxicolato de sódio, 0,1% SDS, e 1% NP-40, contendo um coquetel de inibidores de protease e fosfatase, Roche, Basel, Suíça), e posteriormente centrifugados por 15 minutos a 12.000 rpm, a 4°C. Seguiu-se a quantificação da proteína utilizando-se o reagente de Bradford (Bio-Rad, Califórnia, EUA). A proteína nuclear foi extraída utilizando-se o *Nuclear Extraction Kit* (Affymetrix USB, Califórnia, EUA), de acordo com as instruções do fabricante, e quantificada utilizando o ácido bicinonínico (BCA, BioAgency, São Paulo, Brasil). Foram fracionados em SDS-PAGE entre 60 µg e 100 µg dos extratos protéicos ou nucleares, e posteriormente transferidos para membranas de PVDF (fluoreto de polivinilideno, GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, Inglaterra).

Os anticorpos primários utilizados foram: anti-p16 (Abcam, Massachusetts, EUA) (diluição 1/1.000, 16123); anti-E6 de HPV-16 (Arbor Vita Corporation, Califórnia, EUA) (1,8µg/mL, AVC#1006); anti-β-catenina (Abcam, Massachusetts, EUA) (diluição 1/2.500,

ab32572); anti-MEK1 fosforilado (Abcam, Massachusetts, EUA) (diluição 1/500, ab131342); MEK1 total (Abcam, Massachusetts, EUA) (diluição 1/500, ab32091); anti-MEK2 fosforilado (Abcam, Massachusetts, EUA) (diluição 1 /500, ab30622); MEK1 total (Abcam, Massachusetts, EUA) (diluição 1/500, ab32517); anti-E-caderina (Abcam, Massachusetts, EUA) (ab1416, diluição1/500); anti- vimentina (Abcam, Massachusetts, EUA) (ab8978, diluição1/1.000); e anti c-MYC (Abcam, Massachusetts, EUA) (ab69987, diluição 1/500). Para a normalização dos níveis protéicos totais as membranas foram adicionalmente incubadas com anticorpo anti- α -tubulina (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) (diluição 1/5.000, T9026), ou anti- β -actina (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) (diluição 1/1000, A2228). Para a normalização dos níveis protéicos nucleares, as membranas foram adicionalmente incubadas com anticorpo anti-TBP (proteína ligante a TATA)(diluição 1/1000, ab518) (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA).

Os anticorpos primários foram diluídos em solução TBS-T (tampão salino Tris com Tween 20 a 0,1%). As membranas foram incubadas por 16 horas a 4°C, sob agitação em gangorra. Após a lavagem para remover o anticorpo primário não ligado, as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário específico conjugado à peroxidase: anti-IgG de camundongo (Jackson ImmunoResearch, Pensilvânia, EUA) (diluição 1/5.000), ou anti-IgG de coelho (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, Inglaterra) (diluição 1/5.000). Os sinais foram revelados utilizando o Amersham ECL™ *Western Blotting Detection Reagents* (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, Inglaterra) no equipamento ImageQuantLAS4.000 (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, Inglaterra). As bandas observadas foram quantificadas utilizando-se o *software* ImageQuant TL 8.1 (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, Inglaterra).

3.3 Microarranjo de anticorpos

Os níveis de fosforilação das diferentes proteínas celulares envolvidas nas vias de sinalização mediadas por MAPK (MAPK-ERK, -p38, -JNK) obtidos das células cultivadas previamente por 2 horas em meio carenciado de FBS e BPE foram também medidos utilizando-se o *Human Phospho-MAPK Array Kit* (R&D Systems, Minneapolis, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Este microarranjo consiste de membranas de nitrocelulose em que anticorpos de captura selecionados estão imobilizados em duplicata. Utilizando-se esta metodologia é possível avaliar simultaneamente a fosforilação relativa de 24 quinases envolvidas nas vias de sinalização mediadas por MAPK.

Adicionalmente, o *Phosphotracer ERK1/2 (pT202/Y204)+p38 MAPK (pT180/Y182)+JNK1/2/3(pT182/Y185)ELISA kit* (Abcam, Massachusetts, EUA) foi utilizado para avaliação dos níveis de fosforilação de ERK1/2 fosforilado. Este método consiste de um imunensaio, com a particularidade de que neste sistema o analito e os reagentes do ensaio, incluindo o anticorpo, são adicionados na placa simultaneamente. Após 16 horas, os imunocomplexos contendo os anticorpos ligados às proteínas fosforiladas são detectados.

Para ambas as metodologias foram utilizados extratos protéicos de três extrações independentes dos PHKs transduzidos ou não com *E6/E7* das diferentes variantes moleculares de HPV-16 apenas em passagem alta ($p > 100$).

3.4 Imunofluorescência

Inicialmente, 1×10^5 células foram plaqueadas sobre lamínulas de vidro estéreis em placas de 24 poços. Após 24 horas o meio de cultivo foi aspirado, as células foram lavadas com PBS 1X, e em seguida fixadas com 300 μ L de paraformaldeído (2-4%) (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 15 minutos. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS

1X, e permeabilizadas com 300 μ L PBS/Triton 0,2% por 5 minutos, sendo em seguida realizado o bloqueio dos sítios inespecíficos utilizando-se PBS/BSA 5% por 1 hora, a temperatura ambiente, em câmara úmida. Em seguida, as células foram incubadas com o anticorpo primário anti- β -catenina (Abcam, Massachusetts, EUA) (diluição 1/200, ab32572) diluído em PBS-BSA 1%, à 4°C durante 16 horas. Após esse tempo, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1X por 10 minutos, e em seguida incubadas com o anticorpo secundário anti-*rabbit* conjugado com Alexa 488 (Thermo Fisher Scientific, Califórnia, EUA) (A10235, diluição 1/500) diluído em PBS-BSA por 2 horas. As células foram concomitantemente incubadas com o agente intercalante de DNA Hoechst (Thermo Fisher Scientific, Califórnia, EUA) na concentração de 25 μ g/ml. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com PBS-BSA 1% por 10 minutos e as lâminas foram preparadas utilizando-se meio de montagem com glicerol e PBS 1X em proporções iguais (1:1). As lâminas foram seladas com esmalte de unha e guardadas protegidas da luz à 4°C. As imagens foram capturadas em microscópio confocal Zeiss LSM 510 META (Zeiss, Jena, Alemanha) e analisadas com auxílio do programa *Zeiss LSM Image Browser Version 3,2,0,115* (Zeiss, Jena, Alemanha).

3.5 Atividade dos fatores de transcrição

A atividade de fatores transcrição selecionados foi analisada em extratos protéicos nucleares dos queratinócitos imortalizados pelas diferentes variantes moleculares de HPV-16 e cultivados em KSFM carenciado de EGF e BPE por duas horas. Os níveis de c-MYC nas diferentes células foi avaliado por *Western blot*.

A ativação de NF- κ B, c-JUN e ATF2 foi avaliada utilizando-se o *NF- κ B p50/p65 Transcription Factor Assay kit* (Abcam, Massachusetts, EUA), o *c-Jun pSer73 + Total PhosphoTracer ELISA kit* (Abcam, Massachusetts, EUA), e o *ATF2 (pT69/pT71)*

Transcription Factor Assay kit (Abcam, Massachusetts, EUA), respectivamente. Este consiste de um ensaio de ELISA que substitui o ensaio de mobilidade eletroforética (EMSA). Neste ensaio é utilizada uma sequência de DNA dupla fita (dsDNA) que contém um elemento de resposta a NF-κB ou ATF-2 imobilizado nos poços de placas de 96 poços. É adicionado o extrato nuclear para que as diferentes subunidades de NF-κB ou ATF2 liguem-se às sequências de DNA imobilizadas, sendo em seguida reconhecidos por anticorpos específicos. Em seguida se adiciona o anticorpo secundário conjugado a *horseradish peroxidase* (HRP) que permite a detecção colorimétrica a 450 nm.

3.6 Ensaio de proliferação celular

Foram plaqueados 1×10^5 PHKs imortalizados ou não com as três variantes moleculares de HPV-16 em placas de 6 poços. As células foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ por aproximadamente 24 horas. O momento do plaqueamento foi estipulado como tempo zero (t=0). As células foram contadas após 24, 48 e 72 horas em triplicatas utilizando-se o *Countess™ automated cell counter* (Invitrogen, Massachusetts, EUA). O tempo de duplicação celular foi avaliado para todas as linhagens utilizando-se o programa disponível no sítio <http://www.doubling-time.com/compute.php>.

3.7 Ensaio de crescimento independente de ancoragem

Os PHKs imortalizados por E6/E7 das diferentes variantes moleculares de HPV-16 e cultivados até passagem >100 foram analisados quanto a sua habilidade em formar colônias quando crescidos em meio semi-sólido uma vez que o crescimento independente de ancoragem (crescimento em *soft* ágar) é uma maneira bastante utilizada de detecção de células transformadas (Androphy *et al.*, 1985). Como controle negativo, estes experimentos foram paralelamente conduzidos em PHKs não infectados. Foram

plaqueadas 7.000 células embebidas em agarose de baixa resolução (Invitrogen, Massachusetts, EUA) 0,5% em KSFM, em placas de 12 poços previamente cobertas por agarose 1%. Após 20 dias em que o meio de cultura foi trocado a cada 48 horas, as colônias formadas foram coradas com uma solução de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 1mg/ml (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA), e incubadas em 5% CO₂ à 37°C, por 3h. A aquisição das imagens foi realizada com o auxílio de câmera de 5mplx. Os experimentos foram realizados três vezes em sextuplicatas.

3.8 Ensaio de migração celular

O ensaio de cura ferida (*wound healing*) permite o estudo da migração celular ao longo do tempo. Para estes experimentos 500.000 células foram plaqueadas em placas de 12 poços por 24 horas até a confluência de ~90-100%. Foi acrescentada 10 µM mitomicina C (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) por 6 horas antes da realização de um risco com uma ponta de ponteira de pipeta de 200 µl. A adição de mitomicina C foi realizada com o intuito de bloquear a proliferação celular, e desta forma, poder atribui exclusivamente ao fenômeno de migração o fechamento da ferida produzida pela ponteira. Após a realização do risco, as células foram cultivadas em meio KSFM com mitomicina C, e após 6 horas observadas em microscópio Primo Vert (Zeiss, Jena, Alemanha). A área aberta de cobertura do risco foi medida utilizando-se o *software Zeiss LSM Image Browser Version 3,2,0,115* (Zeiss, Jena, Alemanha). Foram comparadas as medidas das áreas abertas do risco em dois tempos diferentes (t=0, e t= 6hrs).

3.9 Ensaio de invasão celular

O potencial invasivo dos PHKs imortalizados pelas diferentes variantes moleculares de HPV-16 foi medido utilizando-se um ensaio de alta sensibilidade que

utiliza uma matriz de colágeno (QCM *High sensitivity non-cross-linked collagen invasion assay*, Millipore, Darmstadt, Alemanha) seguindo as regras do fabricante. Neste ensaio emprega-se um colágeno *non-cross-linked* que permite níveis mais elevados de invasão celular e tem sido utilizado para a análise de migração de células moderadamente invasivas. Em resumo, após hidratação por 30 minutos da matriz de colágeno com meio KSFM carenciado de EGF e BPE, foram acrescentadas 250.000 células em cada poço em meio KSFM carenciado de EGF e BPE. A fim de estimular a invasão, foi colocado do lado de fora dos insertos contendo o colágeno e as células, meio KSFM acrescido de 15% FBS. Após 24 horas as células foram coradas com o corante fornecido por 20 minutos, e as células da parte interna do inserto foram removidas delicadamente com cotonete. Os insertos foram colocados em meio de extração fornecido por 25 minutos e em seguida, a capacidade de migração de cada linhagem foi analisada indiretamente por medida de absorbância a 560 nm.

3.10 Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o t-teste de Student não pareado e com duas caudas no *software* Microsoft Excel. As diferenças foram consideradas de estatisticamente significativas apenas quando $p < 0,05$.

3.11 Considerações éticas

O presente projeto de estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Protocolo de Pesquisa N° 248-13) (Anexo 1).

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização dos queratinócitos imortalizados por diferentes variantes de HPV-16.

Neste estudo foi comparada a atividade biológica de três variantes moleculares de HPV-16 (E-P, AA, E-350G) caracterizadas por mutações aminoacídicas em E6 (Tabela 1). As variantes escolhidas apresentam uma (E-350G) e três (AA) substituições de aminoácido na proteína E6 em comparação com a sequência protótipo; no que concerne à proteína E7, as alterações encontradas são todas conservativas. Foram escolhidas estas três variantes por serem as mais prevalentes na região cervical das mulheres envolvidas no estudo epidemiológico Ludwig/McGill sobre a história natural das infecções por HPV em mulheres conduzido no Brasil (Sichero *et al.*, 2007a).

Tabela 1. Variação nucleotídica e de aminoácido das variantes moleculares de HPV-16. As sequências de E6 e E7 das variantes E-350G e AA foram comparadas às da variante E-P (Sichero *et al.*, 2012b).

	posição nt E-P	aa E-P	AA	E-350G
E6	109T	2 Phe	.	.
	132G	10 Arg	.	.
	143C	14 Gln	.	.
	145 G	14 Gln	T (His)	.
	286 T	61 Ala	A	.
	289 A	62 Val	G	.
	335C	78 His	T (Tyr)	.
	350T	83 Leu	G (Val)	G (Val)
	403A	100 Leu	.	.
	532A	143 Ser	G	.
E7	607C	16 Gln	.	.
	647A	29 Asn	.	.
	732T	57 Phe	C	.
	789T	76 Ile	C	.
	795T	78 Thr	G	.

Com o objetivo de confirmar a expressão de E6/E7 nos PHKs transduzidos com as diferentes variantes moleculares de HPV-16, foram realizados ensaios de *Western blot* para a análise dos níveis da proteína E6, da proteína inibidora de ciclina dependente de quinase p16, e de p53. Como já foi mencionado, a proteína pRB é regulada negativamente pela proteína p16, e a degradação de pRB induzida por E7 resulta na superexpressão de p16. Ademais, p53 é um dos alvos de E6 de HPV de alto risco oncogênico que induzem sua degradação (Thomas *et al.*, 1999). Foram utilizados extratos protéicos dos PHKs imortalizados em passagem >100, além de PHK não infectados em passagem 2. A expressão de tubulina nas diferentes células foi utilizada como controle da carga protéica. Na figura 6A, está apresentado um experimento representativo de dois ensaios realizados para análise de E6, e um experimento representativo de três realizados para as análises de p16 e p53. O marcador de peso molecular Kaleidoscope™ (Bio-Rad, Califórnia, EUA) foi utilizado em cada gel.

Conforme esperado foram detectados níveis aumentados de E6 nos PHKs transduzidos com E6/E7 independentemente da variante molecular de HPV-16 quando comparado às células não infectadas (Figura 6A). Adicionalmente, a expressão de E6 foi analisada indiretamente pela avaliação dos níveis de p53. Conforme apresentado na figura 6B os níveis de p53 em células transduzidas com E6/E7 das três variantes moleculares do HPV-16 em passagens baixas estão diminuídos em comparação ao PHK normal. Adicionalmente, foram avaliados os níveis de p53 fosforilado (forma ativa) em PHKs imortalizados em passagem alta, e como era esperado foi observada uma redução de p53 nas células transduzidas com as três variantes de HPV-16 (Figura 6C).

Figura 6. Caracterização dos queratinócitos primários expressando E6/E7 de três diferentes variantes moleculares de HPV-16. (A) Expressão de E6 e p16 medida por *Western blot* em PHKs transduzidos com E6/E7 de diferentes variantes moleculares de HPV-16 em passagens altas ($p > 100$), além dos PHKs não transduzidos. Estão apresentados experimentos representativos de dois e três ensaios realizados para análise de E6 e p16, respectivamente. (B) Expressão relativa dos níveis de p53 detectados por *Western blot* em PHKs em passagens baixas ($p < 15$) transduzidos com E6/E7 das diferentes variantes moleculares de HPV-16 em comparação com as células parentais que foram definidas arbitrariamente como referência e atribuído o valor 1. Os valores foram normalizados pela expressão da proteína actina. Os dados apresentados foram obtidos de dois experimentos independentes. (C) Expressão relativa de p53 fosforilado de PHKs infectados com as três variantes de HPV-16 em passagens altas ($p > 100$) em comparação aos níveis de expressão das células parentais. A expressão foi avaliada utilizando o *Human Phospho-MAPK Array kit* (R&D Systems, Minneapolis, USA) em quatro experimentos independentes. Os resultados foram analisados através do teste estatístico t de Student não pareado e bicaudal e as diferenças significativas estão indicadas por asteriscos ($p < 0.05$).

4.2 Análise dos níveis de ativação de proteínas da via de sinalização MAPK-ERK em queratinócitos imortalizados por diferentes variantes de HPV-16.

Diferenças bioquímicas e biológicas na atividade de E6/E7 das variantes E-P e AA de HPV-16 foram descritas (Lichtig *et al.*, 2006; Sichero *et al.*, 2012b; Zehbe *et al.*, 2009), entretanto os mecanismos moleculares associados a essa variabilidade ainda não estão elucidados. A ativação anormal das vias de sinalização mediadas por MAPK e PI3K/AKT tem um papel muito importante e crítico no desenvolvimento e progressão ao câncer (revisado por Kim e Choi, 2010) e por esta razão foi avaliado o estado de fosforilação de vários componentes destas vias nos PHKs imortalizados pela diferentes variantes de HPV-16.

Foi analisado o nível de proteína fosforilada e total por *Western blot* utilizando-se extratos protéicos dos PHKs imortalizados em passagem >100, além de PHK não infectados em passagem 2. Em relação aos níveis da proteína MEK1 fosforilada (forma ativa) observou-se um aumento nos PHKs expressando E6/E7 da variante molecular AA em relação às outras duas variantes moleculares (E-P, E-350G) analisadas, e aos PHKs não infectados. Por outro lado, o nível total desta proteína foi similar entre todas as células analisadas (Figura 7). Os níveis de MEK2 fosforilado e total medidos também foram similares entre todos os extratos protéicos analisados. Os níveis aumentados de MEK1 fosforilado nos PHKs infectados impactaram sobre a ativação da proteína ERK2, já que é possível verificar maior fosforilação de ERK2 nos PHKs transduzidos com E6/E7 da variante AA em relação aos PHKs transduzidos com as variantes E-P e E-350G (Figura 8 A, B).

Figura 7. Nível das proteínas MEK1 e MEK2 total e fosforilada (ativa) nos queratinócitos imortalizados pelas diferentes variantes moleculares de HPV-16. Foram utilizados extratos protéicos dos PHKs transduzidos com *E6/E7* das diferentes variantes moleculares de HPV-16 (E-P, AA e E-350G), e de PHKs não infectados. Os níveis de tubulina foram utilizados como controle da carga proteica. Está apresentado um experimento representativo de dois ensaios de *Western blot*. O marcador de peso molecular Kaleidoscope™ (Bio-Rad, Califórnia, EUA) foi utilizado em cada gel.

Conforme exposto na introdução, as proteínas ERK fosforiladas regulam a ativação de alvos celulares no citoplasma como RSK6 (quinase S6 ribossomal), e MSK (quinases ativadas por mitógenos e stress). Uma vez fosforiladas estas proteínas são capazes de se translocar ao núcleo e regular a transcrição de fatores de transcrição (revisado por Cargnello e Roux, 2011). Interessantemente, observou-se maior ativação de MSK2 nos PHKs imortalizados pela variante molecular AA sendo a diferença estatisticamente significativa em comparação aos PHKs transduzidos com a variante molecular E-350G (Figura 8C).

No que concerne à proteína RSK1, os PHKs imortalizados pela variante AA do HPV-16 apresentam maiores níveis de fosforilação da proteína RSK1 em relação às outras duas variantes, embora a diferença com a variante E-P foi marginalmente significativa ($p=0,061$) (Figura 8C).

Figura 8. Níveis de fosforilação de proteínas celulares envolvidas na via de MAPK-ERK nos queratinócitos imortalizados pelas diferentes variantes moleculares de HPV-16. (A) ERK1 e ERK2, forma fosforilada. (B) ERK1/2, forma fosforilada. (C) RSK1, RSK2, e MSK2, forma fosforilada. Em A e C, os níveis das proteínas fosforiladas foi avaliado utilizando-se o *Human Phospho-MAPK Array kit* (R&D Systems, Minneapolis, EUA). Em B os níveis das proteínas ativadas foi avaliado utilizando-se o *Phosphotracer ERK1/2 (pT202/Y204)+p38 MAPK (Pt180/Y182)+JNK1/2/3(Pt182/Y185) ELISA kit* (Abcam, Massachusetts, EUA). Foi utilizado como referência os níveis das diferentes proteínas em PHKs não infectados na passagem 4 arbitrariamente definido como referência e atribuído o valor 1. Os experimentos foram realizados em quadruplicada, sendo que os anticorpos contra cada proteína celular estão imobilizados em duplicata. Os resultados foram analisados através do teste estatístico t de Student não pareado e bicaudal e as diferenças significativas estão indicadas por asteriscos ($p < 0.05$).

4.3 Análise dos níveis de ativação de proteínas das vias de sinalização mediadas por MAPK-p38, JNK, e PI3K/AKT em queratinócitos imortalizados por diferentes variantes moleculares de HPV-16.

Conforme já descrito, existem quatro isoformas de p38 oriundas de processamento alternativo: p38 α , p38 β , p38 γ , e p38 δ . Todas estas isoformas podem ser fosforiladas pela MKK6 (proteína quinase quinase ativada por mitógeno 6). Ainda mais, algumas isoformas são especificamente ativadas por algumas quinases como por exemplo a MKK3 (proteína quinase quinase ativada por mitógenos 3) ativa somente as isoformas α , γ e δ .

Foram analisado os níveis de fosforilação de diversas proteína utilizando-se *Human Phospho-MAPK Array kit* (R&D Systems, Minneapolis, EUA) e extratos protéicos dos PHKs imortalizados em passagem >100, além de PHK não infectados em passagem 2. Foram observadas diferenças na fosforilação de proteínas efetoras da cascata MAPK-p38 (Figure 9A): os PHKs transduzidos com a variante AA do HPV-16 apresentaram níveis mais altos das proteínas MKK6 e MKK3 fosforiladas. Surpreendentemente, os níveis aumentados destas proteínas tiveram pouco impacto na ativação das proteínas efetoras *downstream* nesta via de sinalização. Observou-se que a ativação da isoforma p38 γ foi maior nos PHKs infectados com a variante AA, mas a diferença foi estatisticamente significativa somente em relação aos PHKs imortalizados pela variante E-350G.

A

B

C

Figura 9. Expressão de proteínas celulares envolvidas na via de MAPK-p38 (A), PI3K/AKT (B), e JNK (C), nos queratinócitos imortalizadas pelas diferentes variantes moleculares de HPV-16. Os níveis protéicos foram analisados utilizando-se o *Human Phospho-MAPK Array kit* (R&D Systems, Minneapolis, EUA). Níveis de ativação das proteínas alvo em PHKs transduzidos com E6/E7 das diferentes variantes moleculares de HPV-16 (E, AA e E-350G) em passagem alta (p>100) além de PHKs (queratinócitos humanos primários) não infectados. Foi utilizado como referência os níveis das proteínas em PHKs não infectados na passagem 4 arbitrariamente definido como referência e atribuído o valor 1. Os experimentos foram realizados em quadruplicata, sendo que os anticorpos contra cada proteína celular estão imobilizados em duplicata. Os resultados foram analisados através do teste estatístico t de Student não pareado e bicaudal e as diferenças significativas estão indicadas por asteriscos (p<0.05).

