ÉRICA AKEMI KAVATI

**INTERAÇÃO DE ONCOPROTEÍNAS VIRAIS E6 E E7 DE HPV16/18 COM
ALVOS CELULARES POTENCIAIS PARA O DESENVOLVIMENTO
DE ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto
Butantan/IPT, para obtenção do Título
de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2012

ÉRICA AKEMI KAVATI

**INTERAÇÃO DE ONCOPROTEÍNAS VIRAIS E6 E E7 DE HPV16/18 COM
ALVOS CELULARES POTENCIAIS PARA O DESENVOLVIMENTO DE
ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto
Butantan/IPT, para obtenção do Título
de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Profa. Dra. Aurora Marques
Cianciarullo

Versão original

São Paulo
2012

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

reprodução não autorizada pelo autor

Kavati, Érica Akemi.

Interação de oncoproteínas virais E6 e E7 HPV16/18 com alvos celulares potenciais para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas / Érica Akemi Kavati. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profa Dra Aurora Marques Cianciarullo.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Pesquisa sobre a interação de oncoproteínas virais de HPV com alvos celulares potenciais para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas.

Versão do título para o inglês: Interaction of E6 and E7 viral oncoproteins of HPV16/18 with potential cellular targets to the development of therapeutic strategies.

1. HPV 2. Interação celular 3. Oncoproteína 4. Vírus oncogênicos
5. Câncer 6. Saúde pública I. Cianciarullo, Profa. Dra. Aurora Marques II. Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Biotecnologia. III. Título.

ICB/SBIB0149/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Érica Akemi Kavati.

Título da Interação de oncoproteínas virais E6 e E7 HPV16/18 com
alvos celulares potenciais para o desenvolvimento de
estratégias terapêuticas.

Orientador(a): Profa Dra Aurora Marques Cianciarullo.

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

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

*Aos meus pais, Ryosuke e Akiko,
que muitas vezes abdicaram de seus sonhos
para realizar os meus!*

*Agradeço por tudo.
Pelo amor, compreensão e apoio incondicional!
...aos meus irmãos, Alexandre e Raquel,
pela amizade, apoio e carinho!*

*...ao meu melhor amigo e companheiro, Alexandre Sasaki,
pelo amor, apoio e dedicação
em todos os passos da minha vida.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra Aurora Marques Cianciarullo, pelos ensinamentos, apoio e dedicação. Por compartilhar sua visão de ciência refinada e apaixonante. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Edécio Armbruster de Moraes pelos ensinamentos, por compartilhar suas experiências e conhecimentos, pelas sugestões e pela agradável convivência.

À Profa. Dra. Denise A. Galloway, do Fred Hutchinson Cancer Research Center, Divisão de Biologia Humana, Seattle/USA, pela gentileza em nos ceder os vetores utilizados no presente estudo, de forma a permitir a realização do mesmo.

Ao Prof. Dr. Zoilo Camargo Pires, do Laboratório de Micosorologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UNIFESP, por permitir a utilização dos equipamentos e materiais de seu laboratório.

À Profa. Dra. Itamar Romano Garcia Ruiz por permitir a utilização dos equipamentos de seu laboratório para a manipulação bacteriana e pelos ensinamentos.

Aos membros de minha banca de qualificação Profa. Dra. Flávia Saldanha Kubrusly, Prof. Dr. Armando Moraes Ventura e Profa. Dra. Eugênia Costanzi-Strauss pelas excelentes e fundamentais sugestões.

Ao Prof. Alexandre Augusto Sasaki, do Laboratório de Micosorologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UNIFESP, pelo companheirismo, dedicação, ensinamentos, discussão dos protocolos e auxílio na execução do presente estudo.

À Profa. Dirce Sakauchi pela amizade e auxílio na execução desse trabalho.

Ao Alexsander Seixas de Souza, técnico do microscópio confocal LSM 510 Meta Zeiss, do Laboratório de Parasitologia, Instituto Butantan, pela amizade, discussões de protocolos, ensinamentos e dedicada assistência técnica durante a execução deste trabalho.