A proliferação e sobrevivência celular são também reguladas pela via de sinalização mediada por PI3K/AKT, e a ativação anormal desta via pode estar envolvida no desenvolvimento de câncer. Na figura 9B, observa-se um aumento nos níveis de fosforilação da proteína AKT2 nas células imortalizadas pela variante AA, sendo que o aumento foi estatisticamente significativo quando comparado com a variante E-350G. Observou-se que o aumento na fosforilação de AKT2 nos PHKs imortalizados pela variante AA se correlacionou com o aumento dos níveis da forma fosforilada da proteína GSK-3 β (glicogênio sintase quinase 3B), e com um pequeno aumento na fosforilação da proteína efectora p70S6 (proteína quinase S6 ribossômica).

A via de transdução de MAPK-JNK representa um grupo de quinases que são ativadas principalmente por citocinas e exposição ao *stress* ambiental. Alvos da via de sinalização JNK incluem os fatores de transcrição AP-1 (proteína ativadora 1) e c-JUN. Conforme pode ser observado na figura 9C, os PHKs imortalizados pela variante E-P de HPV-16 apresentaram maior fosforilação da isoforma JNK1 em relação às células imortalizadas pelas outras variantes, sendo a diferença estatisticamente significativa. Por outro lado as isoformas JNK2 e JNK3 não apresentaram diferenças nos níveis de fosforilação entre os PHKs imortalizados pelas diferentes variantes.

4.4 Análise dos níveis de β -catenina nos queratinócitos imortalizados por diferentes variantes moleculares de HPV-16.

A atividade anormal da proteína GSK-3 β tem sido associada ao desenvolvimento de câncer, e a fosforilação desta proteína por diferentes quinases como AKT, MAPK conduzem à sua inativação (Luo, 2009). A inativação de GSK-3 β induz a via canônica da Wnt/ β -catenina, sendo a β -catenina estabilizada e translocada ao núcleo onde regula a expressão de genes envolvidos na promoção do fenótipo EMT e na migração celular (revisado por McCubrey *et al.*, 2014). Atualmente alguns estudos mostram que em lesões

cervicais de alto grau e no câncer cervical, o acúmulo de β -catenina nuclear está associado com a maior ativação da via de Wnt/ β -catenina (Rath *et al.*, 2015). No presente estudo foi avaliada a expressão de β -catenina pela metodologia de *Western blot* utilizando-se extrato protéico nuclear e total dos PHKs imortalizados pelas diferentes variantes de HPV-16 (p>100), além dos PHKs não-infectados em passagem 2. Conforme apresentado na figura 10, foi observada maior expressão de β -catenina total nos PHKs não infectados em relação às três linhagens de PHKs imortalizadas com HPV-16, para as quais não se observou diferenças entre as diferentes variantes de HPV-16. Adicionalmente, os níveis de expressão de β -catenina nuclear eram menores que os de β -catenina total e semelhantes entre todas as células analisadas, embora se observe um discreto aumento nos PHKs imortalizados pela variante AA de HPV-16 (Figura 10) Na figura está apresentado um experimento de dois experimentos independentes realizados.

Adicionalmente, a localização celular da β -catenina foi avaliada por imunofluorescência (Figura 11). Foi observado que tanto nos PHKs não infectados quanto nos PHKs imortalizados pelas variantes AA e E-350G, a β -catenina tende a localizar-se na membrana plasmática. Por outro lado, nos PHKs imortalizados pela variante E-P, a β -catenina parece estar mais distribuída pelo citoplasma. Além disso, também se observa β -catenina no núcleo de todas as células analisadas. Assim, de modo geral, observou-se β -catenina tanto no núcleo quanto no citoplasmática em todas as células analisadas.

Figura 10. Expressão de β -catenina em extratos proteicos total e nuclear dos queratinócitos imortalizados pelas diferentes variantes moleculares de HPV-16. Foram analisados por *Western blot* os níveis protéicos de β -catenina total e nuclear nos PHKs imortalizados pelas diferentes variantes moleculares de HPV-16 (E, AA e E-350G), além de PHKs não-infectados. Este é um experimento representativo de dois experimentos independentes.

Figura 11. Distribuição celular de β -catenina em queratinócitos imortalizados por diferentes variantes moleculares de HPV-16. Foi analisada por imunofluorescência a localização de β -catenina nos PHKs imortalizados pelas diferentes variantes moleculares de HPV-16 (E, AA e E-350G), além de PHKs não-infectados. Em azul: Hoechst; verde: β -catenina. Estas imagens foram obtidas em microscópio confocal (aumento de 40x).

4.5 Análise dos níveis de ativação de fatores de transcrição em queratinócitos imortalizados por diferentes variantes de HPV-16.

A via de MAPK-ERK fosforila e ativa fatores de transcrição no núcleo, como por exemplo, ELK1, AP-1 (c-FOS e c-JUN), NFκB, c-MYC e ATF-1. Adicionalmente, a via de MAPK-p38 ativa diversos fatores de transcrição, incluindo NFκB e ATF-2, e a via de MAPK-JNK estimula a ativação de fatores como ATF-1, ATF-2, e c-JUN. A ativação diferencial destes fatores é fundamental na determinação do destino da célula: apoptose, sobrevivência ou diferenciação. Pelo exposto, objetivou-se analisar a atividade ou o nível de alguns fatores de transcrição nas células imortalizadas por diferentes variantes HPV-16 que já foram descritos como efetores das vias de sinalização mediadas por MAPK.

Inicialmente, foram analisado os níveis de c-MYC, já que esta proteína mutada ou superexpressa é frequentemente observada em cânceres humanos e foi descrito que a expressão desta estimula a progressão no ciclo celular e a transformação celular (revisado por Vita e Henriksson, 2006). Foi analisada a expressão de c-MYC nos PHKs imortalizados pelas diferentes variantes de HPV-16 (p>100) e nos PHKs não infectados (p2) utilizando-se a metodologia de *Western blot*. Foram realizados três experimentos independentes. Embora esta proteína seja um alvo muito importante da cascata MAPK-ERK, os dados gerados demonstram que os níveis desta proteína foram similares em todas as células imortalizadas por HPV-16, porém foram maiores em comparação aos PHKs não infectados (Figura 12A).

Outro fator de transcrição estudado foi o NF-κB (subunidades p50 e p65), que é normalmente regulado pela via de sinalização mediada por MAPK-p38. A análise da atividade desta proteína foi avaliada utilizando-se o *NF-κB p50/p65 Transcription Factor Assay kit* (Abcam, Massachusetts, EUA) nos PHKs imortalizados pela variantes de HPV-16 (p>100), e nas células normais (p2) em três experimentos independentes. Observou se

não haver diferença na atividade de nenhuma das duas subunidades de NF- κ B entre os PHKs imortalizados pelas diferentes variantes de HPV-16 (Figura 12B).

Também foi analisada a atividade de ATF-2, que é um fator de transcrição regulado prioritariamente pela via de sinalização mediada por MAPK-p38 (Figura 12C), mediante o uso do *ATF2 (pT69/pT71) Transcription Factor Assay kit* (Abcam, Massachusetts, EUA). Esta análise foi realizada utilizando extrato de proteína nuclear oriundos dos PHKs imortalizados pelas variantes de HPV-16 (p>100), e dos PHKs não infectados (p2). Foram realizados três experimentos independentes. É possível observar um aumento discreto na atividade de ATF-2 nas células imortalizadas pela variante AA de HPV-16 em comparação com as outras duas variantes moleculares analisadas (E-P, E-350G), embora a diferença não seja estatisticamente significativa.

Finalmente foi avaliada a atividade do fator de transcrição c-JUN que responde à ativação da via de sinalização mediada por MAPK-JNK. A ativação relativa desta proteína foi analisada em extratos nucleares oriundos dos PHKs imortalizados com as variantes moleculares de HPV-16 (p>100), e os PHKs não infectados (p2) empregando-se o *c-Jun pSer73 + Total PhosphoTracer ELISA kit* (Abcam, Massachusetts, EUA) que é capaz de quantificar os níveis de c-JUN total e fosforilado. Foram realizados três experimentos independentes. Conforme se visualiza na figura 12D não foram observadas diferenças significativa da atividade deste fator de transcrição entre as células imortalizadas pelas diferentes variantes moleculares do HPV-16.

Figure 12. Perfil de expressão e atividade de fatores de transcrição celulares envolvidos nas vias de sinalização mediadas por MAPK e PI3K/AKT nos queratinócitos imortalizados pelas diferentes variantes moleculares de HPV-16. (A) Os níveis de c-MYC foram avaliados por *Western blot*. Na figura está apresentado um experimento de três experimentos independentes. (B) A atividade das subunidades p65 e p50 de NF- κ B foram avaliadas utilizando-se o *NF- κ B p50/p65 Transcription Factor Assay kit* (Abcam, Massachusetts, USA). Foram realizados três experimentos independentes em triplicata. (C) A atividade da proteína ATF-2 foi avaliada utilizando-se o *ATF-2 (pT69/pT71) Transcription Factor Assay kit* (Abcam, Massachusetts, USA). Foram realizados três experimentos independentes em triplicata. (D) Os níveis de ativação relativos de c-JUN foram avaliados utilizando-se o *c-JunpSer73 + Total PhosphoTracer ELISA kit* (Abcam, Massachusetts, USA). Foram realizados três experimentos independentes em triplicata. Os resultados foram analisados através do teste estatístico t de Student não pareado e bicaudal e as diferenças significativas estão indicadas com asteriscos ($p < 0.05$).

4.6 Análise de processos celulares importantes para à carcinogênese em queratinócitos imortalizados por diferentes variantes de HPV-16.

4.6a. Proliferação celular

A proliferação celular é um dos processos biológicos induzidos pelas vias de sinalização mediadas por MAPK. Portanto, neste estudo foi analisada a taxa de proliferação celular por 72 horas dos PHKs imortalizados pelas diferentes variantes de HPV-16 ($p > 100$), e dos PHKs não infectados em passagem 2. Foram realizados três experimentos independentes. Conforme se observa na figura 13, todos os PHKs imortalizados por HPV-16 exibem taxas de proliferação similar entre si, entretanto maior que os PHKs normais. Os tempos de duplicação celular medidos também foram similares entre os PHKs imortalizados por HPV-16 (E-P: 15,5 horas; AA: 14,8 horas; E-350G: 16,8 horas), entretanto menores que o tempo de duplicação dos PHKs não-infectados (24,8 horas).

Figura 13. Curva de proliferação dos queratinócitos imortalizados pelas diferentes variantes de HPV-16. Foram plaqueados 1×10^5 células em placas de 6 poços e a proliferação celular foi avaliada por 72 horas.

4.6b. Migração celular

Para as células tumorais se locomoverem à outros tecidos ou dentro dos mesmos tecidos, estas utilizam processos migratórios muito similares aos utilizados pelas células normais durante os processos de morfogênese embrionária, de cicatrização de ferida e de tráfico de células imunes. A migração celular é um processo complexo que envolve diversos passos, que se inicia com a formação de protrusões de membrana em respostas aos estímulos migratórios e quimioatraentes (revisado por Yamaguchi e Condeelis, 2007). Foi analisada a capacidade de migrar dos PHKs imortalizados pelas diferentes variantes de HPV-16 ($p > 100$) utilizando-se o ensaio de cura de ferida. Durante este experimento foi adicionado ao meio de cultura o inibidor de proliferação celular mitomicina C com o objetivo de somente avaliar a capacidade migratória das células independente da proliferação celular. Foi medida a área aberta da ferida logo após a realização do risco na placa onde as células estavam cultivadas em monocamada e em confluência de ~90%. Foram realizados 4 experimentos independentes nos quais as células foram plaqueadas em triplicata. Os PHKs imortalizados pela variante AA do HPV-16 mostraram uma maior capacidade migratória após 6 horas em comparação às outras duas variantes moleculares, as quais apresentaram capacidades similares de migração (Figura 14A e B).

Figura 14. Migração celular dos queratinócitos imortalizados por diferentes variantes moleculares de HPV-16. (A, B) Foram utilizados PHKs imortalizados pelas diferentes variantes de HPV-16 em passagem >100. Na figura está apresentado um experimento de 4 experimentos distintos em que as células foram plaqueadas em triplicata. A cobertura da ferida foi calculada ao longo do tempo comparando as medidas das áreas abertas do risco de dois tempos diferentes (t=0, t=6 hs). Foi utilizado o teste t de Student não pareado, com duas caudas e diferenças significativas ($p < 0.05$) estão indicadas por asteriscos.

4.6c. Potencial transformante

Uma característica importante das células transformadas consiste na habilidade em crescer independente de ancoragem ao substrato (Mori *et al.*, 2009). Esta condição pode ser mimetizada *in vitro* submetendo as células ao crescimento em meio semisólido. Foi analisada a capacidade de formação de colônias em meio semisólido dos PHKs imortalizados pelas diferentes variantes de HPV-16 em passagens p>100. Para tanto, 7.000 células foram plaqueadas e cultivadas em meio agar semisólido por 20 dias, sendo em seguida corados com solução de MTT. Após a coloração, as colônias formadas foram analisadas macroscopicamente. Foram realizados seis experimentos independentes em triplicatas. Interessantemente, os PHKs imortalizados pela variante AA do HPV-16 formaram colônias maiores quando comparadas às colônias formadas pelas variantes E-P, e E-350G, que formaram colônias menores (Figura 15), muitas das quais não tinham aparência de colônias monoclonais quando analisadas no microscópio em aumento de 10x.

Figura 15. Crescimento independente de ancoragem em PHKs imortalizados pelas diferentes variantes de HPV-16. O ensaio foi realizado plaqueando-se 7.000 células em *soft agar* 0.5% em triplicata, em poços de placas de 12 poços recobertos com *soft agar* 1%. Após 20 dias as colônias foram coradas com MTT. Na figura está apresentado um experimento representativo de seis experimentos independentes.

4.6d. Invasão celular

A metástase ocorre quando as células tumorais se propagam aos tecidos e órgãos adjacentes onde se estabelecem, replicam e formam novos tumores. Este processo ocorre por etapas sequenciais (cascata metastática) que devem ser completados para que as células tumorais consigam metastizar (revisado por Leber e Efferth, 2009). Para que ocorra a invasão, as células tumorais devem ser capazes de perder a adesão celular e assim se dissociarem do tumor primário. Ademais, alterações nas interações matriz-célula devem ocorrer para permitir que as células invadam o estroma celular (van Zijl *et al.*, 2011). Neste estudo foi avaliado o potencial de invasão dos PHKs imortalizados pelas diferentes variantes de HPV-16 em passagem p>100, empregando-se um método sensível que utiliza uma rede de colágeno não reticulada que cria um ambiente mais flexível permitindo que altos níveis de invasão ocorram. Foram utilizadas 250.000 células e foi avaliada a capacidade de invasão da matriz após 24 horas utilizando-se 15% FBS como quimioatratante. Os resultados mostram que os PHKs imortalizados pela variante AA de HPV-16 possuem maior capacidade em invadir através da matriz de colágeno, em comparação às outras duas variantes moleculares analisadas (Figura 16A).

4.6e. Transição epitélio-mesênquima.

A EMT é um processo importante durante o desenvolvimento embrionário, onde as células epiteliais adquirem propriedades mesenquimais, semelhantes aos fibroblastos, e apresentam reduzida adesão intracelular e aumento na mobilidade (Kalluri, 2009; Larue e Bellacosa, 2005). Durante a EMT ocorre a dissociação de diversas junções celulares, com diminuição da expressão de E-caderina, o que facilita as células desligarem-se das células adjacentes e se tornarem aptas para invasão e metástase (revisado por Hanahan e Weinberg, 2011). Uma vez que foi observado que os PHKs imortalizados pela variante AA de HPV-

16 possuem maior capacidade migratória, objetivou-se analisar marcadores de fenótipo EMT nas diferentes linhagens. Para isso foram analisados os níveis de expressão de E-caderina (marcador de célula epitelial) e vimentina (marcador de célula mesenquimal) por *Western blot* em PHKs imortalizados pelas diferentes variantes moleculares de HPV-16 em passagem $p>100$, além dos PHKs não infectados. Estes experimentos foram realizados três vezes. Os níveis de E-caderina observados foram similarmente baixos nos PHKs imortalizados pelas variantes E-P e AA, em comparação à variante E-350G (Figura 16B), e os PHKs não infectados. Por outro lado, os níveis de vimentina observados foram maiores nos PHKs imortalizados com a variante AA em comparação às outras duas variantes de HPV-16. Interessantemente, níveis altos de expressão de vimentina foram observados nos PHKs não infectados, o que pode ser explicado pelo fato destes PHKs serem uma célula parental, e desta forma serem capazes de mimetizar o fenótipo de uma célula tronco indiferenciada.

Figura 16. Invasão celular e fenótipo EMT dos queratinócitos imortalizados pelas diferentes variantes de HPV-16. (A) O potencial invasivo de PHKs imortalizados pelas diferentes variantes de HPV-16 foi avaliado utilizando-se o *QCM High sensitivity non-cross-linked collagen invasion assay* (Millipore, Darmstadt, Alemanha). Foram realizados três experimentos independentes em triplicatas. Foi utilizado o teste t de Student não pareado, com duas caudas e diferenças significativas ($p<0.05$) estão indicadas por asteriscos. (B) Ensaio de *Western blot* utilizando anticorpos anti-E-caderina e anti-vimentina. Está apresentado um experimento representativo de três experimentos independentes realizados.

4.7 Impacto da inibição da via MAPK-ERK sobre a capacidade de migração celular.

A fim de verificar a possível correlação entre o maior potencial oncogênico atribuível à variante AA de HPV-16 e a maior ativação de ERK1/2 observada nos PHKs imortalizados por essa variante, objetivou-se conduzir os ensaios de migração, invasão, e crescimento independente de ancoragem na presença de um inibidor de MEK (U0126). Entretanto, uma vez que foi observado aumento da morte celular após 24 horas de cultivo dos PHKs imortalizados ou não na presença deste composto, somente foi possível realizar os experimentos de migração celular para os quais a área de cobertura da ferida foi medida seis horas depois de realizado o risco nas células crescidas em monocamada. Foi observado que após 30 minutos do tratamento das células com 15 μ M U0126 ocorreu redução dos níveis das proteínas ERK1 e ERK2 fosforiladas (Figura 17A) indicando desta forma que a presença do inibidor resulta na diminuição da ativação dessa cascata de sinalização. Em seguida, foi avaliado o potencial de migração dos PHKs imortalizados pelas variantes de HPV-16 em passagem $p > 100$, mediante o ensaio de cura de ferida na presença ou não de U0126. Foi observada diminuição da migração dos PHKs imortalizados pelas variantes de HPV-16 quando estes foram cultivados na presença do inibidor de MEK, embora a redução não seja estatisticamente significativa nos PHKs imortalizados pela variantes E-350G (Figura 17B).

A

B

Figura 17. Efeito da inibição da via MAPK-ERK sobre a migração celular nos queratinócitos imortalizados pelas diferentes variantes de HPV-16. (A) Inibição relativa da fosforilação de ERK1 e ERK2 nos PHKs imortalizados pelas diferentes variantes moleculares de HPV-16 crescidos na presença de U0126 (15 μ M). Os níveis de fosforilação de ERK1 e ERK2 foram avaliados utilizando-se o *Human Phospho-MAPK Array kit* (R&D Systems, Minneapolis, EUA). Foi realizado apenas um experimento. Cabe ressaltar que os anticorpos estão imobilizados em duplicata nesse microarranjo. (B) Ensaio de migração utilizando o método de cura de ferida na presença ou não do inibidor de MEK (10 μ M). A cobertura da ferida foi avaliada 6 horas após a realização do risco. Foram realizados quatro experimentos independentes em triplicata. Foi utilizado o teste t de Student não pareado, com duas caudas e diferenças significativas ($p < 0.05$) estão indicadas por asteriscos.

Discussão

5. DISCUSSÃO

Estudos prévios mostraram que o risco de desenvolvimento de lesões cervicais de alto grau é maior em mulheres infectadas com variantes não-E de HPV-16 em relação à infecção por variantes do ramo E (Hildesheim *et al.*, 2001; Sichero *et al.*, 2007a; Xi *et al.*, 1997; Zuna *et al.*, 2011). Este estudo objetivou compreender mais detalhadamente os mecanismos associados às diferenças funcionais entre três variantes moleculares de HPV-16 (E-P, AA, E-350G). Mais especificamente, objetivou-se analisar o impacto da expressão das proteínas E6/E7 das diferentes variantes de HPV-16 sobre as vias de transdução de sinal mediada por MAPK e PIK3/AKT incluindo o impacto sobre a ativação de diferentes fatores de transcrição. Ademais foram analisados os potenciais de transformação, migração, e invasão de PHKs imortalizados por essas variantes. Nas variantes selecionadas para análise neste estudo, o gene *E7* apresenta apenas alterações nucleotídicas sinônimas. Por outro lado, o oncogene *E6* apresenta alterações nucleotídicas, que conduzem a alterações de aminoácidos, dentre os quais a substituição de T por G na posição 350, e que resulta na substituição de leucina para valina no aminoácido 83, que foi encontrada em ambas as variantes E-350G e AA. Pelo exposto, as diferenças biológicas observadas entre as três variantes estariam determinadas unicamente pela atividade da oncoproteína E6.

O primeiro estudo a analisar diferenças biológicas de E6 entre três variantes de HPV-16 (E-P, AA, Af-2) identificou substituições de aminoácidos em posições importantes para a ligação e degradação da proteína celular p53, e revelou que a proteína E6 da variante AA é mais eficiente na degradação desta (Stoppler *et al.*, 1996). Posteriormente outros trabalhos analisaram o potencial de degradação de p53 pelas diferentes variantes moleculares em queratinócitos normais humanos imortalizados (NIKs) e PHKs transduzidos com E6 das diferentes variantes de HPV-16, entretanto

diferenças não foram observadas (Asadurian *et al.*, 2007; Zehbe *et al.*, 2009). Outros estudos revelaram diferenças entre algumas variantes de E6 de HPV-16 no que concerne à ligação à E6BP, à proteína hDlg (proteína homóloga de discos), e à proteína pró-apoptótica BAX (Litchig *et al.*, 2006; Zehbe *et al.*, 2009).

Neste trabalho, foram observados níveis equivalentes de E6 nos PHKs imortalizados pelas diferentes variantes moleculares de HPV-16. Adicionalmente observou-se nessas células que a variabilidade das oncoproteínas virais não teve impacto sobre os níveis de p16 e p53 celular (Figura 6). Foi analisada a ativação de quatro vias de sinalização celular: MAPK-ERK, MAPK-p38, MAPK-JNK, e PI3K/AKT, que são vias relacionadas à respostas celulares como proliferação, diferenciação, sobrevivência, apoptose, metabolismo, e migração (revisado por Mendoza *et al.*, 2011). Foi observado que PHKs imortalizados pela variante AA de HPV-16 apresentaram maior ativação destas vias em relação às variantes E-P e E-350G. Foi observado nos PHKs imortalizados pela variante AA maiores níveis de fosforilação (estado ativo) das proteínas quinases MEK1, ERK2, e MSK2 (módulo MAPK-ERK, Figuras 7 e 8), MKK3 e MKK6 (módulo MAPK-p38, Figura 9A), AKT2, GSK-3 β e p70S6K (módulo PI3K/AKT, Figura 9B). No que concerne à via de sinalização de MAPK-JNK, interessantemente foi observada maior ativação de JNK1 nos PHKs imortalizados pela variante E-P. Estes resultados corroboram e estendem dados de um estudo prévio que reportou que em condições de privação de nutrientes, a proteína E6 de HPV-16 induz um aumento na internalização do receptor de tirosina quinases (RTK), e de sua atividade, e desta forma ativa as vias de sinalização PI3K/AKT, mTORC1 e MAPK em um modelo similar ao utilizado no presente estudo (Spangle e Munger, 2013).

Os dados gerados neste estudo demonstram que a variante AA de HPV-16 têm vantagem em relação às outras variantes analisadas em ativar as vias de sinalização

MAPK-ERK, MAPK-P38 e PI3K/AKT. Ao contrário, Chakrabarti e cols (2004), observaram que células HaCat expressando E6/E7 da variante E-350G de HPV-16 apresentou maior atividade da via MAPK-ERK em relação à variante E-P. As diferenças observadas em relação ao presente estudo poderiam ser explicadas em parte pela diferenças nos modelos biológicos utilizados, já que este trabalho está focado no estudo da PHKs imortalizados por E6/E7, enquanto que os ensaios do estudo prévio foram conduzidos em *background* de queratinócitos humanos imortalizados espontaneamente (células HaCat) (Chakrabarti *et al.*, 2004). Interessantemente, trabalhos prévios de nosso grupo mostraram níveis aumentados de RNAm de *MEK1* nos PHKs imortalizados pela variante E-350G em passagem p30 (Sichero *et al.*, 2012b). Entretanto, conforme pode ser observado na figura 7, os níveis aumentados de RNAm para *MEK1* observados no estudo de Sichero e cols. (2012b) não se correlacionaram com níveis aumentados da proteína MEK1 nestas células.

Os dados gerados neste estudo também indicam que os PHKs imortalizados com a variante AA de HPV-16 apresentaram maior ativação da via de sinalização celular mediada por PI3K/AKT, já que níveis aumentados de fosforilação das proteínas efetoras AKT2, p70S6K, GSK-3 β foram detectados. Em relação à proteína AKT2, tem sido observada superexpressão desta proteína em diversos cânceres humanos, como o câncer pancreático, câncer de mama, carcinomas foliculares de tireóide, tumor de células não pequenas de pulmão, carcinoma escamoso da cavidade oral, e próstata (Grille *et al.*, 2003; O'Shaughnessy *et al.*, 2007)).

A proteína GSK-3 β é uma treonina serina quinase que está envolvida em processos celulares como metabolismo energético, desenvolvimento neuronal e formação de padrão segmentar do corpo (revisado por Cohen e Frame, 2001). A regulação aberrante de GSK-3 β pode estar envolvida em uma grande variedade de doenças como diabetes dependente de insulina, doenças cardiovasculares, algumas doenças neurodegenerativas e transtorno

bipolar. Além disso, esta proteína também poder estar envolvida no desenvolvimento de alguns tumores (revisado por Luo, 2009). GSK-3 β pode atuar como oncogene, já que foi observada superexpressão deste gene em diversos tumores incluindo cólon, fígado, ovário e câncer pancreático. GSK-3 β também pode atuar como gene supressor de tumor, uma vez que pode suprimir a via canônica de Wnt, por fosforilar β -catenina e impedir que esta proteína se desloque ao núcleo e ative fatores de transcrição envolvidos na proliferação celular e migração (revisado por McCubrey *et al.*, 2014). A proteína GSK-3 β pode ser fosforilada em diversos resíduos de aminoácidos por diversas quinases, entre as quais AKT, MAPK, e p70S6K, em resposta à sinais extracelulares como aminoácidos, insulina, e fatores de crescimento (revisado por McCubrey *et al.*, 2014). Cabe ressaltar que a fosforilação de GSK-3 β conduz à sua inativação. Foi descrito que a inativação de GSK-3 β em resposta à ativação do receptor de insulina provoca defosforilação de seus substratos, incluindo o fator de tradução eIF2B e a glicogênio sintase, desencadeando o aumento da síntese de proteínas e de glicogênio, respectivamente (revisado por Cohen e Frame, 2001). Neste trabalho foram observados níveis significativamente aumentados de GSK-3 β fosforilado nos PHKs imortalizados pela variante AA de HPV-16 (Figura 9B) o que estende os dados observados por Richard e cols. (2010) que descreveram haver uma expressão diferencial nos níveis de diversas enzimas das vias metabólicas entre as variantes E-P e AA de HPV-16. Mais especificamente foi observado que PHKs transduzidos com E6/E7 da variante AA possuíam maior expressão de genes envolvidos na via glicolítica em relação aos PHKs transduzidos com E6/E7 de E-P utilizando-se a metodologia de eletroforese em gel-bidimensional seguida de análise por espectrometria de massa ionizante (Richard *et al.*, 2010). Ademais foi observada diminuição da expressão da enzima IDH (isocitrato deshidrogenase) nas células transduzidas com a variante AA de HPV-16; a redução de IDH poderia levar ao aumento de HIF-1 α (fator 1 α induzido por

hipóxia) que está envolvida na manutenção da homeostase celular em condições normais; entretanto, no caso de tumores malignos, que são extremamente hipóxicos, a proliferação da massa tumoral ocorre devido à ativação do HIF-1 α que induz a angiogênese a fim de suprir de oxigênio o tumor (Ziello *et al.*, 2007). Uma das moléculas efetoras de HIF-1 α é a enzima CAIX (anidrase carbônica IX) que está envolvida no metabolismo de oxigênio, e na regulação do pH (Robertson *et al.*, 2004). De fato, no trabalho da Niccoli e cols. (2012) foi observado que a enzima CAIX está mais expressa em PHKs transduzidos com E6 da variante AA em relação à variante E-P. Pelo exposto, o maior tamanho das colônias formadas pelos PHKs imortalizados pela variante AA (Figura 15) poderia ser explicado ao menos em parte porque esta variante parece induzir um maior metabolismo em relação as outras duas variantes.

A proteína GSK-3 β é também um regulador da localização de β -catenina dependente da disponibilidade de ligantes Wnt (revisado por Mc Cubrey *et al.*, 2007). Tem sido observada alta expressão de β -catenina em uma variedade de tumores como câncer colorretal, mama e câncer de ovário (revisado por Morin, 1999). A β -catenina pode estar localizada em diferentes compartimentos celulares: esta pode se encontrar associada às caderinas nas junções celulares, ou pode estar livre no núcleo onde regula a expressão de diversos genes como ciclinas D1 e outros reguladores de sobrevivência celular e mobilidade (revisado por Mc Cubrey *et al.*, 2007). No presente estudo, foram avaliados os níveis da β -catenina por *Western blot* em extratos protéicos totais e nucleares, além da localização celular de β -catenina ser avaliada por imunofluorescência. Foi observado que a β -catenina está mais concentrada no citoplasma no caso dos PHKs imortalizados pela variante E-P, e na membrana plasmática nos PHKs imortalizados com as variantes AA e E-350G de HPV-16 (Figura 10 e 11), embora em todas as células analisadas foi observado que esta proteína também está no núcleo. Além disso, a avaliação da proteína nuclear por

Western blot revelou que os PHKs imortalizados pela variante AA apresentaram níveis discretamente maiores de β -catenina no núcleo. Estes dados sugerem que a via canônica de Wnt, medida pelos níveis de expressão de β catenina no núcleo, provavelmente está ativada nas três células contendo as variantes do HPV-16, sendo moderadamente mais elevada nos PHKs imortalizados pela variante AA de HPV-16. Entretanto, essas observações requerem análises adicionais.

Os dados gerado no presente estudo corroboram resultados de estudos prévios onde foi demonstrado que a proteína E6 estimula a estabilização de β -catenina no núcleo (Munoz Bello *et al.*, 2015; Sominsky *et al.*, 2014). Este estudo sugere nestas células um mecanismo semelhante de estabilização da β -catenina ao já descrito para o vírus da hepatite B (HBV), onde a oncoproteína HBx ativa a via de sinalização mediada por MAPK-ERK que induz a fosforilação de GSK-3 β , tornando-a inativa e desta forma, promove a estabilização da β -catenina no núcleo, e a migração celular (Ding *et al.*, 2005).

Conforme já exposto, as cascatas de sinalização são iniciadas por estímulos extracelulares que conduzem à ativação de diversas quinases MAPKKK, que fosforilam e ativam outras quinases MAPKK, e estas finalmente ativam diversos substratos no citosol e no núcleo a fim de regular a expressão de genes envolvidos em diversos processos biológicos (revisado por Zhang e Liu, 2002). Neste estudo, foi analisada a expressão ou atividade de quatro fatores de transcrição (NF κ B, ATF-2, c-JUN, e c-MYC) que são capazes de regular múltiplos genes envolvidos em processos celulares como ciclo celular e proliferação celular (Yoon e Seger, 2006). Estes fatores de transcrição foram escolhidos por serem regulados pelas vias de MAPK-ERK (c-MYC), MAPK-p38 (ATF-2, NF κ B), e MAPK-JNK (c-JUN). Entretanto, os dados gerados não foram correlacionados aos níveis de ativação das diferentes vias de sinalização mediadas por MAPK nos PHKs imortalizados pelas diferentes variantes de HPV-16. Cabe destacar que foram analisados

somente quatro fatores de transcrição que são ativados pela vias de sinalização mediadas por MAPK, entretanto existem inúmeros outros fatores envolvidos nestas vias (Figura 12) que deveriam ser estudados no futuro.

Uma vez que as vias de sinalização mediadas por MAPK e PI3K/AKT estão envolvidas na regulação de processos biológicos como proliferação, migração, e transformação celular, foi avaliada inicialmente a capacidade proliferativa dos PHKs imortalizados pelas diferentes variantes de HPV-16. Conforme apresentado na figura 13, os tempos de duplicação dos três PHKs imortalizados foram muito semelhantes entre si, embora tenha sido observado um discreto aumento, não significativo, na proliferação celular dos PHKs imortalizados pela variante AA. Estes dados em parte corroboram os dados obtidos por Togtema e cols. (2015) que observaram que PHKs transduzidos apenas com o gene *E6* da variante AA de HPV-16 apresentou um tempo de duplicação menor, e desta forma uma maior taxa de proliferação maior, em relação às variantes E-P e E-350G.

Estudos prévios mostraram que a proteína E6 de HPV-16 ativa as vias sinalização mediadas por MAPK mediante a ativação de RTKs, sendo que em seguida, este receptor ativado se associa à moléculas adaptadoras como a proteína de ligação à GRB2. Esta hiperatividade do receptor se dá em condições normais de cultura em meio KSFM suplementado com EGF e BPE que, entretanto, se mantem ao longo do tempo após deprivação de nutrientes no meio de cultura devido à presença de E6. Nesse mesmo estudo se observou que a ativação da via de sinalização mediada por MAPK-ERK devido à ativação de RTK estimula a migração celular em condições de deprivação de nutrientes em PHKs imortalizados por E6 de HPV-16 (Spangle e Munger, 2013). Analogamente, no presente estudo, foi observada uma maior capacidade de migração dos PHKs imortalizados pela variante AA de HPV-16 em comparação às variantes E-P, e E-350G (Figura 14). Ainda mais, uma vez que se observou uma diminuição significativa da migração dos PHKs

imortalizados pela variante AA na presença do inibidor de MEK (Figura 17B), infere-se que a maior migração destas células se deva, ao menos em parte, devido à maior atividade da via de sinalização MAPK-ERK nestas. Por outro lado, no que concerne aos PHKs imortalizados pelas variantes E-P e E-350G de HPV-16, estes apresentaram níveis semelhantes de ativação da via de sinalização MAPK-ERK, e também apresentaram capacidades migratórias semelhantes (Figura 14). Adicionalmente, uma vez que a inibição da migração não foi completa nos PHKs imortalizados pelas diferentes variantes do HPV-16 quando na presença do inibidor de MEK, sugere-se que existem outras vias além da cascata MAPK-ERK que estimulam a migração celular nestes PHKs. A associação entre a ativação da via de sinalização mediada por PI3K/AKT e a migração celular também foi descrita em células expressando diferentes variantes moleculares de variantes de HPV-18 (Contreras Paredes *et al.*, 2009; Fragoso-Ontiveros *et al.*, 2013).

Análises prévias do nosso grupo mostraram que PHKs imortalizados pelas diferentes variantes de HPV-16 em passagem p30 foram capazes de formar colônias em meio semi-sólido, entretanto, a variante E-P foi a menos eficiente em formar colônias, ao passo que os PHKs imortalizados com as variantes AA e E-350G formaram colônias em quantidades similares (Sichero *et al.*, 2012b). No presente estudo foram realizados experimentos de crescimento independente de ancoragem em PHKs imortalizados pelas diferentes variantes de HPV-16 previamente estudadas, entretanto foi avaliado o potencial transformante destas células em passagens >100. Conforme apresentado na figura 15, os PHKs imortalizados pela variante AA de HPV-16 quando crescidos em *soft* agar originaram colônias maiores que os PHKs imortalizadas pelas variantes E-P e E-350G. Na verdade, não apenas as colônias eram maiores, mas também eram mais numerosas, pois uma vez observadas ao microscópio em aumento 10x, as colônias formadas pelos PHKs imortalizados pelas outras variantes não pareciam ser colônias propriamente ditas,

parecendo-se mais a um agregado frouxo de células. Estes resultados estendem dados previamente publicados (Richard *et al.*, 2010) que mostraram que PHKs imortalizados com E6 da variante molecular AA formaram maior número de colônias em relação à E-P. Infelizmente não foi possível estabelecer associação entre a maior atividade da via de sinalização celular induzida por MAPK-ERK observada nos PHKs imortalizados pela variante AA e a maior capacidade transformante já que as células morriam quando tratadas com o inibidor de MEK por mais de 24 horas.

Outra característica que está relacionada ao processo da carcinogênese é a invasão tumoral que é parte da cascata metastática. Esta cascata ocorre em cinco etapas: i) infiltração local das células tumorais no tecido adjacente (invasão), ii) migração trans endotelial das células cancerígenas até os vasos (intravasação), iii) Sobrevivência no sistema circulatório, iv) extravasação, e v) proliferação em órgãos competentes levando à colonização nestes sítios. Este processo envolve o descontrole de ambos o crescimento e a migração celular (Leber e Efferth, 2009; van Zijl *et al.*, 2011). Durante a progressão do câncer as células tumorais podem sofrer alterações na sua plasticidade devido às alterações morfológicas e fenotípicas, incluindo EMT. Esta transição é um processo biológico que permite que as células epiteliais polarizadas que normalmente interagem com a membrana basal, sofram diversas alterações bioquímicas fundamentais para que estas assumam um fenótipo de célula mesenquimal, que possui aumentada migração celular, invasão, alta resistência à apoptose e aumentada produção de componentes da matriz extracelular. Este processo é evolutivamente muito conservado e crucial para a embriogênese, e inflamação crônica. O processo de EMT pode ser diferenciado em três tipos: EMT I, II, ou III. A EMT do tipo III é uma característica da progressão maligna ao carcinoma, e tem sido descrito no desenvolvimento de câncer de mama, pulmão, próstata, e câncer pancreático (Kalluri *et al.*, 2009). Neste trabalho foi observado (figura 16A) que os PHKs imortalizados pela variante

AA de HPV-16 apresentaram maior capacidade invasiva através de uma matriz de colágeno em comparação às outras duas variantes (E-P, e E-350G). Estes dados corroboram os dados obtidos por Niccoli e cols. (2012), que mostraram que os queratinócitos transduzidos somente com E6 da variante AA de HPV-16 apresentaram maior potencial invasor em comparação com as células transduzidas com E6 da variante E-P. Neste estudo foi também observada maior expressão do marcador mesenquimal vimentina e menor expressão do marcador epitelial E-caderina nos PHKs imortalizados pela variante AA de HPV-16 (Figura 16B) em comparação as outras duas variantes (E-P, E-350G). No entanto, embora os PHKs imortalizados pela variante E-P também apresentaram baixa expressão da proteína epitelial E-caderina, estes não apresentaram alta expressão de vimentina, o que pode indicar que o EMT destas células não foi eficiente, já que EMT é um processo dinâmico dependente do balanço adequado destas proteínas nas células. Ao nível molecular, o EMT se caracteriza pela perda de características epiteliais como a expressão de E-caderina que é um componente das junções aderentes, e um concomitante ganho de expressão das proteínas mesenquimal N-caderina e vimentina, permitindo a separação das junções celulares epiteliais, e facilitando a migração destas como células únicas e isoladas (Clarck e Vignjevic, 2015; van Zijl *et al.*, 2011).

Os dados observados diferem dos obtidos por Togtema e cols. (2015), que mostram que em queratinócitos transduzidos somente com E6 da variante molecular E-350G do HPV-16, a expressão de E-caderina foi menor em relação aos queratinócitos transduzidos com E6 das variantes moleculares E-P, e AA do HPV-16. Entretanto, cabe destacar que os estudos foram realizados em modelos celulares distintos, já que no estudo de Togtema e cols. (2015), os queratinócitos foram transduzidos unicamente com o oncogene E6, enquanto que no presente estudo os PHKs foram imortalizados por ambas as oncoproteínas

E6 e E7, indicando a necessidade da expressão complementar de E7 para indução da transformação celular.

Grille e cols. (2003) observaram em células de carcinoma escamoso de língua que a ativação da via de sinalização mediada por PI3K/AKT induz a ativação de EMT, revelada pela baixa expressão das proteínas epiteliais E-caderina e β -catenina, e alta expressão da proteína mesenquimal vimentina (revisado por Larue e Bellacosa, 2005). Além disso, foi descrito que o fenótipo EMT também induz a produção de metaloproteinases e invasão celular (Kim *et al.*, 2001). Desta forma, em conjunto os dados do presente estudo sugerem que a ativação do fenótipo EMT nos PHKs imortalizados com a variante AA de HPV-16 aliado à maior ativação das vias de PI3K/AKT e MAPK-ERK nestas células parece ser suficiente para promover a maior capacidade migratória e invasiva em comparação as outras duas variantes moleculares de HPV-16. Assim, os dados gerados neste trabalho indicam que a variante AA de HPV-16 apresenta uma vantagem seletiva sobre as outras variantes na indução da carcinogênese, e isto pode explicar em parte a alta prevalência desta variante nos tumores de colo de útero. Estes resultados gerados foram compilados em um manuscrito publicado no periódico *Virology* em Março deste ano (anexo2).

Conclusões

6. CONCLUSÕES

O presente estudo apresenta um potencial mecanismo molecular de como a variante AA de HPV-16 pode contribuir para a carcinogênese. Foi demonstrado que os PHKs imortalizados por esta variante apresentam maior ativação de diversas proteínas efetoras das vias de sinalização induzidas por MAPK e PI3K/AKT. Ademais, os PHKs imortalizados pela variante AA de HPV-16 também apresentaram maior habilidade em diversos processos relevantes para a carcinogênese, como o crescimento independente de ancoragem, migração e invasão através de matriz de colágeno. A maior ativação das proteínas MEK1, ERK2, e AKT2 detectadas nos PHKs imortalizados pela variante AA poderiam influenciar o ambiente celular através da inativação de GSK-3 β , e indução do fenótipo EMT. Finalmente, os resultados gerados no presente trabalho indicam que a alteração do aminoácido 83 de leucina para valina da proteína E6 intrínseca das variantes E-350G e AA revelou ser insuficiente *per se* para o aumento do potencial oncogênico em comparação à variante E-P, o que argumenta contra a associação epidemiológica entre o risco de progressão ao câncer associado à variante E-350G.

Capítulo II

Introdução

1. INTRODUÇÃO

As proteínas E6 e E7 de HPVs de alto risco oncogênico cooperam na imortalização de PHKs e na inibição da diferenciação destas células na presença de soro e cálcio (Hawley-Nelson *et al.*, 1989; Munger *et al.*, 1989). Entretanto, essas células imortalizadas não são tumorigênicas uma vez que não são capazes de formar tumores em camundongos atímicos. Os efeitos sobre o ciclo celular resultantes da expressão de E6 e E7 de HPVs de alto risco oncogênico se complementam, e juntas estas proteínas mediam a imortalização celular epitelial associada à infecção viral, além de promover a instabilidade genômica que predispõe as células infectadas à transformação maligna completa. A proteína E7 de HPVs de alto risco oncogênico estimula a síntese de DNA e a replicação celular, mecanismos normalmente inativos em células epiteliais não-basais. Isto se soma às interações da proteína E6 de HPVs de alto risco oncogênico com proteínas celulares e que resultam na inibição da apoptose e reparo de DNA, além da inibição da senescência devido à indução da unidade catalítica da telomerase (revisado por Doorbar, 2015). Estes são passos de um processo de múltiplas etapas da carcinogênese associada ao HPV (revisado por Feller *et al.*, 2010). Entretanto, modelos de progressão tumoral apontam para a expressão desregulada de oncogenes celulares como um evento fundamental para a transformação maligna destas células epiteliais imortalizadas. Assim sendo, verificou-se que a sinalização descontrolada de algumas proteínas celulares do hospedeiro coopera com E6/E7 de HPV de alto risco oncogênico na progressão tumoral *in vivo* (revisado por Moody e Laimins, 2010). Entre outras, foi demonstrado que a proteína c-MYC é capaz de cooperar com E6/E7 de HPV-16 na transformação de queratinócitos humanos primários (Subramanyam *et al.*, 2006).

O oncogene c-MYC pertence à família MYC de genes (*MYC*, *MYCN*, *MYCL*). O c-MYC é um protooncogene que está localizado no cromossomo 8q24.1, possui três exons, e

codifica uma proteína nuclear de 62 kDa que codifica o fator de transcrição c-MYC. Este foi identificado como o homólogo celular do oncogene viral (v-MYC) que está associado ao desenvolvimento de mielocitomatose (leucemia) em aves (Duesberg e Vogt, 1979). O gene c-MYC encontra-se frequentemente ativado em cânceres humanos mediante vários mecanismos, como por mutações (Dews *et al.* 2006; Nair *et al.* 1998; Vita e Henriksson, 2006), ou podendo ser resultado da inativação de pontos de controle do ciclo celular, como p53, uma vez que responde a diversas vias de sinalização celular responsivas aos fatores de crescimento celulares (revisado por Dang, 2013). Desta maneira, a expressão de c-MYC pode ser aumentada pela estimulação de RTK que envia sinais para ativação das vias de sinalização MAPK-ERK, e estas induzem a expressão do fator de transcrição c-MYC. Tem sido observado em modelos *in vitro* e *in vivo*, que c-MYC induz a ativação de genes envolvidos na biogênese de ribossomos em células em crescimento (van Riggelen *et al.*, 2010). Além disso, também ativa genes envolvidos no metabolismo da glicose e glutamina a fim de manter a síntese de ATP e macromoléculas importantes para a replicação das organelas celulares (Morrish *et al.*, 2010; Wise *et al.*, 2008). A proteína c-MYC tem também um papel central em vários processos celulares como regulação do ciclo celular, crescimento celular, metabolismo do DNA, e diferenciação (revisado por Dang, 2013).