À Simone Gonçalves Silva Jared, Laboratório de Biologia Celular, Instituto Butantan, por permitir o uso do Microscópio Eletrônico de Transmissão LEO 906E Zeiss, quando necessário, além da dedicada assistência técnica ao uso do aparelho.

À Fernanda Batista de Andrade pela amizade, companheirismo e participação essencial na fase inicial do presente estudo.

À Vera Lúcia A. Rodrigues de Farias e Dulcinéia Rosa pela amizade, auxílio nas etapas de preparação dos materiais básicos do presente trabalho e por tornar o dia-a-dia mais prazeroso e divertido.

À Bianca Marigliani pelo apoio, auxílio e confiança nas diversas etapas de realização do presente estudo, assim como pelas revisões e generosa contribuição aos trabalhos em língua inglesa. Pelo carinho, amizade e dedicação.

À Heloísa Ballarino Oliveira e Raquel Agonilha Canali pelo auxílio e empenho nos ensaios e pelos momentos de descontração.

À Emanuela Gomes Vieira pela colaboração no desenvolvimento inicial de outros projetos do laboratório e pela amizade.

À Presidente da Comissão de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/IBU, Profa. Dra. Ana Clara Guerrini Schenberg e aos demais membros.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação pelos ensinamentos e por permitir o despertar de um olhar científico crítico e maduro.

Aos funcionários da secretaria do Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/IBU, Marcos, Fábila e Eliane, pelo auxílio nas resoluções burocráticas da Pós-Graduação.

Às agências financiadoras FAPESP, CAPES, Instituto Butantan-SES-SP e Fundação Butantan, que viabilizaram o desenvolvimento desta pesquisa.

À Monica da Silva Amaral, bibliotecária, e demais funcionárias da Biblioteca do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, pelo enorme auxílio e revisão da normalização técnica do presente trabalho.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para o êxito deste trabalho e para o meu aprimoramento profissional, minha eterna gratidão!

“Discovery consists in seeing what everyone else has seen

And thinking what no one else has thought.”

(Albert Szent-Gyorgi)

RESUMO

KAVATI, E. A. **Interação de oncoproteínas virais E6 e E7 de HPV16/18 com alvos celulares potenciais para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas.** 2012. 108 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Todos os anos, cerca de 300 mil mulheres vão a óbito no mundo, vítimas de câncer cervical. A presença de DNA de HPVs pode ser detectada em 99,7% dos casos, sendo considerada a causa principal da doença. O potencial oncogênico do HPV baseia-se na capacidade de oncoproteínas virais como E6 e E7 alterarem o ciclo celular, levando à imortalização e malignidade das células. O importante papel das oncoproteínas na progressão tumoral e sua interação com inúmeros alvos celulares tem relevância em estudos para o desenvolvimento de vacinas e terapias contra os cânceres associados ao HPV. Estudos sobre a localização intracelular dessas oncoproteínas também são determinantes para a melhor compreensão sobre suas funções e atividades celulares. Este estudo investigou a localização intracelular das oncoproteínas E6 e E7 de HPV16/18 e seus possíveis alvos celulares. Então, células HeLa, SiHa e CaSki naturalmente transformadas por HPV e células HEK 293T transfectadas com os oncogenes virais *E6* e *E7* foram analisadas por imunofluorescência e imunocitoquímica ultraestrutural, para determinar a localização intracelular das oncoproteínas virais e pesquisar as possíveis interações das oncoproteínas E6 e E7 com alvos celulares. Adicionalmente, foram realizados ensaios de fracionamento celular, isolamento mitocondrial e western blotting na pesquisa dessas oncoproteínas em regiões específicas das células. Os resultados demonstraram a presença da oncoproteína E6 no núcleo e no citoplasma celular e, principalmente, a interessante presença de E6 intramitocondrial, tanto em células naturalmente transformadas por HPV, como em células transfectadas com o oncogene viral de HPV. Além disso, E7 foi detectada no interior do núcleo e dispersa no citoplasma, porém nunca ocorreu a detecção de E7 intramitocondrial. Ensaios de isolamento mitocondrial seguidos de co-imunoprecipitação e western blotting sugerem que os ligantes potenciais de E6 intramitocondrial sejam as proteínas Bax e Bak. Inúmeras proteínas virais têm sido descritas atuando sobre as mitocôndrias, devido a grande importância dessas organelas na manutenção da homeostase celular, além de sua fundamental ação na regulação de apoptose. A via de ação intramitocondrial da oncoproteína E6 ainda é desconhecida e novos estudos devem ser realizados para confirmar a atividade de E6 e sua interação com as proteínas da família Bcl-2, localizadas no interior das mitocôndrias. Portanto, o presente estudo contribui para confirmar a hipótese da presença intramitocondrial da oncoproteína viral E6 de HPV16/18 de alto risco, um dado inédito na literatura científica internacional, cuja relevância está diretamente relacionada com a aplicação clínica humana, no desenvolvimento de imunobiológicos e fármacos capazes de neutralizar a ação deste importante alvo terapêutico aqui apresentado.

Palavras-chave: Cânceres associados ao HPV. E6 e E7. Oncoproteínas virais. Alvos celulares. Terapia. Saúde pública.

ABSTRACT

KAVATI, E. A. **Interaction of E6 and E7 viral oncoproteins of HPV16/18 with potential cellular targets to the development of therapeutic strategies.** 2012. 108 p. Masters thesis (Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Every year, approximately 300,000 women die worldwide victims of cervical cancer. The presence of HPV's DNA can be detected in 99.7% of them; being considered the main disease cause. The oncogenic potential of HPV is based on the capacity of viral oncoproteins like E6 and E7 to change cellular cycle leading to immortality and malignancy. The important role of oncoproteins in tumor progression and its interaction with numerous cellular targets have become relevant in studies and development of vaccines and therapies against HPV associated cancers. Studies of intracellular localization of proteins are also crucial to understand their cellular functions and activities. This investigated the intracellular localization of oncoproteins E6 and E7 of HPV and its possible cellular targets. Therefore, HeLa, SiHa and CaSki cells naturally transformed by HPV, and HEK 293T cells transfected with *E6* and *E7* viral oncogenes were analyzed by immunofluorescence and immunocytochemistry to determine the intracellular localization of the viral oncoproteins, and to search for possible cellular targets of E6 and E7 oncoproteins interactions. Additionally, assays were carried out by cell fractionation, mitochondrial isolation and western blotting to search these oncoproteins in specific regions of the cells. Results showed the presence of E6 oncoprotein in the cellular nucleus and cytoplasm, and mainly the interesting presence of intramitochondrial E6 in naturally HPV transformed cell, as well as in cells transfected with HPV oncogene. Moreover, E7 oncoprotein was detected inside nucleus and dispersed in the cytoplasm, but E7 intramitochondrial detection did not occur. Mitochondrial isolation assays followed by co-immunoprecipitation and western blotting suggest that the potential ligands to intramitochondrial E6 are Bax and Bak proteins. Numerous viral proteins have been described acting on the mitochondria, due to the great importance of these organelles in cellular homeostasis maintenance, besides their essential action in apoptosis regulation. The E6 oncoprotein intramitochondrial pathway is still unknown and further studies should be performed to confirm E6 activity and its interaction with Bcl-2 family proteins, located within mitochondria. Hence, the present study has contributed to confirm the hypothesis of the intramitochondrial presence of E6 viral oncoprotein from high risk HPV16/18. This is an original data whose relevance is directly related to human clinical application in the development of immunobiologicals and drugs, able to neutralize the action of this important therapeutic target shown here.

Keywords: HPV associated cancers. E6 and E7. Viral oncoproteins. Cellular targets. Therapy. Public health.