Tem sido observado que c-MYC ativado está envolvido na progressão de linfoma de Burkitt, como resultado da translocação entre o cromossomo 8 e um dos três cromossomos que contêm genes que codificam anticorpos (Shou *et al.*, 2000). Foi observada em diversos estudos a expressão desregulada de c-MYC em muitos cânceres humanos, como câncer de mama, melanoma, cólon, câncer cervical, adenocarcinoma, osteosarcomas, glioblastomas, e leucemia mieloide (Beroukhi *et al.*, 2010). Adicionalmente, foi demonstrada a desregulação da via de sinalização de NOTCH, que regula c-MYC, em leucemia das células T (Palomero *et al.*, 2006).

O papel de c-MYC como marcador prognóstico de câncer cervical ainda não está elucidado, uma vez que alguns estudos observaram associação da superexpressão de c-MYC à um prognóstico desfavorável, entretanto em outros trabalhos essa associação não é observada. Foi descrito que a integração do HPV próximo ao *locus* de c-MYC em carcinoma cervicais leva à ativação deste contribuindo na carcinogênese (Kim *et al.*, 2011).

Um estudo envolvendo 93 mulheres com carcinomas escamosos em estádios I e II revelou ganho de c-MYC em 33% dos tumores mediante as técnicas de *Northern* e *Southern blot* (Bourhis *et al.*, 1990). Dados semelhantes foram descritos em outro estudo utilizando-se a técnica de imunohistoquímica, em que se observou a maior expressão de c-MYC em 33% de 48 pacientes que apresentaram alto risco de recorrência e baixa taxa de sobrevida em cinco anos (Brewer *et al.*, 1996). A amplificação de c-MYC foi também observada em 25% de 84 mulheres com carcinoma cervical (Zhang *et al.*, 2002). Por outro lado, em outro estudo foi observada maior expressão de c-MYC em 45,1% das 55 amostras de carcinoma escamoso em estágio III e IV analisadas, nas quais, entretanto não foi possível estabelecer associação com metástase, recorrência, e sobrevida (Symonds *et al.*, 1992). Estes dados foram corroborados por Brenna e cols. (2002) que relataram que a detecção de c-MYC não constitui um fator prognóstico em nenhum dos estádios de carcinoma cervical escamoso (Brenna *et al.*, 2002). Mais recentemente, foi observado um ganho no número de cópias do gene c-MYC em 81.9% das amostras de carcinoma cervical em estádios I e II, e a amplificação de c-MYC foi observada em 6.9% dos casos (Kim *et al.*, 2011), e que o número de cópias de c-MYC aumenta com a progressão de lesões cervicais ao câncer cervical (Zhu *et al.* 2014).

Objetivos e Justificativa

2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

Foi demonstrado que a proteína c-MYC é capaz de cooperar com E6/E7 de HPV-16 na transformação de queratinócitos humanos primários (Subramanyam *et al.*, 2006). Mutações em c-MYC são geralmente detectadas em amostras de adenocarcinoma e de carcinoma cervical escamoso. Pelo exposto, objetivou-se analisar a cooperação de c-MYC com E6/E7 das variantes AA e E-350G de HPV-16 na transformação maligna.

2.1 Objetivos específicos

- 1) Analisar os níveis de ativação de proteínas envolvidas na via de MAPK-ERK (MEK1, MEK2) em queratinócitos imortalizados com E6/E7 das variantes AA e E-350G de HPV-16 (AA, E-350G) e co-transduzidos com c-MYC.
- 2) Analisar o potencial de migração, invasão e transformação celular dos queratinócitos imortalizados com E6/E7 das variantes AA e E-350G de HPV-16 (AA, E-350G) e co-transduzidos com c-MYC.

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Vetor lentiviral e transdução de c-MYC

Para a superexpressão de c-MYC foram inicialmente adquiridas partículas lentivirais LV-EF1A-c-MYC disponíveis comercialmente (KeraFAST, Massachusetts, EUA). Entretanto, a titulação destas indicou que as partículas lentivirais comercializadas apresentavam título muito baixo, e, portanto foram realizados sem sucesso diversos experimentos utilizando-se essas partículas. Em seguida, foi adquirido o plasmídeo lentiviral pCDH-puro-c-MYC (número de catálogo: 46970, Addgene, Massachusetts, EUA), e 10 ug deste vetor foram co-transfectados com plasmídeos que codificam as diferentes proteínas lentivirais pol-gag-env (pMDL-GagPol, pRSV-REV, pCMV-VsVp) em células HEK293T utilizando protocolo de transfecção que emprega fosfato de cálcio. As células HEK293T foram cultivadas em meio DMEM acrescido de 10% FBS. Os sobrenadantes contendo as partículas geradas foram titulados em células HT1080 (oriunda de fibrosarcoma) por infecção com diluições seriadas seguida de seleção com antibiótico (0,5 µg/ml de puomicina) (Sigma Aldrich, Missouri, EUA). Estes ensaios foram realizados em colaboração com a Dra. Daniela Zanatta do Laboratório de Vetores Virais do CTO, ICESP, e os experimentos foram realizados em Laboratório de Biossegurança nível 2. Em seguida, as partículas virais foram utilizadas para infectar os PHKs imortalizados pelas variantes AA e E-350G de HPV-16 em passagem alta ($p > 80$), além de PHKs normais em passagem 2. Para isso foi utilizado um MOI=1 com o intuito de infectar cada célula com uma partícula viral, e a infecção foi realizada na presença de polibreno 8 µg/ml (Sigma Aldrich, Missouri, EUA) por 6 horas a 37°C. Posteriormente, o meio de infecção foi substituído por KSFM suplementado com EGF e BPE. Após 24 horas, as células infectadas foram selecionadas com 0,5 µg/ml de puomicina por sete dias a fim de garantir que todas as células remanescente tenham incorporaram o vetor lentiviral.

A presença do vetor pCDH-puro-c-MYC nos PHKs imortalizados pelas variantes AA e E-350G de HPV-16 foi inicialmente verificada por PCR. Para tanto, as células foram desgrudadas das placas de cultivo por incubação com tripsina por 5 minutos, centrifugadas, e o *pellet* celular foi incubado a 95°C por 10 minutos para desintegração celular e liberação dos ácidos nucleicos. O DNA foi usado em uma reação de PCR empregando-se um iniciador senso complementar ao plasmídeo pCDH-puro (5' CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG 3'), e um iniciador antisenso (5' GCTAACGTTGAGGGGCATGGTG 3') complementar ao gene *c-MYC* de maneira a se detectar o plasmídeo inserido. A reação de PCR foi realizada em um volume final de 30 µL, 4 mM MgCl₂, 20 µM de cada iniciador, 2 mM de dNTPs, e 5 U/µL de Taq Gold Polimerase (Applied Biosystems, Massachusetts, EUA). As condições de ciclagem utilizadas foram: 1 ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos a 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, e extensão final a 72°C por 5 minutos. Como controle positivo e negativo foram utilizados DNA do vetor pCDH-puro-c-MYC e água, respectivamente.

3.2 PCR em tempo Real

A expressão de c-MYC nas diferentes células transduzidas com pCDH-puro-c-MYC foi analisada por PCR em tempo real. Para tanto, o RNA total das células foi extraído utilizando-se o *RNeasy mini kit* (Qiagen, Dusseldorf, Alemanha), e em seguida 1 µg dos RNA extraídos foram transcritos reversamente à cDNA utilizando-se o *High Capacity RNA-to cDNA* (Life Technologies, Califórnia, EUA). O volume final de reação foi de 11 µL, e a reação foi realizada utilizando-se 2X buffer RT que inclui o iniciador necessário para a transcrição reversa, e 20X do mix de enzima transcriptase reversa. As condições de ciclagem foram: 37°C por 60 minutos, seguido de 95°C por 5 minutos. Em

seguida os cDNA foram diluídos a 25 ng/μl e submetidos à qRT-PCR empregando-se o *TaqMan® Gene Expression Assays kit Hs00153408* (Life Technologies, Califórnia, EUA) específico para a detecção do transcrito de c-MYC. Em resumo, são utilizados iniciadores e sonda complementares ao cDNA de c-MYC. O gene endógeno *GAPDH* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) foi utilizado como controle para a normalização da expressão de c-MYC nas diferentes células. As sondas específicas para c-MYC e *GAPDH* empregadas estão marcadas com os fluoróforos FAM e VIC, respectivamente. Foi utilizado 1 μl de cDNA (25ng/μL) de cada amostra, 0,625 μL do reagente *TaqMan Gene Expression Assays 20X*, e 6,25 μL de *TaqMan® Universal Master Mix* para volume final de 12.5 μl em uma reação consistindo de desnaturação inicial por 10 minutos a 94°C, seguido de 45 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, e anelamento e extensão a 60°C por 60 segundos. O sinal fluorescente foi detectado no aparelho 7500 *Real-Time PCR* (Life Technologies, Califórnia, EUA), e o limiar de detecção (*threshold*) foi ajustado manualmente para cada um dos genes analisados (*GAPDH* e c-MYC), e os dados gerados foram analisados pelo método descrito por Livak e Schmittgen, 2001.

3.3 Western blot

Os níveis de expressão de c-MYC e de algumas proteínas envolvidas na via de sinalização de MAPK-ERK foi avaliado por *Western blot* nos PHKs imortalizados pelas variantes AA e E-350G co-transduzidas com c-MYC. Para este fim, extraiu-se a proteína total das células mediante o uso de tampão RIPA conforme descrito no item 3.2 do capítulo I desta Tese. Em seguida, foram fracionados de 50-100 μg dos extratos protéicos em SDS-PAGE, e posteriormente transferidos para membranas de PVDF. As membranas foram incubadas com anticorpos anti-MEK1 fosforilado (diluição 1/500, ab131342), anti-MEK1 total (diluição 1/500, ab32091), anti-MEK2 fosforilado (diluição 1/500, ab30622) anti-

MEK2 total (diluição 1/500, ab32517), e anti c-MYC (diluição 1/500, ab69987). Todos os anticorpos foram obtidos da Abcam (Abcam, Massachusetts, EUA). Para a normalização dos níveis protéicos, as membranas foram adicionalmente incubadas com anticorpo anti-tubulina (Sigma, Missouri, EUA) (diluição 1/5000, T9026). Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário específico conjugado à peroxidase: anti-IgG de camundongo (Jackson ImmunoResearch, Pennsylvania, EUA), ou anti-IgG de coelho (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra). Os sinais foram quantificados utilizando-se o *software* ImageQuant TL (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra).

3.4 Ensaio de proliferação celular

Este ensaio foi realizado conforme detalhado previamente no capítulo I desta tese (item 3.6). Foi avaliada a proliferação dos PHKs imortalizados pelas variantes AA e E-350G de HPV-16 e co-transduzidos com c-MYC, além de PHKs transduzindo apenas c-MYC, e PHK não infectados. Foram realizados dois experimentos independentes em triplicata.

3.5 Ensaio de migração celular

A migração celular foi avaliada através do ensaio de cura de ferida conforme detalhado previamente no capítulo I (item 3.8). Foi avaliada a capacidade de migração celular dos PHKs imortalizados pelas variantes AA e E-350G de HPV-16 e co-transduzidos com c-MYC, além de PHKs transduzindo apenas c-MYC. Foram realizados quatro experimentos independentes em triplicata.

3.6 Ensaio de crescimento independente de ancoragem

O potencial transformante dos PHKs imortalizados pelas variantes AA e E-350G de HPV-16 e co-transduzidos com c-MYC, além de PHKs transduzindo apenas c-MYC foi avaliado utilizando-se o ensaio de *soft* agar conforme descrito no capítulo I (item 3.7). Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

3.7 Ensaio de invasão

O potencial invasivo dos PHKs imortalizados pelas variantes AA e E-350G de HPV-16 e co-transduzidos com c-MYC, além de PHKs transduzindo apenas c-MYC, foi medido conforme descrito no capítulo I desta tese (item 3.9), utilizando-se o *QCM High sensitivity non-cross-linked 1collagen invasion assay* (Millipore, Darmstadt, Alemanha) seguindo as instruções do fabricante. Foram realizados cinco experimentos em triplicata.

3.8 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o t-teste de Student não pareado e com duas caudas no *software* Microsoft Excel. As diferenças foram consideradas de estatisticamente significativas apenas quando $p < 0,05$.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização dos queratinócitos imortalizados pelas variantes AA e E-350G de HPV-16 co-transduzidos com c-MYC.

Conforme ilustrado na figura 18, houve êxito na transdução do plasmídeo não apenas nos PHKs normais, mas também em ambos os PHKs imortalizados pelas variantes AA e E-350G de HPV-16.

Figura 18. Detecção do plasmídeo pCDH-puro-c-Myc por PCR nos queratinócitos imortalizados pelas variantes AA e E-350G de HPV-16 e co-transduzidos com c-MYC. Foram submetidos à PCR *pellets* celulares de PHKs imortalizados com E6/E7 das variantes AA e E-350G de HPV-16 e co-transduzidos com c-MYC, e de PHKs transduzidos ou não com c-MYC. Como controle positivo da PCR foi utilizado DNA do vetor pCDH-puro-c-MYC (pl), e como controle negativo foi utilizada água. O marcador de peso molecular ϕ X174RF DNA/*Hae*III foi utilizado (Invitrogen, Califórnia, EUA) (MM).

Foi analisada também a expressão de c-MYC nas diferentes células pela técnica de PCR em tempo real. Os resultados desta análise estão ilustrados na tabela 2 na qual estão indicados os valores da expressão relativos de c-MYC nas células transduzidas com

c-MYC em relação às células não-transduzidas. Pode-se observar que o aumento da transcrição de c-MYC entre as diferentes células é equivalente.

Tabela 2. Expressão de c-MYC nos queratinócitos normais ou imortalizados pelas variantes AA e E-350G de HPV-16 co-transduzidos com c-MYC. O RNA das células foi extraído, e a expressão de c-MYC foi analisada utilizando-se o *TaqMan® Gene Expression Assays kit Hs00153408* (Life Technologies, Califórnia, EUA). Para normalização foi analisada a expressão do gene endógeno *GAPDH*. Foram realizados três experimentos em triplicata.

Linhagem	expressão relativa de c-MYC
PHK-c-MYC	1.48
PHK-AA-c-MYC	1.29
PHK-E-350-c-MYC	1.75

A expressão de c-MYC nas diferentes células foi também avaliada por *Western blot*. Para tanto foram utilizados extratos proteicos obtidos dos PHKs imortalizados pelas variantes AA e E-350G de HPV-16 e co-transduzidos com c-MYC, além de PHKs transduzidos apenas com c-MYC. Pode-se observar na figura 19, que ocorre um pequeno incremento na expressão de c-MYC nas células infectadas com o vetor lentiviral pCDH-puro-c-MYC em relação às células sem este vetor. Acredita-se que o aumento apenas discreto pode ser devido ao fato de que as células sem o vetor já expressam uma quantidade grande de c-MYC endógeno, o que dificulta a visualização do aumento da expressão desta proteína expressa exógenamente.

Figura 19. Expressão de c-MYC nos queratinócitos normais ou imortalizados pelas variantes AA e E-350G de HPV-16 co-transduzidos com c-MYC. Foram utilizados 50 µg de proteína total dos extratos proteicos para análise dos níveis de c-MYC utilizando-se *Western blot*. Na figura está apresentado um experimento representativo de três experimentos independentes.

4.2 Análises dos níveis de ativação de proteínas efetoras da via de MAPK nos queratinócitos imortalizados pelas variantes AA e E-350G de HPV-16 co-transduzidos com c-MYC.

Na figura 20 pode-se observar um aumento da proteína MEK1 fosforilada nos PHKs imortalizados pela variante AA de HPV-16 e co-transduzidos com c-MYC em relação à variante molecular E-350G e aos PHKs não imortalizados, em condições de deprivação de EGF e BPE. Por outro lado, os níveis totais desta proteína foram similares em todas as células analisadas (Figura 20). Os níveis de MEK2 total ou fosforilado também foram similares entre as células analisadas.

Figura 20. Expressão de MEK1 e MEK2 total e fosforilada (forma ativada) nos queratinócitos normais ou immortalizados pelas variantes AA e E-350G de HPV-16 co-transduzidos com c-MYC. Foram utilizados extratos protéicos dos PHKs normais ou immortalizados pelas variantes AA e E-350G de HPV-16 co-transduzidos com c-MYC. Os níveis de tubulina foram utilizados como controle da carga protéica. Está apresentado um experimento representativo de três ensaios de *Western blot*. O marcador de peso molecular Kaleidoscope™ (Bio-Rad, Califórnia, EUA) foi utilizado.

4.3 Análise de processos celulares importantes para à carcinogênese em queratinócitos immortalizados pelas variantes AA e E-350G de HPV-16 co-transduzidos com c-MYC.

4.3a. Proliferação celular

Foi avaliada a proliferação celular por 72 horas dos PHKs immortalizados pelas variantes AA e E-350G de HPV-16, e co-transduzidos com c-MYC. Conforme ilustrado na figura 21, os PHKs immortalizados pela variante AA de HPV-16 e co-transduzidos com c-MYC possuem maior capacidade proliferativa (tempo de duplicação: 13,6 horas) em relação à variante E-350G (tempo de duplicação: 16,9 horas). Como esperado, os PHKs transduzindo c-MYC apenas proliferam mais lentamente (tempo de duplicação: 20,5 horas).

Figura 21. Curvas de proliferação de queratinócitos normais, e imortalizados pelas variantes AA e E-350G de HPV-16 e co-transduzidos com c-MYC. Foram plaqueadas 1×10^5 células em placas de 6 poços, e a proliferação celular foi avaliada por 72 horas.

4.3b. Migração celular

Foi analisada a capacidade de migrar dos PHKs imortalizados pelas variantes AA e E-350G de HPV-16 e co-transduzidos com c-MYC utilizando-se o ensaio de cura de ferida. Durante este experimento foi adicionado ao meio de cultura o inibidor de proliferação celular mitomicina C com o objetivo de somente avaliar a capacidade migratória das células independente da proliferação celular. Foi medida a área aberta da ferida logo após a realização do risco na placa onde as células estavam cultivadas em monocamada e em confluência de ~90%. Foram realizados quatro experimentos independentes nos quais as células foram plaqueadas em triplicata. Conforme ilustrado na figura 22, os PHKs imortalizados pela variante AA do HPV-16 e co-transduzidos com c-MYC apresentaram maior capacidade migratória 6 horas após a realização do risco em comparação à variante E-350G.

Figura 22. Migração celular dos queratinócitos imortalizados pelas variantes AA e E-350G de HPV-16 e co-transduzidos com c-MYC. Foram utilizados PHKs imortalizados com as diferentes variantes moleculares, e co-transduzidos com c-MYC. Foram realizados 4 experimentos distintos em que as células foram plaqueadas em triplicata. As fotos são representativas de 4 experimentos independentes. A cobertura da ferida foi calculada comparando as medidas das áreas abertas do risco em dois tempos diferentes ($t=0$, $t=6$ hs). Foi utilizado o teste t de Student não pareado, com duas caudas e diferenças significativas ($p<0.05$) estão indicadas por asteriscos.

4.3c. Crescimento independente de ancoragem.

Foi avaliado o potencial transformante dos PHKs imortalizados pela variante AA e E-350G de HPV-16 e co-transduzidos com c-MYC, através de ensaio de formação de colônias em meio semisólido. Conforme ilustrado na figura 23, observa-se que nos PHKs transduzidos apenas com c-MYC não foi observada nenhuma colônia. Entretanto, nos PHKs imortalizados com HPV-16 e co-transduzidos por c-MYC observaram-se colônias, sendo que um maior número de colônias foi formado pelos PHKs imortalizados pela variante AA de HPV-16 e co-transduzidos com c-MYC em relação à variante E-350G. Cabe ressaltar, entretanto, que as colônias formadas pelos PHKs imortalizados pela variante E-350G e co-transduzidos com c-MYC eram maiores em diâmetro em todos os experimentos realizados.

Figura 23. Crescimento independente de ancoragem em PHKs imortalizados pelas variantes AA e E-350G de HPV-16 e co-transduzidos com c-MYC. O ensaio foi realizado plaqueando-se 7.000 células em *soft* agar 0.5% em triplicata, em poços de placas de 12 poços recobertos com *soft* agar 1%. Após 20 dias as colônias foram coradas com MTT. Na figura está apresentado um experimento representativo de três experimentos independentes.

4.3d. Invasão celular

Finalmente foi avaliado o potencial invasivo dos PHKs imortalizados pelas variantes AA e E-350G de HPV-16 e co-transduzidos com c-MYC. Conforme ilustrado na figura 24, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os PHKs

imortalizados pelas diferentes variantes e co-transduzidos com c-MYC no que concerne ao potencial de invasão.

Figura 24. Invasão celular dos queratinócitos imortalizados pelas variantes AA e E-350G de HPV-16 e co-transduzidos com c-MYC. O potencial invasivo de células foi analisado utilizando-se o *QCM High sensitivity non-cross-linked collagen invasion assay* (Millipore, Darmstadt, Alemanha). Foram plaqueadas 250.000 células, e a invasão foi estimulada por adição de 15% FBS. Foram realizados três experimentos independentes em triplicatas. Foi utilizado o teste t de Student não pareado, com duas caudas e diferenças significativas ($p < 0.05$) estão indicadas por asteriscos.

Discussão

5. DISCUSSÃO

A expressão desregulada e constitutiva de c-MYC pode desencadear a carcinogênese. Foi observado que a expressão ectópica de c-MYC é capaz de induzir a imortalização de fibroblastos em cultura (Kohl *et al.*, 1987). Ainda mais, foi descrito que em fibroblastos de embriões de rato e células hematopoiéticas, a expressão constitutiva de c-MYC em cooperação com a ativação de outro oncogene, como por exemplo RAS, induz a transformação maligna (Land *et al.*, 1983; Lugo *et al.*, 1989). O papel de c-MYC na transformação celular se dá pelo fato que esta proteína estimula as células não transformadas e quiescentes a entrar na fase S do ciclo celular (Eilers *et al.*, 1989).

Neste estudo foram co-transduzidos com o oncogene c-MYC PHKs imortalizados pelas variantes AA e E-350G de HPV-16 com o objetivo de analisar o efeito sinérgico entre E6/E7 e c-MYC na indução da via de sinalização MAPK-ERK, e nos processos de proliferação, migração, transformação e invasão celular *in vitro*.