LISTA DE FIGURAS

Quadro 1 - Relação dos tipos de HPV e lesões cutânea-mucosas.....	19
Figura 1 - Estimativa da incidência mundial de câncer cervical, razão por 100 mil mulheres	20
Figura 2 - Representação espacial das taxas brutas de incidência de câncer cervical no Brasil.	22
Figura 3 - Representação esquemática do HPV e de seu genoma.....	24
Figura 4 – Atuação de HPV16 E6 nas vias de sinalização pró-apoptóticas.....	31
Figura 5 - Proteínas celulares e vias de sinalização que podem ser afetadas pela oncoproteína E6 de HPVs de alto risco.....	32
Figura 6 - Efeitos da oncoproteína E7 de HPV em diferentes processos celulares.....	35
Figura 7 - Esquema representativo da mitocôndria e suas principais estruturas.....	38
Figura 8 - Características morfológicas entre a apoptose e necrose.....	41
Figura 9 - Vias Apoptóticas. A apoptose pode ocorrer através de 2 vias diferentes.....	42
Figura 10 - Micrografia eletrônica de cortes ultrafinos de linhagens celulares pré-estabelecidas.....	57
Figura 11 - Expressão intracelular da oncoproteína E6 de HPV.....	58
Figura 12 - Análise da expressão intracelular da oncoproteína E7 em diferentes linhagens celulares.....	59
Figura 13 - Expressão de E6 e E7 em células HEK 293T transfectadas com o vetores recombinantes.....	60
Figura 14 – Expressão intracelular de E6 e E7 em células HeLa.....	61
Figura 15 - Imagens de ensaios controle negativos.....	62
Figura 16 - Micrografia eletrônica de corte ultrafino de célula HeLa.....	63
Figura 17 - Mitocôndrias isoladas de células HeLa imunomarcadas com anti-E6.....	64
Figura 18 - Células SiHa imunomarcadas com anti-E6.....	64
Figura 19 - Microscopia eletrônica de célula HeLa imunomarcada com anti-E7.....	65
Figura 20 - Células HEK 293T lipotransfectadas com o vetor pLXSN/E6 e imunomarcado com anti-E6.....	66
Figura 21 - Lipotransfecção de células com vetor pLXSN/E7 imunomarcado com anti-E7...67	67
Figura 22 - Linhagens celulares evidenciando a colocalização entre mitocôndrias e E6.....	68
Figura 23 - Linhagens celulares transformadas por HPV, evidenciando a presença de E7....	69
Figura 24 - Linhagens naturalmente transformadas por HPV e p53-positivas.....	70
Figura 25 - Linhagens HeLa, SiHa e CaSki pRb-positivas.....	71
Figura 26 - Células HEK 293T transfectadas com vetor pLXSN/E6 expressando E6, p53 e pRb.....	73
Figura 27 - Tripla marcação em células HEK 293T transfectadas.....	74
Figura 28 - Células transfectadas e imunomarcadas com anti-E7, anti-p53 e anti-pRb.....	75
Figura 29 - Gel SDS-PAGE contendo as amostras obtidas após fracionamento.....	77
Figura 30 - Western blotting após fracionamento celular em células transfectadas e não transfectadas.....	78

Figura 31 - Western blotting de amostras contendo frações celulares obtidos de linhagens celulares positivas e negativas para o HPV.	79
Figura 32 - Ensaio de western blotting de mitocôndrias isoladas para avaliar integridade de membranas.	79
Figura 33 - Gel SDS-PAGE após coimunoprecipitação das frações mitocondriais com anti-E6.	81
Figura 34 - Western blotting de frações mitocondriais de células positivas e negativas para o HPV com anti-E6.	82
Figura 35 - Ensaio de western blotting para reconhecimento de possíveis ligantes de E6 intramitocondrial.	83
Figura 36 - Esquema ilustrativo da hipótese proposta no presente estudo sobre a ação anti-apoptótica da oncoproteína viral E6 de HPV16/18.	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina difosfato
ANT	“Adenine nucleotide translocator”
APAF-1	Fator de ativação de protease associada a apoptose 1
ATCC	“The Global Bioresource Center”
ATP	Adenosina trifosfato
Bcl-2	Proteína de Linfoma de Células B - 2
Brd4	Proteína de bromodomínio 4
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CDC	“Center for Disease Control and Prevention”
CDk	Ciclina quinase-dependente
CR	“Conserved region”
CPFS30	Fator Celular de Poliadenilação 30
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DST	Doença sexualmente transmissível
E	“Early”
E6AP	“E6-associated protein”
EGFR	“Epidermal Growth Factor Receptor”
EP400	“E1A binding protein p400”
FADD	“Fas-associated death domain”
FAK	“Focal adhesion kinase”
H	Hidrogênio
HBV	Vírus da hepatite B
HDAC	Histona desacetilase
HLA	“Human Leucocytes Antigens”
HIV	Vírus da imunodeficiência adquirida
HPV	Papilomavírus humano
HTLV-1	Vírus T-linfotrófico humano
Ig	Imunoglobulina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IFN	Interferon