Inicialmente foi avaliada a ativação de proteínas envolvidas na cascata de sinalização MAPK-ERK. Os resultados mostram que os níveis da proteína MEK1 ativa (forma fosforilada) estão aumentados nos PHKs imortalizados com a variante AA de HPV-16 e transduzidos com c-MYC em relação à variante E-350G. Por outro lado, os níveis totais de MEK1 e de MEK2 total e fosforilado apresentaram-se similares nas células analisadas. Além disso, observou-se maior potencial de migração celular pelos PHKs imortalizados pela variante AA de HPV-16 e co-transduzidos com c-MYC em relação à variante E-350G, o que poderia ser explicado, ao menos em parte, pela maior ativação da via de sinalização MAPK-ERK nessas células. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre o potencial invasivo dos PHKs imortalizados pelas duas variantes de HPV-16 analisadas. Entretanto, como esperado, os PHKs imortalizados com

HPV-16 independentemente da variante quando transduzidos com c-MYC apresentaram maior potencial de invasão em relação aos PHKs apenas co-transduzidos com c-MYC.

No que concerne à análise da capacidade de crescimento independente de ancoragem destas células, observou-se um maior número de colônias em ambos os PHKs imortalizados com as variantes AA e E-350 de HPV-16 e co-transduzidos com c-MYC em relação aos PHKs transduzindo c-MYC apenas. Ainda mais, ao comparar os PHKs imortalizados com HPV-16 não transduzidos com c-MYC (capítulo I) e transduzidos com c-MYC, é possível observar que c-MYC induziu a formação de um maior número de colônias nestas células. Este resultado era esperado já que c-MYC é uma oncoproteína que está envolvida no estímulo de proliferação celular. Cabe notar, que embora os PHKs imortalizados pela variante AA de HPV-16 e co-transduzidos com c-MYC formaram um maior número de colônias no ensaio de *soft* agar em relação à variante E-350G, de maneira geral as colônias formadas apresentavam menor diâmetro. Embora se suponha que células únicas imersas em *soft*-agar capazes de formar colônias seja indicativo de transformação celular, independentemente do tamanho das colônias formadas, é possível hipotetizar que os PHKs imortalizados pela variante E-350G e co-transduzidos com c-MYC, que formou colônias de maior diâmetro, poderia possuir um metabolismo mais rápido em comparação à variante AA. Entretanto, estes achados requerem estudos mais detalhados. De qualquer maneira, acredita-se que a comparação do potencial transformante entre as duas variantes moleculares de HPV-16 em cooperação com c-MYC seria mais bem avaliada em ensaios de análise de formação de tumores em camundongos atímicos *in vivo* que se espera conduzir em um futuro próximo.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Os resultados gerados neste estudo corroboram e estendem evidências de que existem diferenças biológicas entre a proteína E6 das diversas variantes de HPV-16, e isto é de extrema relevância para avaliar o significado da variabilidade intratípica de HPV. A maior parte dos estudos indica que variantes AA de HPV-16 são mais oncogênicas que variantes E-P. No capítulo I foram analisadas as diferenças biológicas de três variantes naturais de HPV-16 (E-P, AA e E-350G), e observou-se que PHKs imortalizados pela variante AA possuem maior habilidade em induzir processos biológicos relevantes à carcinogênese. Assim, a infecção por esta variante poderia constituir um fator prognóstico do câncer de colo do útero e poderia explicar parcialmente porque algumas lesões induzidas por HPV-16 progridem ao câncer enquanto outras não.

Além disso, neste estudo observou-se que a cooperação de c-MYC com as oncoproteínas virais E6/E7 de HPV-16 aumenta a transformação celular medida em ensaios de *soft* agar, já que os PHKs imortalizados por ambas as variantes AA e E-350G co-transduzidos com c-MYC apresentaram um maior número de colônias em relação às células em que c-MYC não foi expresso ectopicamente. Este resultado estende os dados do estudo de Chakrabarti e cols. (2004) que observou que as oncoproteínas E6 e E7 em cooperação com NOTCH-1 ativado (AcN1) cooperam na transformação celular. Entretanto, acredita-se que os dados gerados até o momento sejam insuficientes para se atribuir a uma variante específica de HPV-16 maior potencial em cooperar com c-MYC na transformação maligna *in vivo*, que requer análises adicionais.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Androphy EJ, Schiller JT, Lowy DR. Identification of the protein encoded by the E6 transforming gene of bovine papillomavirus. *Science*. 1985;230(4724):442-445.
- Ausubel F, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc. 2001.
- Barbosa MS, Schlegel R. The E6 and E7 genes of HPV-18 are sufficient for inducing two-stage *in vitro* transformation of human keratinocytes. *Oncogene*. 1989;4(12):1529-1532.
- Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol*. 2005;32Suppl 1:S16-24.
- Bellanger S, Tan CL, Xue YZ, Teissier S, Thierry F. Tumor suppressor or oncogene? A critical role of the human papillomavirus (HPV) E2 protein in cervical cancer progression. *Am J Cancer Res*. 2011;1(3):373-389.
- Bello JO, Nieva LO, Contreras-Paredes A, Gonzalez AM, Zavaleta LR, Lizano M. Regulation of the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway by Human Papillomavirus E6 and E7 Oncoproteins. *Viruses*. 2015;7(8):4734-4755.
- Bernard HU. Gene expression of genital human papillomaviruses and considerations on potential antiviral approaches. *Antivir Ther*. 2002;7(4):219-237.
- Bernard HU, Calleja-Macias IE, Dunn ST. Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. *Int J Cancer*. 2006;118(5):1071-1076.
- Beroukhi R, Mermel CH, Porter D, Wei G, Raychaudhuri S, Donovan J, Barretina J, Boehm JS, Dobson J, Urashima M, Mc Henry KT, Pinchback RM, Ligon AH, Cho YJ, Haery L, Greulich H, Reich M, Winckler W, Lawrence MS, Weir BA, Tanaka KE, Chiang DY, Bass AJ, Loo A, Hoffman C, Prensner J, Liefeld T, Gao Q, Yecies D, Signoretti S, Maher E, Kaye FJ, Sasaki H, Tepper JE, Fletcher JA, Tabernero J, Baselga J, Tsao MS, Demichelis F, Rubin MA, Janne PA, Daly MJ, Nucera C, Levine RL, Ebert BL, Gabriel S, Rustgi AK, Antonescu CR, Ladanyi M, Letai A, Garraway LA, Loda M, Beer DG, True LD, Okamoto A, Pomeroy SL, Singer S, Golub TR, Lander ES, Getz G, Sellers WR, Meyerson M. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature*. 2010;463(7283):899-905.
- Berumen J, Ordoñez RM, Lazcano E, Salmeron J, Galvan SC, Estrada RA, Yunes E, Garcia-Carranca A, Gonzalez-Lira G, Madrigal-de la Campa. Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk of cervical cancer; a case-control study. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93(17):1325-1330.
- Bontkes HJ, van Duin M, de Gruijl TD, Duggan-Keen MF, Walboomers JM, Stukart MJ, Verheijen RH, Helmerhorst TJ, Meijer CJ, Scheper RJ, Stevens FR, Dyer PA, Sinnott P, Stern PL. HPV 16 infection and progression of cervical intra-epithelial neoplasia: analysis of HLA polymorphism and HPV 16 E6 sequence variants. *Int J Cancer*. 1998;78(2):166-171.

Bourhis J, Le MG, Barrois M, Gerbaulet A, Jeannel D, Duvillard P, Le Doussal V, Chassagne D, Riou G. Prognostic value of c-myc proto-oncogene overexpression in early invasive carcinoma of the cervix. *J Clin Oncol*. 1990;8(11):1789-1796.

Brenna SM, Zeferino LC, Pinto GA, Souza RA, Andrade LA, Vassalo J, Martinez EZ, Syrjanen KJ. c-Myc protein expression is not an independent prognostic predictor in cervical squamous cell carcinoma. *Braz J Med Biol Res*. 2002;35(4):425-430.

Brewer CA, Liao SY, Wilczynski SP, Pastorekova S, Pastorek J, Zavada J, Kurosaki T, Manetta A, Berman ML, DiSaia P e Stanbridge EJ. A study of biomarkers in cervical carcinoma and clinical correlation of the novel biomarker MN. *Gynecologic Oncology*. 1996;63(3):337-344.

Bryan JT, Brown DR. Association of the human papillomavirus type 11 E1()E4 protein with cornified cell envelopes derived from infected genital epithelium. *Virology*. 2000;277(2):262-269.

Buck CB, Day PM, Trus BL. The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology*. 2013;445(1-2):169-174.

Bulk S, Berkhof J, Bulkman NW, Zielinski GD, Rozendaal L, van Kemenade FJ, Snijders PJ, Meijer CJ. Preferential risk of HPV16 for squamous cell carcinoma and of HPV18 for adenocarcinoma of the cervix compared to women with normal cytology in The Netherlands. *Br J Cancer*. 2006;94:171-175.

Burchell AN, Richardson H, Mahmud SM, Trottier H, Tellier PP, Hanley J, Coutlée F, Franco EL. Modeling the sexual transmissibility of human papillomavirus infection using stochastic computer simulation and empirical data from a cohort study of young women in Montreal, Canada. *Am J Epidemiol*. 2006;163(6):534-543.

Burk RD, Terai M, Gravitt PE, Brinton LA, Kurman RJ, Barnes WA, Greenberg MD, Hadjimichael OC, Fu L, McGowan L, Mortel R, Schwartz PE, Hildesheim A. Distribution of human papillomavirus types 16 and 18 variants in squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the cervix. *Cancer Res*. 2003;63(21):7215-7220.

Burk RD, Chen Z, Van Doorslaer K. Human papillomaviruses: genetic basis of carcinogenicity. *Public Health Genomic*. 2009;12(5-6):281-290.

Burk RD, Chen Z, Harari A, Smith BC, Kocjan BJ, Maver PJ, Poljak M. Classification and nomenclature system for human Alphapapillomavirus variants: general features, nucleotide landmarks and assignment of HPV6 and HPV11 isolates to variant lineages. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat*. 2011;20(3):113-123.

Bzhalava D, Eklund C, Dillner J. International standardization and classification of human papillomavirus types. *Virology*. 2015;476:341-344.

Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2011;75(1):50-83.

- Chakrabarti O, Veeraraghavalu K, Tergaonkar V, Liu Y, Androphy EJ, Stanley MA, Krishna S. Human papillomavirus type 16 E6 amino acid 83 variants enhance E6-mediated MAPK signaling and differentially regulate tumorigenesis by notch signaling and oncogenic Ras. *J Virol*. 2004;78(11):5934-5945.
- Chan SY, Ho L, Ong CK, Chow V, Drescher B, Durst M, TerMeuler J, Villa LL, Luande J, Mgaya HN, Bernard HU. Molecular variants of human papillomavirus type 16 from four continents suggest ancient pandemic spread of the virus and its coevolution with humankind. *J Virol*. 1992;66(4):2057-2066.
- Chan SY, Dellijs H, Halpern AL, Bernard HU. Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types; uniting typing, phylogeny and taxonomy. *J Virol*. 1995;69(5):3074-3083.
- Chan PK, Lam CW, Cheung TH, Li WW, Lo KW, Chan MY, Cheung, JL, Cheng AF. Association of human papillomavirus type 58 variant with the risk of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2002;94(16):1249-1253.
- Chen Z, Terai M, Fu L, Herrero R, DeSalle R, Burk RD. Diversifying Selection in Human Papillomavirus Type 16 Lineages Based on Complete Genome Analyses. *J Virol*. 2005;79(11):7014-7023.
- Chen Z, Schiffman M, Herrero R, Desalle R, Anastos K, Segondy M, Sahasrabudhe VV, Gravitt PE, Hsing AW, Burk RD. Evolution and taxonomic classification of human papillomavirus 16 (HPV16)-related variant genomes: HPV31, HPV33, HPV35, HPV52, HPV58 and HPV67. *PLoS One*. 2011;6(5):e20183.
- Clark AG, Vignjevic DM. Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. *Curr Opin Cell Biol*. 2015;36:13-22.
- Cohen P, Frame S. The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(10):769-776.
- Contreras-Paredes A, De la Cruz-Hernandez E, Martinez-Ramirez I, Duenas- Gonzalez A, Lizano M. E6 variants of human papillomavirus 18 differentially modulate the protein kinase B/phosphatidylinositol 3-kinase (akt/PI3K) signaling pathway. *Virology*. 2009;383(1):78-85.
- Cornet I, Gheit T, Franceschi S, Vignat J, Burk RD, Sylla BS, Tommasino M, Clifford GM; IARC HPV Variant Study Group Human papillomavirus type 16 genetic variants: phylogeny and classification based on E6 and LCR. *J Virol*. 2012;86(12):6855-6861
- Cornet I, Gheit T, Clifford GM, Combes JD, Dalstein V, Franceschi S, Tommasino M, Clavel C. Human papillomavirus type 16 E6 variants in France and risk of viral persistence. *Infect Agent Cancer*. 2013;8(1):4.
- Cuadrado A, Nebreda AR. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J*. 2010;429(3):403-417.

- Cui J, Zhang M, Zhang YQ, Xu ZH. JNK pathway: diseases and therapeutic potential. *Acta Pharmacol Sin.* 2007;28(5):601-608.
- Dang CV. MYC, metabolism, cell growth, and tumorigenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(8). pii:a014217.
- Day PM, Lowy DR, Schiller JT. Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology.* 2003;307 (1):1-11.
- D'Abramo CM, Archambault J. Small Molecule Inhibitors of Human Papillomavirus Protein - Protein Interactions. *Open Virol J.* 2011;5:80-95.
- de Sanjose S, Diaz M, Castellsague X, Clifford G, Bruni L, Munoz N, Bosch, FX. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology; a meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2007;7(7):453-459.
- Deau MC, Favre M, Orth G. Genetic heterogeneity among human papillomavirus (HPV) associated with epidermiodisplasiaverruciforme; evidence for multiple allelic forms of HPV-5 and HPV-8 E6 genes. *Virology.* 1991;184(2):492-503.
- Deau MC, Favre M, Jablonska S, Rueda LA, Orth G. Genetic heterogeneity of oncogenic human papillomavirus type 5 (HPV-5) and phylogeny of HPV-5 variants associated with epidermio displasia verruciforme. *J Clin Microbiol.* 1993;31(11):2918-2926.
- Dews M, Homayouni A, Yu D, Murphy D, Seignani C, Wentzel E, Furth EE, Lee WM, Enders GH, Mendell JT, Thomas-Tikhonenko A. Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nat Genet.* 2006;38(9):1060-1065.
- Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene.* 2007;26(22):3279-3290.
- Ding Q, Xia W, Liu JC, Yang JY, Lee DF, Xia J, Bartholomeusz G, Li Y, Pan Y, Li Z, Bargou RC, Qin J, Lai CC, Tsai FJ, Tsai CH, Hung MC. Erk associates with and primes GSK-3 β for its inactivation resulting in upregulation of β -catenin. *Mol Cell.* 2005;19(2):159-170.
- Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol.* 2005;32 Suppl 1:S7-15.
- Doorbar J. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine.* 2012; 30 Suppl 5:F55-70.
- Doorbar J. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology.* 2013;445(1-2):80-98.
- Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human Papillomavirus molecular biology and disease association. *Reviews in Medical Virology.* 2015;25:2-23.

Duesberg PH, Vogt PK. Avian acute leukemia viruses MC29 and MH2 share specific RNA sequences: evidence for a second class of transforming genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(4):1633-1637.

Dyson N, Howley PM, Münger K, Harlow E. The human papillomavirus 16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*. 1989;243(4893):934-937.

Eilers, M, Picard, D, Yamamoto, KR, Bishop, JM. Chimaeras of myconcoprotein and steroid receptors cause hormone-dependent transformation of cells. *Nature*. 1989;340:66-68.

Feller L, Wood NH, Khammissa RA, Lemmer J. Human papillomavirus-mediated carcinogenesis and HPV-associated oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. Part 1: human papillomavirus-mediated carcinogenesis. *Head Face Med*. 2010;6:14.

Fehrmann F, Laimins L. Human papillomaviruses; targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene*. 2003;22(33):5201-5207.

Fragoso-Ontiveros V, María Alvarez-García R, Contreras-Paredes A, Vaca-Paniagua F, Alonso Herrera L, López-Camarillo C, Jacobo-Herrera N, Lizano-Soberón M, Pérez-Plasencia C. Gene expression profiles induced by E6 from non-European HPV18 variants reveals a differential activation on cellular processes driving to carcinogenesis. *Virology*. 2012;432(1):81-90.

GLOBOCAN 2012 ,disponível em;<http://globocan.iarc.fr>

Griffin H, Wu Z, Marnane R, Dewar V, Molijn A, Quint W, Van Hoof C, Struyf F, Colau B, Jenkins D, Doorbar J. E4 antibodies facilitate detection and type-assignment of active HPV infection in cervical disease. *PLoS One*. 2012;7(12):e49974.

Grille SJ, Bellacosa A, Upson J, Klein-Szanto AJ, van Roy F, Lee-Kwon W, Donowitz M, Tschlis PN, Larue L. The protein kinase Akt induces epithelial mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines. *Cancer Res*. 2003;63(9):2172-2178.

Gurgel AP, Chagas BS, do Amaral CM, Nascimento KC, Leal LR, Silva Neto Jda C, Cartaxo Muniz MT, de Freitas AC. Prevalence of human papillomavirus variants and genetic diversity in the L1 gene and long control region of HPV16, HPV31, and HPV58 found in North-East Brazil. *Biomed Res Int*. 2015;2015:130828.

Halbert CL, Demers GW, Galloway DA. The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *J Virol*. 1991;65(1):473-478.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674.

Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, Lowy DR, Schiller JT. HPV-16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J*. 1989;8(12):3905-3910.

Heinzel, PA, Chan, SY, Ho L., O'connor M, Balaram P, Campo MS, Fujinag, K, Kiviat N, Kuypers, J, Pfister H, Steinberg BM, Tay SK., Villa LL, Bernard HU. Variation of human papillomavirus type (HPV-6) and HPV-11 genome samples throughout the world. *J Clin Microbiol.* 1995;33(7):1746-1754.

Hemmings BA, e Restuccia DF. The PI3K-PKB/Akt Pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7(4):a026609.

Hildesheim A, Schiffman M, Bromley C, Wacholder S, Herrero R, Rodriguez A, Bratti MC, Sherman ME, Scarpidis U, Lin QQ, Terai M, Bromley RL, Buetow K, Apple RJ, Burk RD. Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93(4):315-318.

Ho L, Chan SY, Chow V, Chong T, Tay SK, Villa LL, Bernard HU. Sequence variants of human papillomavirus type 16 in clinical samples permit verification and extension of epidemiological studies and construction of a phylogenetic tree. *J Clin Microbiol.* 1991;29(9):1765-1772.

Ho L, Chan SY, Burk RD, Das BC, Fujinaga K, Icenogle JP, Kahn T, Kiviat N, Lancaster W, Mavromara-Nazos P, Labropoulou V, Mitrani-Rosenbaum S, Norrild B, Pillai M.R, Stoerker, J, Syrjaenen K, Syrjaenen S, Tay SK, Villa LL, Wheeler CM, Williamson AL, Bernard HU. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a mean of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *J Virol.* 1993;6(11):6413-6423.

Hochmann J, Simão Sobrinho J, Villa LL, Sichero L. The Asian-American variant of human papillomavirus type 16 exhibits higher activation of MAPK and PI3K/AKT signaling pathways, transformation, migration and invasion of primary human keratinocytes. *Virology.* 2016;492:145-154.

IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.2007;v90.

IARC Monographs on Biological Agents, a review of Human Carcinogens. 2012.v100B

Icenogle J. Analysis of the sequences of the L1 and L2 capsid proteins of papillomaviruses. *Centres for Diseases Control.* 1995;74-90.

Jeffrey KL, Camps M, Rommel, Mackay CR. Targeting dual-specificity phosphatases; manipulating MAP kinase signalling and immune responses. *Nature Reviews Drug Discovery.* 2007;6(5):391-403.

Junes-Gill K, Sichero L, Maciag PC, Mello W, Noronha V, Villa LL. Human papillomavirus type 16 variants in cervical cancer from an admixed population in Brazil. *J Med Virol.* 2008;80(9):1639-1645.

Kalluri R. EMT; when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J Clin Invest.* 2009;119(6):1417-1419.

- Kämmer C, Warthorst U, Torres-Martinez N, Wheller CM, Pfister H. Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for p97 promoter activity. *J Gen Virol*. 2000;81(Pt 8):1975-1981.
- Kell B, Jewers RJ, Cason J, Pakarian F, Kaye JN, Best JM. Detection of E5 oncoprotein in human papillomavirus type 16-positive cervical scrapes using antibodies raised to synthetic peptides. *J Gen Virol*. 1994;75(Pt 9):2451-2456.
- Khleif SN, DeGregori J, Yee CL, Otterson GA, Kaye FJ, Nevins JR, Howley PM. Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. *Proc Natl Acad Sci*. 1996;93(9):4350-4354.
- Kim EK, Choi EJ. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1802(4):396-405.
- Kim D, Kim S, Koh H, Yoon SO, Chung AS, Cho KS, Chung J. Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production. *FASEB J*. 2001;15(11):1953-1962.
- Kim TJ, Lee A, Lee SJ, Lee WC, Choi YJ, Lee KY, Kang SC. Prognostic Significance of Amplification of the c-MYC Gene in Surgically Treated Stage IB-IIB Cervical Cancer. *The Korean Journal of Pathology*. 2011;45:596-603
- Kitasato H, Delius H, ZurHausen H, Sorger K, Rösl F, de Villiers EM. Sequence rearrangements in the upstream regulatory region of human papillomavirus type 6; are these involved in malignant transition? *J Gen Virol* 1994;75(Pt 5):1157-1162.
- Klaes R, Friedrich T, Spitkoysky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, Dallenbach-Hellweg G, Schmidt D, Von Knebel Doeberitz M. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer*. 2001;92(2):276-284.
- Klingelhutz AJ, Foster SA, McDougall JK. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature*. 1996;380(6569):79-82.
- Kohl NE, Ruley HE. Role of c-myc in the transformation of REF52 cells by viral and cellular oncogenes *Oncogene*. 1987;2(1): 41-48.
- Lace MJ, Anson JR, Turek P, Haugen TH. Functional mapping of the human papillomavirus type 16 E1 cistron. *J Virol*. 2008;82(21):10724-10734.
- Land H, Parada LF, Weinberg RA. Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature*. 1983;304,p596-602.
- Larue L, Bellacosa A. Epithelial–mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene*. 2005;24(50):7443-7454.
- Leber MF, Efferth T. Molecular principles of cancer invasion and metastasis (review). *Int J Oncol*. 2009;34(4):881-895

Lechner MS, Laimins, LA. Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. *J Virol*. 1994;68(7):4262-4273.

Lichtig H, Algrisi M, Botzer LE, Abadi T, Verbitzky Y, Jackman A, Tommasino M, Zehbe I, Sherman L. HPV16 E6 natural variants exhibit different activities in functional assays relevant to the carcinogenic potential of E6. *Virology*. 2006;350(1):216-227.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)). *Method Methods*. 2001;25(4):402-408.

Londesborough P, Ho L, Terry G, Cuzick J, Wheeler C, Singer A. Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities. *Int J Cancer*. 1996;69 (5):364-368.

Lugo TG, Witte ON. The BCR-ABL oncogene transforms Rat-1 cells and cooperates with v-myc. *Mol Cell Biol*. 1989;9(3):1263-1270.

Luo J. Glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) in tumorigenesis and cancer chemotherapy. *Cancer Lett*. 2009;273(2):194-200.

Ma Y, Wei SJ, Lin YC, Lung JC, Chang TC, Whang-Peng J, Liu JM, Yang DM, Yang WK, Shen CY. PIK3CA as an oncogene in cervical cancer. *Oncogene*. 2000;19(23):2739-2744.

Mammas IN, Sourvinos G, Giannoudis A, Spandidos DA Human Papilloma Virus (HPV) and Host Cellular Interactions. *Pathol Oncol Research*. 2008;14(4):345-354.

Martinez-Zapien D, Ruiz FX, Poirson J, Mitschler A, Ramirez J, Forster A, Cousido-Siah A, Masson M, Vande Pol S, Podjarny A, Travé G, Zanier K Structure of the E6/E6AP/p53 complex required for HPV-mediated degradation of p53. *Nature*. 2016;529(7587):541-545.

McBride AA. The papillomavirus E2 proteins. *Virology*. 2013;5(1-2):57-79.

McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Tafuri A, Stivala F, Libra M, Basecke J, Evangelisti C, Martelli AM, Franklin RA. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1773 (8):1263–84.

McCubrey JA, Steelman LS, Bertrand FE, Davis NM, Sokolosky M, Abrams SL, Montalto G, D'Assoro AB, Libra M, Nicoletti F, Maestro R, Basecke J, Rakus D, Gizak A, Demidenko ZN, Cocco L, Martelli AM, Cervello M. GSK-3 as potential target for therapeutic intervention in cancer. *Oncotarget*. 2014;5(10):2881-2911.

McCain J. The MAPK (ERK) Pathway. Investigational Combinations for the Treatment Of BRAF-Mutated Metastatic Melanoma. *P T*. 2013;38(2):96-98

Mendoza MC, Er EE, e Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR Pathways: Cross-talk and Compensation. *Trends Biochem Sci*. 2011;36(6):320-328.

Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins; pathways to transformation. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(8):550-560.

Mori S, Chang JT, Andrechek ER, Matsumura N, Baba T, Yao G, Kim JW, Gatz M, Murphy S, Nevins JR. Anchorage-independent cell growth signature identifies tumors with metastatic potential. *Oncogene*. 2009;28(31):2796-2805.

Morin PJ. Beta-catenin signaling and cancer. *BioEssays*. 1999;21(12):1021-1030.

Morrish F, Noonan J, Perez-Olsen C, Gafken PR, Fitzgibbon M, Kelleher J, VanGilst M, Hockenbery D. Myc-dependent mitochondrial generation of acetyl-CoA contributes to fatty acid biosynthesis and histone acetylation during cell cycle entry. *J Biol Chem*. 2010;285(47):36267-36274.

Munger K, Phelps WC, Bubb V, Howley PM, Schlegel R. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol*. 1989;63(10):4417-4421.

Muñoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS, Shah KV, Meijer CJ, Bosch FX. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer; the IARC multicentric case-control study. *Lancet*. 2002;359(9312):1093-1101.

Nair SA, Nair MB, Jayaprakash PG, Rajalekshmy TN, Nair MK, Pillai MR. ras and c-myc oncoproteins during tumor progression in the uterine cervix. *Tumori*. 1998;84(5):583-588.

Nakahara T, Peh WL, Doorbar J, Lee D, Lambert PF. Human papillomavirus type 16 E1/circumflexE4 contributes to multiple facets of the papillomavirus life cycle. *J Virol*. 2005;79(20):13150-13165.

Niccoli S, Abraham S, Richard C, Zehbe I. The Asian-American E6 variant protein of human papillomavirus 16 alone is sufficient to promote immortalization, transformation, and migration of primary human foreskin keratinocytes. *J Virol*. 2012;86 (22):12384-12396.

Nindl I, Rindfleisch K, Lotz B, Schneider A, Dürst M. Uniform distribution of HPV 16 E6 and E7 variants in patients with normal histology, cervical intra-epithelial neoplasia and cervical cancer. *Int J Cancer*. 1999;82(2):203-207.

Ong CK, Chan SY, Campo MS, Fujinaga K, Mavromara-Nazos P, Labropoulou V, Pfister H, Tay SK, TerMeulen J, Villa LL, Bernard HU. Evolution of human papillomavirus type 18; an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *J Virol*. 1993;67(11):6424-6431.

Ortiz-Ortiz J, Alarcón-Romero L del C, Jiménez-López MA, Garzón-Barrientos VH, Calleja-Macías I, Barrera-Saldaña HA, Leyva-Vázquez MA, Illades-Aguilar B. Association of human papillomavirus 16 E6 variants with cervical carcinoma and precursor lesions in women from Southern Mexico. *Virol J*. 2015;12:29.

O'Shaughnessy RF, Akgül B, Storey A, Pfister H, Harwood CA, Byrne C. Cutaneous human papillomaviruses down-regulate AKT1, whereas AKT2 up-regulation and activation associates with tumors. *Cancer Res.* 2007;67(17):8207-8215.

Palomero T, Lim WK, Odom DT, Sulis ML, Real PJ, Margolin A, Barnes KC, O'Neil J, Neuberg D, Weng AP, Aster JC, Sigaux F, Soulier J, Look AT, Young RA, Califano A, Ferrando AA. NOTCH1 directly regulates c-MYC and activates a feed-forward-loop transcriptional network promoting leukemic cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(48):18261-18266.

Patel D, Huang SM, Baglia LA, McCance DJ. The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300. *EMBO J.* 1999;18(18):5061-5072.

Pérez-Plasencia C, Vázquez-Ortiz G, López-Romero R, Piña-Sanchez P, Moreno J, Salcedo M. Genome wide expression analysis in HPV16 cervical cancer; identification of altered metabolic pathways. *Infect Agent Cancer.* 2007;2:16.

Picconi MA, Gronda J, Alonio LV, Villa LL, Sichero L, Miranda S, Barcena M, Teyssie A. [Human Papilloma virus in Quechua women from Jujuy with high frequency of cervical cancer: viral types and HPV-16 variants]. *Medicina (B Aires).* 2002;62(3):209-220.

Picconi MA, Alonio LV, Sichero L, Mbayed V, Villa LL, Gronda J, Campos R, Teyssié A. Human papillomavirus type-16 variants in Quechua aboriginals from Argentina. *Med Virol.* 2003;69(4):546-552.

Pim D, Collins M, Banks, L. Human papillomavirus type 16 E5 gene stimulates the transforming activity of the epidermal growth factor receptor. *Oncogene.* 1992;v7(1):27-32.

Raff AB, Woodham AW, Raff LM, Skeate JG, Yan L, Da Silva DM, Schelhaas M, Kast WM. The evolving field of human papillomavirus receptor research: a review of binding and entry. *J Virol.* 2013;87(11):6062-6072.

Ramesar JE, Rybicki EP, Williamson AL. Sequence variation in the L1 gene of human papillomavirus type 16 from Africa. *Arch Virol.* 1995;140(10):1863-1870.

Rath G, Jawanjal P, Salhan S, Nalliah M, Dhawan I. Clinical significance of inactivated glycogen synthase kinase 3 β in HPV-associated cervical cancer; Relationship with Wnt/ β -catenin pathway activation. *Am J Reprod Immunol.* 2015;73(5):460-478.

Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. The JAK/STAT signaling pathway. *Journal of Cell Science.* 2004;117(Pt 8):1281-1283.

Richard C, Lanner C, Naryzhny SN, Sherman L, Lee H, Lambert PF, Zehbe I. The immortalizing and transforming ability of two common human papillomavirus 16E6 variants with different prevalences in cervical cancer. *Oncogene.* 2010;29(23):3435-3445.

Robertson N, Potter C, e Harris AL. Role of Carbonic Anhydrase IX in Human Tumor Cell Growth, Survival, and Invasion. *Cancer Res.* 2004;64(17):6160-6165.

- Rousseau MC, Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Termini L, Prado JM, Rohan TE. A cumulative case-control study of risk factor profiles for oncogenic and nononcogenic cervical human papillomavirus infections. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2000;9(5):469-476.
- Seedorf K, Krämmer G, Dürst M, Suhai S, Röwekamp WG. Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology.* 1985;145(1):181-185.
- 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):1129-1136.
- Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. The HPV-16 E6 and E6-AP Complex Functions as a Ubiquitin- Protein Ligase in the Ubiquitination of p53. *Cell.* 1993;75(3):495-505.
- Schiller JT, Vass WC, Vousden KH, Lowy DR. The E5 open reading frame of bovine papillomavirus type 1 encodes a transforming gene. *J Virol.* 1986;57(1):1-6.
- Schweiger MR, Ottinger M, You J, Howley PM. Brd4 independent transcriptional repression function of the papillomavirus E2 proteins. *J. Virol.* 2007;81(18):9612-22.
- Shayesteh L, Lu Y, Kuo WL, Baldocchi R, Godfrey T, Collins C, Pinkel D, Powell B, Mills GB, e Gray JW. PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nat Genet.* 1999;21(1): 99-102.
- Shou Y, Martelli ML, Gabrea A, Qi Y, Brents LA, Roschke A, Dewald G, Kirsch IR, Bergsagel PL, Kuehl WM. Diverse karyotypic abnormalities of the c-myc locus associated with c-myc dysregulation and tumor progression in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(1):228-233.
- Sichero L, Ferreira S, Trottier H, Duarte-Franco E, Ferenczy A, Franco EL, Villa LL. High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18. *Int J Cancer.* 2007a;120(8):1763-1768.
- Sichero L, Trottier H, Ferreira S, Duarte-Franco E, Franco EL, Villa LL. Re: Human papillomavirus type 16 and 18 variants: race-related distribution and persistence. *J Natl Cancer Inst.* 2007b;99(8):653-654.
- Sichero L, Sobrinho JS, Villa LL. Identification of novel cellular transcription factors that regulate early promoters of human papillomavirus types 18 and 16. *J Infect Dis.* 2012a;206(6):867-874.
- Sichero L, Sobrinho JS, Villa LL. Oncogenic potential diverge among human papillomavirus type 16 natural variants. *Virology.* 2012b;432(1):127-132.
- Smits HL, Traanberg KF, Krul MR, Prussia PR, Kuiken CL, Jeebinke MF, Kleyne JA, Van Den Berg RH, Capone B, de Bruyn A, Schegget T. Identification of a unique group of

- human papillomavirus type 16 sequence variants among clinical isolates from Barbados. *J Gen Virol*. 1994;75(Pt 9):2457-2462.
- Smith B, Chen Z, Reimers L, van Doorslaer K, Schiffman M, Desalle R, Herrero R, Yu K, Wacholder S, Wang T, Burk RD. Sequence imputation of HPV16 genomes for genetic association studies. *Plos One*. 2011;6(6):e21375.
- Sominsky S, Kuslansky Y, Shapiro B, Jackman A, Haupt Y, Rosin-Arbesfeld R, Sherman L. HPV16 E6 and E6AP differentially cooperate to stimulate or augment Wnt signaling. *Virology*. 2014;468:510-523.
- Spangle JM, Münger K. The HPV16 E6 oncoprotein causes prolonged receptor protein tyrosine kinase signaling and enhances internalization of phosphorylated receptor species. *PLoS Pathog*. 2013;9(3):e1003237.
- Stöppler MC, Ching K, Stöppler H, Clancy K, Schlegel R, Icenogle J. Natural variants of the human papillomavirus type 16 E6 protein differ in their abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation. *J Virol*. 1996;70(10):6987-6993.
- Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, Breuer, J, Leigh IM, Matlashewski G, Banks L. Role of p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature*. 1998;393(6682):229-234.
- Subramanyam D, Krishna S. c-Myc substitutes for Notch1-CBF1 functions in cooperative transformation with papillomavirus oncogenes. *Virology*. 2006;347(1):191-198.
- Symonds RP, Habeshaw T, Paul J, Kerr DJ, Darling A, Burnett RA, Sotsiou F, Linardopoulos S, Spandidos DA No correlation between ras, c-myc and c-jun proto-oncogene expression and prognosis in advanced carcinoma of cervix. *European J Cancer*. 1992;28A(10):1615-1617.
- Thomas M, Pim D, Banks L. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene*. 1999;18(53):7690-7700.
- Terry G, Ho L, Cuzick J. Analysis of E2 amino acid variants of human papillomavirus types 16 and 18 and their associations with lesion grade and HLA DR/DQ type. *Int J Cancer*. 1997;73(5):651-655.
- Togtema M, Jackson R, Richard C, Niccoli S, Zehbe I. The human papillomavirus 16 European-T350G E6 variant can immortalize but not transform keratinocytes in the absence of E7. *Virology*. 2015;485:274-282.
- Tommasino M, Adamczewski JP, Carlotti F, Barth CF, Manetti R, Contorni M, Cavalieri F, Hunt T, Crawford L. HPV-16 E7 protein associates with the protein kinase p33CDK2 and cyclin A. *Oncogene*. 1993;8(1):195-202.
- Tong X, Howley PM. The bovine papillomavirus E6 oncoprotein interacts with paxilin and disrupts the actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci*. 1997;94(9):4412-4417.

Vande Pol S. Papillomavirus E6 Oncoproteins Take Common Structural Approaches to Solve Different Biological Problems. *Plos Pathogens*. 2015;11(10):e1005138.

van Duin M, Snijders PJ, Vossen MT, Klaassen E, Voorhorst F, Verheijen RH, Helmerhorst TJ, Meijer CJ, Walboomers JM. Analysis of human papillomavirus type 16 E6 variants in relation to p53 codon 72 polymorphism genotypes in cervical carcinogenesis. *J Gen Virol*. 2000;81(Pt 2):317-325.

van Riggelen J, Yetil A, Felsher DW. MYC as a regulator of ribosome biogenesis and protein synthesis. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(4):301-309.

van Zijl F, Krupitza G, Mikulits W. Initial steps of metastasis: cell invasion and endothelial transmigration. *Mutat Res*. 2011;728(1-2):23-34.

Venuti A, Paolini F, Nasir L, Corteggio A, Roperto S, Campo MS, Borzacchiello G. Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. *Mol Cancer*. 2011 10:140.

Veress G, Szarka K, Dong XP, Gergely L, Pfister P. Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol*. 1999;80(Pt 4):1035-1043.

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):374-377.

Vita M, Henriksson M. The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. *Semin Cancer Biol*. 2006;16(4):318-330.

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snidgers PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 1999;189(1):12-19.

Wang JW, e Roden RB. L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology*. 2013;445(1-2):175-86.

Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*. 1990;248(4951):76-79.

Wiens ME, Smith JG. Alpha-defensin HD5 inhibits furin cleavage of human papillomavirus 16 L2 to block infection. *J Virol*. 2014;89(5):2866-2874.

Wise DR, DeBerardinis RJ, Mancuso A, Sayed N, Zhang XY, Pfeiffer HK, Nissim I, Daikhin E, Yudkoff M, McMahon SB, Thompson CB. Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(48):18782-18787.

Xi LF, Koutsky LA, Galloway DA, Kuypers J, Hughes JP, Wheeler CM, Holmes KK, Kiviat NB. Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst*. 1997;89(11):796-802.

Xi LF, Crichtlow CW, Wheeler CM, Koutsky LA, Galloway DA, Kuypers J, Hughes JP, Hawes SE, Surawicz C, Goldbaum G, Holmes KK, Kiviat NB. Risk of anal carcinoma in situ in relation to human papillomavirus type 16 variants. *Cancer Res.*1998;1;58(17):3839-3844.

Xi LF, Carter JJ, Galloway DA, Kuypers J, Hughes JP, Lee SK, Adam DE, Kiviat NB, Koutsky LA. Acquisition and natural history of human papillomavirus type 16 variant infection among a cohort of female university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002;11(4):343-351.

Xi LF, Kiviat NB, Hildesheim A, Galloway DA, Wheeler CM, Ho J, Koutsky LA. Human papillomavirus type 16 and 18 variants: race-related distribution and persistence. *J Natl Cancer Inst.* 2006; 2;98(15):1045-1052.

Xi LF, Koutsky LA, Hildesheim A, Galloway DA, Wheeler CM, Winer RL, Ho J, Kiviat NB. Risk for high-grade cervical intraepithelial neoplasia associated with variants of human papillomavirus types 16 and 18. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007;16(1):4-10.

Yamada T, Wheeler CM, Halpern AL, Stewart AC, Hildesheim A, Jenison SA. Human papillomavirus type 16 lineages in the United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2 and L1 coding segments. *J Virol.* 1995;69(12):7743-7753.

Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Munoz N, Bosch FX, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers; a worldwide perspective. *J Virol.* 1997;71(3):2463-2472.

Yamaguchi H, Condeelis J. Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochim Biophys Acta.* 2007 ;1773(5):642-652.

Yim EK, Park JS. The Role of HPV E6 and E7 Oncoproteins in HPV-associated Cervical Carcinogenesis. *Cancer Res Treat.* 2005;37(6):319-324.

Yoon S, Seger R. The extracellular signal-regulated kinase; multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors.* 2006;24(1):21-44.

Zhang A, Månér S, Betz R, Angström T, Stendahl U, Bergman F, Zetterberg A, Wallin KL. Genetic alterations in cervical carcinomas: frequent low-level amplifications of oncogenes are associated with human papillomavirus infection. *Int J Cancer.* 2002;101(5):427-433.

Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research.* 2002;12:9-18.

Zhang B, Spanda DF, Roman A. E5 Protein of Human Papillomavirus Type 16 Protects Human Foreskin Keratinocytes from UV B-Irradiation-Induced Apoptosis. *J Virol.* 2002;76(1):220-231.

Zhu D, Jiang XH, Jiang YH, Ding WC, Zhang CL, Shen H, Wang XL, Ma D, Hu Z, Wang H. Amplification and overexpression of TP63 and MYC as biomarkers for transition of

cervical intraepithelial neoplasia to cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2014;24(4):643-648.

Zehbe I, Wilander E, Delius H, Tommasino M. Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res*. 1998a;58(4):829-833.

Zehbe I, Voglino G, Delius H, Wilander E, Tommasino M. Risk of cervical cancer and geographical variations of human papillomavirus 16 E6 polymorphisms. *Lancet*. 1998b;352(9138):1441-1442.

Zehbe I, Richard C, DeCarlo CA, Shai A, Lambert PF, Lichtig H, Tommasino M, Sherman L. Human papillomavirus 16 E6 variants differ in their dysregulation of human keratinocyte differentiation and apoptosis. *Virology*. 2009;383(1):69-77.

Zehbe I, Lichtig H, Westerback A, Lambert PF, Tommasino M, Sherman L. Rare human papillomavirus 16 E6 variants reveal significant oncogenic potential. *Mol Cancer*. 2011;10:77.

Ziello JE, Jovin IS, Huanga Y. Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 Regulatory Pathway and its Potential for Therapeutic Intervention in Malignancy and Ischemia. *Yale J Biol Med*. 2007;80(2):51-60.

Zuna RE, Tuller E, Wentzensen N, Mathews C, Allen RA, Shanesmith R, Dunn ST, Gold MA, Wang SS, Walker J, Schiffman M. HPV-16 variant lineage, clinical stage, and survival in woman with invasive cervical cancer. *Infect Agent Cancer*. 2011;6:19.

zur Hausen, H. Papillomaviruses causing cancer; evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(9):690-698.

Anexos

8. ANEXOS

ANEXO 1. Comprovante do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Protocolo de Pesquisa N 248/13

CIÊNCIA

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 27 de Março de 2015, **TOMOU CIÊNCIA do(s) documento(s)** abaixo mencionado(s) no Protocolo de Pesquisa nº **248/13**, intitulado: **“Análise do impacto das proteínas E6/E7 de diferentes variantes moleculares de HPV-16 sob as vias de transdução de sinal mediadas por MAPK”** apresentado pelo **Instituto do Câncer do Estado de São Paulo – Octavio Frias de Oliveira**

• **Mudança de pesquisador executante para Jimena Paola Hochmann Valls**

Pesquisador (a) Responsável: **Laura Sichero Vettorazzo**

CEP-FMUSP, 27 de Março de 2015

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO 2. Manuscrito - Hochmann *et al*, 2016.

The Asian-American variant of human papillomavirus type 16 exhibits higher activation of MAPK and PI3K/AKT signaling pathways, trans-formation, migration and invasion of primary human keratinocytes

Jimena Hochmann^a, João S Sobrinho^a, Luisa L. Villa^{a,b}, Laura Sichero^{a,*}

^a Center for Translational Research in Oncology, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brazil

^b Department of Radiology and Oncology, School of Medicine, University of São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 December 2015

Returned to author for revisions

16 February 2016

Accepted 18 February 2016

Keywords:

HPV-16

Molecular variants

Transformation

Migration

Intracellular signaling

ABSTRACT

Asian-American (AA) HPV-16 variants are associated with higher risk of cancer. Abnormal activation of intracellular signaling play a critical role in cancer development and progression. Our aim was to elucidate mechanisms underlying the higher oncogenic potential attributed to AA variant. We evaluated activation of MAPK and PI3K/AKT pathways in primary human keratinocytes (PHKs) transduced with E6/E7 of three HPV-16 variants: E-P, AA, E-350G. Phenotypes examined included migration, anchorage independent growth and invasion. AA PHKs presented the highest levels of active proteins involved in all cascades analyzed: MAPK-ERK, MAPK-p38 and PI3K-AKT. AA PHKs were more efficient in promoting anchorage independent growth, and in stimulating cell migration and invasion. MEK1 inhibition decreased migration. The mesenchymal phenotype marker vimentin was increased in AA PHKs. Our results suggest that MEK1, ERK2, AKT2 hyperactivation influence cellular behavior by means of GSK-3b inactivation and EMT induction prompting AA immortalized PHKs to more efficiently surpass carcinogenesis steps.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Persistent infection by high-risk HPV-16 (human papilloma-virus type 16) accounts for the development of ~60% of cervical cancers worldwide. HPV-16 DNA is also detected in the vast majority of HPV positive vulvar, vaginal, penile, anal canal and

oropharyngeal tumors (IARC Working, 2007). HPV variants arise in consequence of cumulative nucleotide mutations in limited viral genome positions. Taxonomically, sequence divergence < 2% within the L1 gene defines viral variants. HPV-16 variants were shown to segregate in phylogenetic related lineages: European (E), Asian-American (AA), Asian (As) and African (Af) (Ho et al., 1993).

Worldwide circulation of the diverse HPV-16 variants correlates with the intrinsic admixture level of each population (Sichero and Villa, 2006). A higher risk for cervical intraepithelial neoplasia (CIN) development assigned to non-E compared to E variants was clearly demonstrated among interethnic admixed American populations (Freitas et al., 2014; Sichero et al., 2007; Xi et al., 2007; Zuna et al., 2011). Further, among Americans a higher prevalence of AA variants is found in cervical cancer (Berumen et al., 2001; Hildesheim et al., 2001; Junes-Gill et al., 2008; Ortiz-Ortiz et al., 2015). However, in more homogeneous European populations wherein E variants mostly prevail, the HPV-16 E-350G (E variant harboring the E6 T350G transition) was proposed as an additional risk factor for viral persistence and CIN grade 2/3 development compared to the E-P (European prototype) (Londesborough et al., 1996; Zehbe et al., 1998). The non-synonymous T350G substitution (L83V) is also characteristic of all AA variants, although these

Abbreviations: (Af), African; (As), Asian; (AA), Asian-American; (CREB), cAMP response element-binding protein; (CIN), cervical intraepithelial neoplasia; (EMT), Epithelial to mesenchymal transition; (E), European; (E-P), European prototype; (ERK2), extracellular signal regulated kinase; (GSK-3b), glycogen synthase kinase; (HSP-27), heat shock protein 27; (HBV), hepatitis B virus; (HPV), human papilloma-virus; (MAPK-JNK), Jun amino-terminal kinases; (KSFM), keratinocyte serum free medium; (MAP3K or MAPKKK), MAPK kinase kinase; (MAPK), mitogen activated protein kinase; (MSK2), mitogen- and stress-activated kinase; (PIP3), phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate; (PIP2), phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate; (PI3K/AKT), phosphoinositide-3-kinase/protein kinase B; p(PHKs), primary human keratinocytes; (PDK1), pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1; (RPTK), receptor protein tyrosine kinase; (RSK1), ribosomal protein S6 kinase

* Correspondence to: Center of Translational Research in Oncology-ICESP, Av. Dr. Arnaldo, 251, 8 andar, 01246-000, Cerqueira César, São Paulo, SP, Brazil.

E-mail addresses: jimena.valls@icesp.org.br (J. Hochmann), simao.j@yahoo.com.br (J. Sobrinho), luisa.villa@hc.fm.usp.br (L.L. Villa), laura.sichero@hc.fm.usp.br, lsichero@gmail.com (L. Sichero).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2016.02.015>

0042-6822/© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

isolates additionally harbor two amino acid variations in E6 (AA E6: Q14H/H78Y/L83V) (Yamada et al., 1995).

E6 and E7 viral proteins are constitutively expressed during HPV-16 induced carcinogenesis. Diverse cellular partners for high-risk HPV E6 and E7 proteins have been identified among which the best characterized are the binding and degradation to p53 and pRb, respectively (Münger et al., 1989; Scheffner et al., 1993). Both tumor suppressor proteins normally operate as central control nodes for cellular proliferation. Thus, these associations confer to E6 and E7 the ability to cooperate towards immortalization and abolishment of serum and calcium induced differentiation of primary human keratinocytes (Hawley-Nelson et al., 1989; Stanley, 2010).

Some studies have been conducted to depict biological and biochemical properties of HPV-16 variants underlying differences in the oncogenic potential observed (Richard et al., 2010; Slichero et al., 2012; Zehbe et al., 2011). Specifically, E6 expression in the background of immortalized keratinocytes (HaCat cells) revealed that the E-350G variant was more effective in enhancing MAPK (mitogen activated protein kinase) signaling and cooperative transformation with activated NOTCH1 as compared to the E-P (Chakrabarti et al., 2004). Evaluation of HPV-16 positive tumors transcriptome also pointed to the up-regulation of several effectors of MAPK signaling cascades, indicating a potential involvement of these pathways in the pathogenesis of cervical carcinoma (Pérez-Plasencia et al., 2007).

MAPK mediated pathways are evolutionary conserved and pivotal for providing communication between extracellular signals and the cellular machinery that controls growth, proliferation, differentiation, migration and apoptosis. Intracellular signaling requires a core three-kinase cascade including a MAPK kinase kinase (MAP3K or MAPKKK) which activates through phosphorylation a MAPK kinase (MAP2K, MEK or MKK) which further activate one or more MAPKs (ERK1/2, JNK1-3, and p38). Active MAPKs subsequently regulate a variety of proteins including transcription factors and other kinases (Dhillon et al., 2007). The PI3K/AKT (phosphoinositide-3-kinase/protein kinase B) signaling pathway also plays a key role in mediating survival and growth in response to extracellular stimuli. Initially activated PI3K at the plasma membrane phosphorylates PIP2 (phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate) to generate PIP3 (phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate), which in turn recruits AKT and PDK1 (pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1) to the plasma membrane where PDK1 phosphorylates AKT to its active form (Fresno Vara et al., 2004). It is noteworthy that MAPK and AKT cascades cross-talk at several levels to endow cells to decode and process different combinations of extracellular signals (Aksamitiene et al., 2002). The development and progression of multiple cancers critically rely on abnormal operation of these pathways (McCubrey et al., 2007).

In the present study, we evaluated the activation of MAPK and PI3K/AKT mediated pathways in primary keratinocytes immortalized by E6/E7 of three different variants of HPV-16 in order to understand mechanisms underlying the greater prevalence of AA variants in cervical cancer. We further aimed to comprehend how alterations in these cascades induced by HPV-16 variants impact upon selected cellular processes: ability to grow independent of anchorage, and to promote cell migration and invasion.

2. Materials and methods

2.1. Cells

Pools of primary newborn foreskin human keratinocytes (PHK) were purchased from Clonetics, NJ, USA (cat n 00192906, lot n

0000252415, certificate of analysis provided by the supplier), and maintained in keratinocyte serum free medium (KSFM) supplemented with 5ng/mL epidermal growth factor (EGF) and 50 µg/mL bovine pituitary extract (Invitrogen, CA, USA). These cell lines were used at passage <8 and were periodically authenticated by monitoring of cell morphology and growth curve analysis. PHKs stably transduced with E6 and E7 from different molecular variants of HPV-16 were obtained as previously described (Slichero et al., 2012). HPV-immortalized keratinocyte clones used in this study were tested internally for HPV DNA status, viral RNA expression patterns and cell growth kinetics. Primary PHKs and immortalized cells were tested internally for mycoplasma by PCR. HPV trasduced cells were continuously sub-cultured 1:6 whenever 80–90% confluence was reached and considered immortalized after 30 passages (Halbert et al., 1991). PHKs immortalized with three distinct HPV-16 variants were used throughout this study: E-P (European prototype), E-350G (E6:L83V), and AA (E6:Q14H/H78Y/L83AA). Inhibition of MEK1/2 phosphorylation was achieved by incubating cells with 15 µM U0126 (Promega, WI, USA) for 30 min.

2.2. Western blot

Prior to protein extraction cells were cultured in KSFM lacking EGF for two hours. Cells pellets were washed with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS), centrifuged, and protein lysates extracted by incubation on ice for 30 min with RIPA buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% sodium deoxycholate, 1% NP-40, 0.1% SDS) containing complete protease and phosphatase inhibitor cocktails (Roche, Basel, Switzerland). Nuclear proteins extracts were obtained using the Nuclear Extraction Kit (Affymetrix USB, CA, USA). Between 50 and 100 µg of protein extracts were loaded onto 10–15% SDS-polyacrylamide gels, electrophoresed, and transferred to PVDF membranes (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Primary antibodies were used at the following dilutions: anti-E6 (1.8 µg/mL, AVC#1006, Arbor Vita Corporation, CA, USA), anti-p53 NCLp53-DO1 (1:200, Novocastra, Wetzlar, Germany), and anti-tubulin (1:5,000, OT-9026, Sigma, MI, USA). All other antibodies were purchased from abcam (abcam, MA, USA): anti-p16 (1:1,000, ab16123), anti-MEK1 (1:500, ab32091), anti-MEK2 (1:500, ab32517), anti-MEK1 phospho (1:500, ab131342), anti-MEK2 phospho (1:500, ab30622), anti-cMYC (1:500, ab69987), anti-vimentin (1:1,000, ab8978), and anti-E-cadherin (1:500, ab1416). Antirabbit or antimouse HRP-conjugated secondary antibodies (GE Healthcare Buckinghamshire, UK) were used at a dilution of 1:5,000. Proteins were visualized using the ECL Plus Western Blotting detection system (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) in a ImageQuant LAS4.000 equipment (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). p53 levels were quantified using the ImageQuant TL software (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

2.3. Protein levels and activity

Relative phosphorylation intensity of different kinases involved in MAPK and PI3K/AKT mediated pathways were evaluated using the Human Phospho-MAPK Array Kit (R&D Systems, MN, USA). Protein levels were quantified using the ImageQuant TL software (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Phospho ERK1 and ERK2 levels were also assessed using the ERK1/2 (pT202/Y204) PhosphoTracer ELISA kit (abcam, MA, USA). DNA binding activity of NF-κB p50/p65 subunits and ATF-2 were evaluated using the NF-κB p50/p65 Transcription Factor Assay kit and ATF2 (pT69/pT71) Transcription Factor Assay kit (abcam, MA, USA), respectively, as suggested by the manufacturer. Each experiment was carried out at least three times independently in cells grown in the absence of EGF.

Fig. 1. Characterization of PHKs transduced with E6/E7 of different HPV-16 variants. (a) Total protein extracts of parental and immortalized PHKs were submitted to SDS-PAGE followed by immunoblotting using antibodies against E6 and p16. One representative experiment of two independent assays is shown. (b) Relative levels of p53 protein detected by western blot in early-passage PHKs ($p < 15$) transduced with HPV-16 E6/E7 from different variants in comparison to parental cells arbitrarily defined as the reference and set value 1. Values were normalized to actin expression levels and averages $\pm$ SDs of two independent experiments are shown. (c) Morphology of parental and HPV-16 E6/E7 transduced PHKs at passage > 100. Magnification, $\times 10$. Two-column fitting image.

2.4. Wound healing assay

Parental or HPV-16 immortalized PHKs were seeded into 12 well plates until 90% confluence when a wound was introduced with a p200 pipette tip. Cell proliferation was inhibited by adding of 10 μ M mitomycin C (Sigma-Aldrich, MI, USA) six hours before injury was done and throughout migration. Images of the wounded monolayer were captured over a time course using a Zeiss Primovert microscope (Zeiss, Jena, Germany) equipped with AxioVision SE64 Rel 4.9 (Zeiss, Jena, Germany). Wound coverage surface areas were computed using the Zeiss LSM Image Browser Version 3, 2, 0, 115 software. Four independent experiments were performed in triplicate.

2.5. Soft agar assay

Briefly, 7000 cells were mixed with 0.3% semisolid LMP (low melting point) agarose in KSFM and seeded in 24 well plates on top of a 1% LMP agarose bed. After 20 days, colonies were stained using 1 mg/mL MTT (Sigma, MI, USA) and observed macroscopically to visualize number and size of the colonies formed. Experiments were conducted three times in sextuplicates.

2.6. Transwell invasion assay

Invasiveness potential was measured using the QCM High sensitivity non-cross-linked collagen invasion assay (Millipore, Darmstadt, Germany) as suggested by the manufacturer. Briefly,

250,000 parental or immortalized PHKs maintained for two hours in EGF-free KSFM were seeded in the upper chamber of a transwell permeable support membrane insert pre-wetted with EGF-free KSFM. The bottom chamber was supplied with EGF-free KSFM + 10% FBS (fetal bovine serum), and plates were incubated for 24 h at 37 $^{\circ}$ C. Cells were stained using the solution provided, and invasion was initially accessed microscopically. Next, the staining solution was removed and followed by absorbance readings at 560nm. A total of three independent experiments were performed in triplicates.

3. Statistical analysis

Mean values $\pm$ standard deviation (SD) are shown. Whenever appropriate, data was analyzed by unpaired two-tailed Student's *t*-test using Microsoft Excel. Differences were considered statistically significant if $p < 0.05$.

4. Results

4.1. AA immortalized keratinocytes retain higher ability of activating MAPK and PI3K/AKT cascades

PHKs have finite life span and undergo senescence after few passages in culture. HPV-16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to immortalize these cells (Hawley-Nelson et al., 1989), and it has

been demonstrated in different biological systems that these proteins from the AA variant immortalize PHKs more effectively than the E-P (Richard et al., 2010; Sichero et al., 2012). We previously developed a model to access biological properties of E6/E7 from different HPV-16 variants in which a heterologous retroviral promoter was used to drive oncoprotein expression not only because the retroviral LTR is a much stronger promoter than the viral LCR, but also to facilitate the normalization of protein levels among the different infected PHKs once the LCR activity of the different HPV-16 variants have been shown to differ (Sichero and Villa, 2006). Briefly, colonies from HPV-16 E6/E7 transduced PHKs were isolated and continuously passaged until senescence or passage 30 (at this time point considered immortalized, Halbert et al., 1991). At p5 or p30 an identical number of cells from five different colonies were mixed (Sichero et al., 2012). All experiments described in this manuscript derive from these p30 cell pools grown to p100–p110.

High-risk HPVs E7 protein represses pRb causing overexpression of the p16 cyclin-dependent kinase inhibitor in cervical cancer (Klaes et al., 2002). As anticipated, in comparison to parental PHKs, western blot revealed higher levels of p16 in all HPV-16 transduced cultures (Fig. 1A). Expression of the E6 viral protein was retained in all transduced cultures at $p > 100$ and associated reduced levels of p53 were observed for all variants (Fig. 1B). All HPV-16 immortalized keratinocytes exhibited morphology compatible with keratinocytes (Fig. 1C). These cells displayed intense growth and consisted of homogeneous populations of small proliferating cells. In contrast, parental PHKs grew slower and were larger cells that particularly at passages close to senescence exhibited extended cytoplasmatic processes.

Although some differences in biochemical and biological activities of E6/E7 from E-P and AA variants have been described (Lichtig et al., 2006; Sichero et al., 2012; Zehbe et al., 2009), the

mechanisms behind differences described are unknown. Abnormal activation of MAPK and PI3K/AKT cascades play a critical role in the development and progression of cancer, and for this reason we evaluated phosphorylation levels of several components of these pathways in keratinocytes immortalized by different HPV-16 variants. Upon EGF deprivation, in the MAPK-ERK module, the highest levels of phosphorylated MEK1 were detected in AA PHKs by western blot, whereas similar levels were observed between E-P and E-350G transduced cells, but hardly detected in parental keratinocytes (Fig. 2A; Supplementary Fig. 1). Instead, total MEK1 and MEK2 levels, and active MEK2 were evenly detected across cultures. Augmented levels of phosphorylated MEK1 in AA PHKs significantly impacted upon ERK2 (extracellular signal regulated kinase) activation measured not only by an array of phospho-specific antibodies (Fig. 2B), but also using a modified immune-sandwich ELISA assay (Fig. 2C). Among the downstream effectors of ERK1/2, increase in phosphorylated MSK2 (mitogen- and stress-activated kinase) was detected in AA PHKs compared to the other variants; activated RSK1 (ribosomal protein S6 kinase) was also higher in this population, however in comparison to E-350G cells the difference was only marginally significant ($p=0.070$).

Stimulation of MAPK-ERK intracellular signaling by growth factors and mitogens generally induce cell proliferation. Although stress-activated MAPK-JNK (Jun amino-terminal kinases) and MAPK-p38 pathways outcome is commonly proapoptotic, dependent on the cellular context, activation of these cascades may induce carcinogenesis (Dhillon et al., 2007). No significant differences were observed in the activation of MAPK-JNK effectors among PHKs immortalized by the different variants of HPV-16 (data not shown). Specific differences were also observed within the MAPK-p38 module (Fig. 3A): AA PHKs exhibited the highest levels of phosphorylated MKK6, and MKK3 was somewhat elevated for this variant. Although both proteins activates

Fig. 2. Expression profile of proteins involved in the MAPK-ERK signaling cascade. (a) Total protein extracts from parental and immortalized PHKs were submitted to SDS-PAGE followed by immunoblotting using antibodies against total or phosphorylated MEK1 and MEK2. One representative experiment of three independent assays is shown. (b) Relative expression levels of phosphorylated ERK1 and ERK2 in immortalized PHK in comparison to parental cells accessed by the Human Phospho-MAPK Array kit (R&D Systems, Minneapolis, USA). Averages $\pm$ SDs of four independent experiments are shown. (c) Relative expression levels of phosphorylated ERK1/2 in immortalized PHKs in comparison to parental cells evaluated using the ERK 1/2 Total PhosphoTracer ELISA kit (abcam, Massachusetts, USA). Averages $\pm$ SDs of two independent experiments in triplicates are shown. (d) Relative expression levels of phosphorylated RSK1, RSK2 and MSK2 in immortalized PHKs in comparison to parental cells accessed by Human Phospho-MAPK Array kit (R&D Systems, Minneapolis, USA). Data shown are averages $\pm$ SDs of four independent experiments. Unpaired two-tailed Student's t-test was used for statistical analysis and significant differences ($p < 0.05$) are indicated by asterisks. Two-column fitting image.

Fig. 3. Expression profile of proteins involved in the MAPK-p38 and PI3K/AKT cascades. Total protein extracts of parental and immortalized PHKs grown in EGF-free medium for two hours were obtained. Relative phosphorylated levels of proteins involved in the (a) PI3K/AKT and (b) MAPK-p38 pathways in immortalized PHKs in comparison to parental cells accessed by the Human Phospho-MAPK Array kit (R&D Systems, Minneapolis, USA). Averages $\pm$ SDs of four independent experiments are shown. Unpaired two-tailed Student's *t*-test was used for statistical analysis and significant differences ($p < 0.05$) are indicated by asterisks. 1.5-column fitting image.

all p38 isoforms in this pathway, in AA transduced cells only the p38 γ isoform activation was stimulated.

Cell survival, proliferation and migration are additionally regulated by the PI3K/AKT pathway, and abnormal signaling through this cascade is involved in carcinogenesis (Aksamitiene et al., 2012). In our experiments, AKT2 phosphorylation was significantly increased in AA cultures, although no differences were observed between E-P and E-350G PHKs. This enhancement correlated to significant higher GSK-3b (glycogen synthase kinase) activation, and to fairly upper levels of p70S6 kinase phosphorylation (Fig. 3B).

We next thought to evaluate the status of selected transcription factors commonly regulated by one or more of the MAPK effectors found to be differentially activated among variants. Mutated and/or superexpressed c-MYC is frequently observed in human cancers enabling cell cycle progression and cellular transformation (Miller et al., 2012). Although this protein is an important target of active ERK-1/2, western blot assays revealed similar levels of c-MYC in all HPV-16 cultures however higher than in parental PHKs (Fig. 4A). A modified EMSA (electrophoretic mobility shift assay) also revealed no significant differences among immortalized cultures concerning DNA binding activity of NF- κ B p50 and p65 subunits and ATF-2 (Fig. 4B and C). Additionally, up-regulation of MAPK-ERK and MAPK-p38 pathways did not impact upon phosphorylation levels of CREB (cAMP response element-binding protein) (Fig. 4D) and HSP-27 (heat shock protein 27) (data not shown). A significant increased active CREB was detected on protein extracts of E-P PHKs only.

Fig. 4. Protein profile of different cellular transcription factors downstream MAPK and PI3K/AKT pathways. (a) Total protein extracts of parental and immortalized PHKs were submitted to SDS-PAGE followed by immunoblotting using antibody against c-MYC. Data shown is representative of three independent experiments. (b) DNA binding activity of NF- κ B p65 and p50 subunits, and (c) ATF-2 evaluated in parental and immortalized PHKs using the NF- κ B p50/p65 Transcription Factor Assay kit (abcam, Massachusetts, USA) and the ATF-2 (pT69/pT71) Transcription Factor Assay kit (abcam, Massachusetts, USA), respectively. Numbers are averages $\pm$ SDs of three independent experiments in triplicates. (d) Relative phosphorylation of CREB was evaluated using the Human Phospho-MAPK Array kit (R&D Systems, Minneapolis, USA). Numbers are averages $\pm$ SDs of four independent experiments. Unpaired two-tailed Student's *t*-test was used for statistical analysis and significant differences ($p < 0.05$) are indicated by asterisks. Two-column fitting image.

4.2. HPV-16 variants differ in their ability to induce cellular processes important to carcinogenesis

To spread within the tissue and to different tissues, tumor cells use migration processes very similar to those employed by normal non-neoplastic cells during embryonic morphogenesis, wound healing and immune-cell trafficking (Friedl and Wolf, 2003). We assessed the ability of HPV-16 immortalized PHKs to migrate by means of wound healing assays. To assure the ability of immortalized PHKs to promote wound closure was independent of cell

proliferation, we inhibited proliferation using mitomycin C. Wound area was measured after scratching monolayer cultures, and coverage area was estimated six hours thereafter. AA PHKs exhibited significantly increased migration ability, however percentage of the wound area closed after six hours was similar between the E-P and E-350G variants (Fig. 5A and B).

Another important hallmark of transformed cells consists of the ability to grow independent of substrate adhesion. Anchorage-independent condition can be recreated in vitro through the use of semi-solid medium. Previous analysis of our immortalized cultures

Fig. 5. Biological differences among PHKs transduced with E6/E7 of different HPV-16 variants. (a) and (b) Wound healing assays were used to evaluate migration capacity. Parental or immortalized PHKs were seeded into 12 well plates until 90% confluence prior to wounding. Coverage surface areas six hours after scratching are shown. Four independent experiments were performed in triplicate. Magnification 10x. (c) Transformation ability of immortalized cells was accessed by colony formation assay in semi-solid agar. For all cultures, 7000 cells were seeded in sextuplicates and grown in semisolid medium for 20 days when colonies were stained with MTT and evaluated macroscopically. One representative experiment of three is shown. (d) Invasiveness potential of parental and immortalized populations was estimated using the QCM High sensitivity non-cross-linked collagen invasion assay (Millipore, Darmstadt, Germany). One million cells were seeded in chambers in EGF-free KSFM, and invasion stimulated by 10% FBS was measured after 24 h. Three independent experiments were performed in triplicates. Whenever necessary unpaired two-tailed Student's *t*-test was used for statistical analysis and significant differences ($p < 0.05$) are indicated by asterisks. (e) Total protein extracts of parental and immortalized PHKs were submitted to SDS-PAGE followed by immunoblotting using antibodies against E-cadherin and vimentin. One representative experiment of three independent assays is shown. Two-column fitting image.

Fig. 6. Inhibition of the MAPK-ERK pathway impacts upon cell migration. (a) Parental and HPV-16 immortalized PHKs were grown with and without 15 μ M U0126. Relative inhibition of phosphorylated ERK1 and ERK2 expression in immortalized PHKs grown in the presence of U0126 is shown. Protein levels were accessed using the Human Phospho-MAPK Array kit (R&D Systems, Minneapolis, USA) in a single experiment. (b) Wound healing assay was used to evaluate the migration capacity of cells in the presence and absence of the MEK1 inhibitor U0126. Cells were seeded into 12 well plate until 90–100% confluence prior to injury. Coverage surface areas six hours after wounding are shown. Four independent experiments were performed in triplicate. Unpaired two-tailed Student's *t*-test was used for statistical analysis and significant differences ($p < 0.05$) are indicated by asterisks. Two-column fitting image.

at p30 showed that while parental PHKs were unable to grow in semi-solid medium, all HPV-16 E6/E7 variants transducing cells were capable of forming colonies, still the E-P was less effective than AA and E-350G variants (Sichero et al., 2012). We sought to re-evaluate colony formation at higher passage cultures ($p > 100$). Therefore, 7000 cells were seeded and grown for 20 days when cells were stained and evaluated macroscopically. Interestingly, AA PHKs consistently formed bigger colonies as compared to those arising from E-P and E-350G immortalized cells (Fig. 5C). These data extends those of Nicolli et al. (2012) reporting that PHKs transduced with HPV-16 E6 E-P and AA variants shaped distinct colony formation units using a modified clonogenic assay.

Metastasis, another stage of the multistep carcinogenic process, occur when growing tumor cells invade to adjacent tissues and thereafter move on to distant anatomical sites where they establish, replicate and form new colonies that eventually will progress to palpable solid tumors. We estimated invasion potential of parental and HPV-16 populations using a very sensitive method that employs non-cross-linked collagen and thus provide a more flexible environment allowing higher levels of cell invasion to occur. Briefly, 250,000 cells of each culture were measured for their ability to invade this matrix using 10% FBS as chemoattractant for 24 h. Our results show that AA transducing populations were more prone to invade (Fig. 5D).

The epithelial to mesenchymal transition (EMT) is known to induce cells to an invasive and migratory phenotype (Kalluri, 2009). While epithelial cells are firmly tied to one another and the underlying extracellular matrix (ECM), mesenchymal cells are loosely packed and more susceptible to migrate. EMT involves ECM degradation and suspension of diverse cell adhesion junctions including E-cadherin, thus allowing cells to release themselves from each other and prepare for invasion and metastasis (Hanahan and Weinberg, 2011). Therefore, we tested the hypothesis that increased migration of AA PHKs could be ascribed to EMT. Western blot was used to analyze protein levels of E-cadherin, (marker of epithelial cell phenotype), and vimentin that is a type III intermediate filament protein highly expressed in mesenchymal cells. Whereas the levels of E-cadherin were similarly low among E-P and AA PHKs in comparison to E-350G cells, higher levels of vimentin were detected in AA cells (Fig. 5E). High levels of vimentin in parental PHKs most probably reflects stem cell properties of these cells.

Anomalous GSK-3 β activity has also been implicated in cancer; phosphorylation of GSK-3 β by diverse kinases, including AKT, MAPK lead to its inactivation (McCubrey et al., 2014). Upon GSK-3 β inactivation, and enhancement of canonical Wnt/ β -catenin signaling, β -catenin is stabilized and translocates to the nucleus where it plays an important role in regulating gene expression to promote EMT and cell migration (McCubrey et al., 2007). Actually, nuclear β -catenin accumulation associated with over-activation of

Wnt signaling has been observed in cervical cancer (Rath et al., 2015). Using western blot, we measured β -catenin protein levels in nuclear and total protein extracts from all three PHKs transduced with the different HPV-16 variants and observed that these cells presented similar and very low levels of nuclear β -catenin, confirmed using immunofluorescence (data not shown).

Finally, we asked whether higher activation of ERK-1/2 is related to the increased abilities in processes relevant to carcinogenesis observed in AA PHKs. Once we observed increased cell death when cells were grown for 24 h in the presence of the MEK-1 inhibitor U0126, we only performed migration experiments in which wound coverage was measured six hours following injury. As expected after growing cultures for 30 min in U0126 containing medium, we clearly observed downregulation of active ERK1 and ERK2, indicating suppression of the MAPK-ERK cascade (Fig. 6A). Because MEK1 inhibition caused decreased migration capacity of all HPV-16 infected cells (Fig. 6B), one may envision that the higher ability of the AA variant in activating the MAPK-ERK cellular pathway may be a strategy to provide, at least in part, an intracellular environment more advantageous for carcinogenesis. However, we may not discard the influence of other factors in migration, since even in the presence of the MEK1 inhibitor, the AA variant attained the highest migration capacity.

5. Discussion

We previously reported that whether detected cross-sectionally (OR=224.21, 95% CI 98.3–511.7) or after 4 months follow-up (OR=278.16, 95% CI 78.9–980.3), risk for HSIL development was higher in women infected with non-E than E variants of HPV-16 (Sichero et al., 2007). To clarify these findings, we have been investigating functional characteristics of PHKs immortalized by three E6/E7 variants highly represented in our population: E-P, E-350G and AA. The current study is unique in addressing intracellular signaling activation using an in vitro model that resembles persistent infection with the purpose of clarifying mechanisms behind differences in the biological behavior of HPV-16 variants previously observed by us (Sichero et al., 2012). Because E7 nucleotide alterations among these variants are all synonymous, differences observed may be attributed exclusively to the E6 heterogeneity.

Exploiting different methodological approaches, here we report that whereas all HPV-16 variants analyzed activate different signaling cascades mediated by MAPK and PI3K/AKT, the AA variant exhibited the highest ability in triggering all signaling modules: MAPK-ERK (Fig. 2), MAPK-p38 (Fig. 3A), and PI3K/AKT (Fig. 3B). Our results corroborate previous data reporting that under nutrient deprivation, E-P HPV-16 E6 protein increases the internalization of activated receptor species activating downstream signaling

cascades including AKT, mTORC1 and MAPK in a biological model very similar to ours (Spangle and Munger, 2013). However, our study further highlights that the AA variant overtakes the others in hyperactivating these circuitries.

In contrast to our findings, the E-350G variant was shown to better enhance signaling through the MAPK pathway as compared to the E-P throughout a Rap1-dependent mechanism (Chakrabarti et al., 2004). Interestingly, we also previously observed increased levels of MEK1 mRNA in our E-350G PHKs at p30, of which, however, did not translate to augmented active protein in these cells (Fig. 2B). Nevertheless, comparisons between studies are hindered by the different biological models used: whereas we focus on E6/E7 induced PHK immortalization, Chakrabarti et al. (2004) investigated the contribution of E6 induced MAPK signaling to the progression of immortalized human epithelial cells to complete transformation. Because MAPK and PI3K/AKT pathways are involved directly in biological process of cell proliferation and transformation, we evaluated the ability of the different variants in transforming PHKs by means of growing cells in semi-solid medium and observed that colonies formed by the AA cells were constantly bigger than those of other variants. We were unable to establish a link between higher intracellular signaling and increased transformation ability because all cells presented features of cell death following 24 h of growth in medium containing the U0126 MEK1 inhibitor.

It has been shown that HPV-16 E6 mediated RPTK (receptor protein tyrosine kinase)-MAPK activation increases cellular migration even upon nutrient deprivation (Spangle and Munger, 2013). Improved migration of AA E6 transduced PHKs over E-P E6 has also been described (Niccoli et al., 2012). Our data further suggest that HPV-16 may enhance migration, at least in part in keratinocytes via MAPK-ERK signaling: AA variant attained the highest migration potential (Fig. 5A and B) that was reduced by inhibition of MEK1 (Fig. 6B). Even more, E-P and E-350G variants similarly activated MAPK (Figs. 2 and 3A) and AKT (Fig. 3B) intracellular signaling, and presented comparable migration abilities (Fig. 5). Taken together, one may hypothesize that the E6 L83V aminoacid alteration per se is not sufficient to confer an increased oncogenic potential, for which an epidemiological association with risk for cancer progression is still a matter of debate (Londesborough et al., 1996; Sichero and Villa, 2006; Zehbe et al., 1998). Association of divergent activation of PI3K/AKT cascade and migration was also observed between two HPV-18 variants (Contreras-Paredes et al., 2009; Fragos-Ontiveros et al., 2012). End-point effectors of MAPK and PI3K/AKT signaling enclose diverse transcription factors capable of regulating multiple genes important for cell cycle relief and proliferation (Yoon and Seger, 2006). Unfortunately, we were unable to clarify which molecular target mediates these activities (Fig. 4), and further experiments are warranted to accurately depict the differences observed.

EGF and other growth factors induce GSK-3 β phosphorylation by activating the MEK/ERK/RSK1 and PI3K/AKT signaling pathway hindering GSK-3 β inactive (Sutherland et al., 1998). This protein consists of a proline-directed serine-threonine-kinase involved in cellular metabolism, neuronal cell development, and body pattern formation (Cohen and Frame, 2001). Inactivation of GSK-3 β provokes dephosphorylation of downstream substrates including proteins important for RNA translation, inducing translation, and glycogen synthesis. Changes in carbohydrate metabolism are a hallmark of malignant transformation, one of the earliest discernible events in tumorigenesis (Zwerschke et al., 1999). PI3K/AKT inhibition in HPV transduced cells was shown to result in reduced cap dependent translation (Spangle and Munger, 2013). Our experiments revealed significantly augmented levels of phosphorylated GSK-3 β in AA PHKs (Fig. 3B) and correlates with data of Richard et al. (2010) describing differential in the

expression levels of several modulatory metabolic enzymes between the E-P and AA variants.

GSK-3 β is additionally critical in regulating the turnover of β -catenin in dependence of the disponibility of Wnt ligands (McCubrey et al., 2007). Up regulation of β -catenin has been observed in a variety of neoplasias including colorectal, breast, and ovarian cancers (Morin, 1999). Different pools of β -catenin likely exist in diverse subcellular localizations: while this protein is associated with cadherins at cell junctions, free β -catenin at the nucleus regulates the expression of target genes such as cyclin D1 and other regulators of cell survival and motility (McCubrey et al., 2007). The HBV (hepatitis B virus) HBx protein was shown to activate the MEK/ERK cascade priming GSK-3 β for inactivation, β -catenin stabilization, EMT and cell migration (Ding et al., 2005). In this study we observed low and similar β -catenin nuclear accumulation across all three HPV-16 transduced PHKs (data not shown). AKT has also been shown to induce EMT (Larue and Bellocosa, 2005). Higher expression of the mesenchymal marker vimentin was observed in AA PHKs (Fig. 5E) suggestive of partial EMT activation in these cells, and which further seems to contribute to confer to AA PHKs enhanced migration and invasion abilities (Fig. 5). In fact, it has been described that cancer cells may enter in EMT program only partially acquiring new mesenchymal behaviors while continuing to express epithelial traits (Hanahan and Weinberg, 2011). Whereas we observed similar E-cadherin among variants, Niccoli and col. (2012) observed reduced levels of this epithelial marker in AA PHKs compared to E-P cells. However, these authors transduced PHKs solely with the E6 protein, suggesting E7 may have a role in regulating EMT in HPV infected cells. Together our results suggest that cells expressing E6/E7 from the AA variant have selective advantage upon other HPV-16 isolates in promoting transformation, migration and invasion and may explain the higher prevalence of this variant in cervical disease.

6. Conclusions

Collectively, our results form the basis for a mechanism of how the AA variant gains advantages upon other HPV-16 isolates to elicit carcinogenesis and may explain the high prevalence of this variant in cervical disease. We demonstrate for the first time that AA E6/E7 expression increases activation of several effectors of MAPK and PI3K/AKT pathways to tightly modulate infected cells across carcinogenesis steps such as growth independent of anchorage, migration and invasion. We postulate that hyperactivation of MEK1, ERK2, AKT2 and possibly other proteins influence cellular behavior by means of GSK-3 β inactivation and EMT induction. Upregulated AKT2 was shown to associate with high grade tumors and is characteristic of squamous cell carcinomas associated with malignancy (Altomare and Testa, 2005; O'Shaughnessy et al., 2007). As follows, further comprehension of the molecular mechanisms by which HPV-16 variants modulate these cascades will improve disease prevention and treatment strategies for HPV positive cancers.

Funding

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) [12/16283-9 to L.S., 13/01538-4 to J.H. and 08/57889-1 to L.L.V.], Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [573799/2008-3 to L.L.V.]. Additional support was provided by the São Paulo branch of the Ludwig Institute for Cancer Research.

Authors' contributions

Conceived and designed the experiments: JH, JSS and LS. Performed the experiments: JH and JSS. Analyzed the data: JH, JSS, LLV, and LS. Contributed reagents/materials/analysis tools: LLV and LS. Wrote the paper: JH, LLV, LS. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

LLV is consultant of Merck Sharp & Dohme Corp. for HPV vaccines. None of the other authors have conflicts of interest to report.

Acknowledgments

We are grateful to Johannes Schweizer from Arbor Vita Corporation, CA, USA for providing the anti-HPV-16 E6 antibody, and to Andréia H. Otake, Renata Saito and Luciana Pescatore for assistance with migration assays.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2016.02.015>.

References

- Aksamitiene, E., Kiyatkin, A., Kholodenko, B.N., 2012. Cross-talk between mitogenicRas/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance. *Biochem. Soc. Trans.* 40, 139–146.
- Altomare, D.A., Testa, J.R., 2005. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene* 24, 7455–7464.
- Berumen, J., Ordoñez, R., Lazcano, E., Salmeron, J., Galvan, S.C., Estrada, R.A., Yunes, E., García-Carranca, A., Gonzalez-Lira, G., Madrigal-de la Campa, A., 2001. Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk of cervical cancer: a case-control study. *J. Natl. Cancer Inst.* 93, 1325–1330.
- Chakrabarti, O., Veeraraghavalu, K., Tergaonkar, V., Liu, Y., Androphy, E.J., Stanley, M. A., Krishna, S., 2004. Human papillomavirus type 16 E6 amino acid 83 variants enhance E6-mediated MAPK signaling and differentially regulate tumorigenesis by notch signaling and oncogenic ras. *J. Virol.* 78, 5934–5945.
- Cohen, P., Frame, S., 2001. The renaissance of GSK3. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 769–776.
- Contreras-Paredes, A., De la Cruz-Hernandez, E., Martínez-Ramírez, I., Duenas-Gonzalez, A., Lizano, M., 2009. E6 variants of human papillomavirus 18 differentially modulate the protein kinase B/phosphatidylinositol 3-kinase (akt/PI3K) signaling pathway. *Virology* 383, 78–85.
- Dhillon, A.S., Hagan, S., Rath, O., Kolch, W., 2007. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 26, 3279–3290.
- Ding, Q., Xia, W., Liu, J.C., Yang, J.Y., Lee, D.F., Xia, J., Bartholomeusz, G., Li, Y., Pan, Y., Li, Z., Bargou, R.C., Qin, J., Lai, C.C., Tsai, F.J., Tsai, C.H., Hung, M.C., 2005. Erk associates with and primes GSK-3beta for its inactivation resulting in upregulation of beta-catenin. *Mol. Cell* 19, 159–170.
- Fragoso-Ontiveros, V., María Alvarez-García, R., Contreras-Paredes, A., Vaca-Paniagua, F., Alonso Herrera, L., López-Camarillo, C., Jacobo-Herrera, N., Lizano-Soberón, M., Pérez-Plasencia, C., 2012. Gene expression profiles induced by E6 from non-European HPV18 variants reveals a differential activation on cellular processes driving to carcinogenesis. *Virology* 432, 81–90.
- Freitas, L.B., Chen, Z., Mugi, E.F., Boldrini, N.A., Miranda, A.E., Spano, L.C., Burk, R.D., 2014. Human papillomavirus 16 non-European variants are preferentially associated with high-grade cervical lesions. *PLoS One* 9, e100746.
- Fresno Vara, J.A., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., González-Barón, M., 2004. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat. Rev.* 30, 193–204.
- Friedl, P., Wolf, K., 2003. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat. Rev. Cancer* 3, 362–374.
- Halbert, C.L., Demers, G.W., Galloway, D.A., 1991. The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. *J. Virol.* 65, 473–478.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.
- Hawley-Nelson, P., Vousden, K.H., Hubbert, N.L., Lowy, D.R., Schiller, J.T., 1989. HPV 16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J.* 8, 3905–3910.
- Hildesheim, A., Schiffman, M., Bromley, C., Wacholder, S., Herrero, R., Rodriguez, A., Bratti, M.C., Sherman, M.E., Scarpidi, U., Lin, Q.Q., Terai, M., Bromley, R.L., Buetow, K., Apple, R.J., Burk, R.D., 2001. Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 93, 315–318.
- Ho, L., Chan, S.Y., Burk, R.D., Das, B.C., Fujinaga, K., Icenogle, J.P., Kahn, T., Kiviat, N., Lancaster, W., Mavromara-Nazos, P., 1993. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *J. Virol.* 67, 6413–6423.
- Group IARC Working, 2007. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risk Chem. Man, 90.
- Junes-Gill, K., Sichero, L., Maciag, P.C., Mello, W., Noronha, V., Villa, L.L., 2008. Human papillomavirus type 16 variants in cervical cancer from an admixed population in Brazil. *J. Med. Virol.* 80, 1639–1645.
- Kalluri, R., 2009. EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. *J. Clin. Invest.* 119, 1417–1419.
- Klaes, R., Benner, A., Friedrich, T., Ridder, R., Herrington, S., Jenkins, D., et al., 2002. p16INK4a immunohistochemistry improves interobserver agreement in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *Am. J. Surg. Pathol.* 26, 1389–1399.
- Larue, L., Bellacosa, A., 2005. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene* 24, 7443–7454.
- Licht, H., Algrisi, M., Botzer, L.E., Abadi, T., Verbitzky, Y., Jackman, A., et al., 2006. HPV16 E6 natural variants exhibit different activities in functional assays relevant to the carcinogenic potential of E6. *Virol* 350, 216–227.
- Londesborough, P., Ho, L., Terry, G., Cuzick, J., Wheeler, C., Singer, A., 1996. Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities. *Int. J. Cancer* 693, 64–68.
- McCubrey, J.A., Steelman, L.S., Bertrand, F.E., Davis, N.M., Sokolosky, M., Abrams, S.L., 2014. GSK-3 as potential target for therapeutic intervention in cancer. *Oncotarget* 5, 2881–2911.
- McCubrey, J.A., Steelman, L.S., Chappell, W.H., Abrams, S.L., Wong, E.W., Chang, F., Lehmann, B., Terrian, D.M., Milella, M., Tafuri, A., Stivala, F., Libra, M., Basecke, J., Evangelisti, C., Martelli, A.M., Franklin, R.A., 2007. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim. Biophys. Acta* 1773, 1263–1284.
- Miller, D.M., Thomas, S.D., Islam, A., Muench, D., Sedoris, K., 2012. c-Myc and cancer metabolism. *Clin. Cancer Res.* 18, 5546–5553.
- Morin, P.J., 1999. beta-catenin signaling and cancer. *BioEssays* 21, 1021–1030.
- Münger, K., Phelps, W.C., Bubb, V., Howley, P.M., Schlegel, R., 1989. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J. Virol.* 63, 4417–4421.
- Niccoli, S., Abraham, S., Richard, C., Zehbe, I., 2012. The Asian-American E6 variant protein of human papillomavirus 16 alone is sufficient to promote immortalization, transformation, and migration of primary human foreskin keratinocytes. *J. Virol.* 86, 12384–12396.
- Ortiz-Ortiz, J., Alarcón-Romero, L., del, C., Jiménez-López, M.A., Garzón-Barrientos, V.H., Calleja-Macías, I., Barrera-Saldaña, H.A., Leyva-Vázquez, M.A., Illades-Aguar, B., 2015. Association of human papillomavirus 16 E6 variants with cervical carcinoma and precursor lesions in women from Southern Mexico. *Virol. J.* . <http://dx.doi.org/10.1186/s12985-015-0242-3>
- O'Shaughnessy, R.F., Akgül, B., Storey, A., Pfister, H., Harwood, C.A., Byrne, C., 2007. Cutaneous human papillomaviruses down-regulate AKT1, whereas AKT2 up-regulation and activation associates with tumors. *Cancer Res.* 67, 8207–8215.
- Pérez-Plasencia, C., Vázquez-Ortiz, G., López-Romero, R., Piña-Sánchez, P., Moreno, J., Salcedo, M., 2007. Genome wide expression analysis in HPV16 cervical cancer: identification of altered metabolic pathways. *Infect. Agent Cancer* 2, 16.
- Rath, G., Jwanjal, P., Salhan, S., Nalliah, M., Dhawan, I., 2015. Clinical significance of inactivated glycogen synthase kinase 3β in HPV-associated cervical cancer: Relationship with Wnt/β-catenin pathway activation. *Am. J. Reprod. Immunol.* 73, 460–478.
- Richard, C., Lanner, C., Naryzhny, S.N., Sherman, L., Lee, H., Lambert, P.F., Zehbe, I., 2010. The immortalizing and transforming ability of two common human papillomavirus 16 E6 variants with different prevalences in cervical cancer. *Oncogene* 29, 3435–3445.
- Scheffner, M., Huijbregtse, J.M., Vierstra, R.D., Howley, P.M., 1993. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin- protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75, 495–505.
- Sichero, L., Ferreira, S., Trottier, H., Duarte-Franco, E., Ferenczy, A., Franco, E.L., Villa, L.L., 2007. High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18. *Int. J. Cancer* 120, 1763–1768.
- Sichero, L., Sobrinho, J.S., Villa, L.L., 2012. Oncogenic potential diverge among human papillomavirus type 16 natural variants. *Virology* 432, 127–132.
- Sichero, L., Villa, L.L., 2006. Epidemiological and functional implications of molecular variants of human papillomavirus. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39, 707–717.
- Spangle, J.M., Munger, K., 2013. The HPV16 E6 oncoprotein causes prolonged receptor protein tyrosine kinase signaling and enhances internalization of phosphorylated receptor species. *PLoS Pathog.* 9, e1003237.
- Stanley, M., 2010. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecol. Oncol.* 117 (Suppl 2) S5–10.

- Sutherland, C., Leighton, I.A., Cohen, P., 1998. Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochem. J.* 296, 15–19.
- Xi, L.F., Koutsky, L.A., Hildesheim, A., Galloway, D.A., Wheeler, C.M., Winer, R.L., Ho, J., Kiviat, N.B., 2007. Risk for high-grade cervical intraepithelial neoplasia associated with variants of human papillomavirus types 16 and 18. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 16, 4–10.
- Yamada, T., Wheeler, C.M., Halpern, A.L., Stewart, A.C.M., Hildesheim, A., Jenison, S. A., 1995. Human papillomavirus type 16 lineages in the United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2 and L1 coding segments. *J. Virol.* 69, 7743–7753.
- Yoon, S., Seger, R., 2006. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 24, 21–44.
- Zehbe, I., Lichtig, H., Westerback, A., Lambert, P.F., Tommasino, M., Sherman, L., 2011. Rare human papillomavirus 16 E6 variants reveal significant oncogenic potential. *Mol Cancer* . <http://dx.doi.org/10.1186/1476-4598-10-77>.
- Zehbe, I., Richard, C., DeCarlo, C.A., Shai, A., Lambert, P.F., Lichtig, H., Tommasino, M., Sherman, L., 2009. Human papillomavirus 16 E6 variants differ in their dysregulation of human keratinocyte differentiation and apoptosis. *Virology* 383, 69–77.
- Zehbe, I., Wilander, E., Delius, H., Tommasino, M., 1998. Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res.* 58, 829–833.
- Zuna, R.E., Tuller, E., Wentzensen, N., Mathews, C., Allen, R.A., Shanesmith, R., Dunn, S.T., Gold, M.A., Wang, S.S., Walker, J., Schiffman, M., 2011. HPV-16 variant lineage, clinical stage, and survival in woman with invasive cervical cancer. *Infect. Agent Cancer* . <http://dx.doi.org/10.1186/1750-9378-6-19>.
- Zwerschke, W., Mazurek, S., Massimi, P., Banks, L., Eigenbrodt, E., Jansen-Dürr, P., 1999. Modulation of type M2 pyruvate kinase activity by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 1291–1296.