KDa	Quilodaltons
L	“Late”
LB	Luria-Bertani
LCR	“Long Control Region”
MAVS	Sinalização mitocondrial antiviral
MCS	Sítios múltiplos de clonagem
MCVL	Microscópio confocal de varredura a laser
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Principal
MLS	Sinal de Localização Mitocondrial
MMP	Permeabilização da membrana mitocondrial
MoMuLV	Moloney Murine Leukemia vírus
MoMuSV	Moloney Murine Sarcoma vírus
mRNA	RNA mensageiro
mtDNA	DNA mitocondrial
NAD	“Nicotinamide adenine dinucleotide”
NIC	Neoplasias Intraepitiliais Cervicais
NLS	Sinal de Localização Nuclear
NUMA	“nuclear mitotic apparatus protein 1”
NURD	“Nucleosome remodeling and histone deacetylation”
OPC	“Oropharyngeal carcinoma”
ORF	“Open Reading Frames”
PBS	Tampão fosfato salina
PCNA	“Proliferating cell nuclear antigen”
PDZ	<u>P</u> SD95/ <u>D</u> lg/ <u>Z</u> o-1
PFA	Paraformaldeído
PI	Ponto Isoelétrico
PLK4	“Polo-like kinase 4”
pRb	Proteína de Retinoblastoma
PTPC	“Permeability transition pore complex”
PV	Papilomavírus
RIG-I	“Retinoic acid-inducible gene 1”
RLR	Receptores semelhantes a RIG-I

RNA	Ácido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SMCX	Proteína de Manutenção Estrutural dos Cromossomos X
SR	Proteína Reguladora de <i>splicing</i>
SV40	Simian vírus 40
TERT	“Telomerase reverse transcriptase”
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF R1	Receptor 1 de TNF
TRADD	TNF R1-associated death domain
TRAIL	Ligante Indutor de Apoptose Relacionada ao Fator de Necrose Tumoral
USA	Estados Unidos da América
VDAC	Canais de ânions voltagem-dependente
VLP	Partículas semelhante ao vírus
WHO	Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 HPV	17
1.2 Incidência no Brasil e no mundo	19
1.3 Biologia do HPV	24
1.4 Alvos terapêuticos.....	27
1.4.1 E5	28
1.4.2 E6	29
1.4.3 E7	33
1.5 Localização intracelular das proteínas do HPV	35
1.6 Interação de proteínas virais e mitocôndria.....	38
1.7 Oncogênese versus apoptose	39
2 OBJETIVOS	43
3 MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1 Cultivo Celular.....	44
3.1.1 Linhagens celulares.....	44
3.1.2 Cultivos celulares.....	44
3.2 Produção de oncoproteínas do HPV16	45
3.2.1 Obtenção dos vetores de expressão gênica de E6 e E7.....	45
3.2.2 Preparação de bactérias competentes	45
3.2.3 Transformação de bactérias competentes	46
3.2.4 Seleção de clones recombinantes	46
3.2.5 Extração de DNA plasmideal	46
3.2.6 Transfecção celular	47
3.2.7 Extratos celulares	47
3.3 Expressão e caracterização das oncoproteínas E6 e E7	47
3.3.1 Expressão intracelular de E6 e E7 em células HEK 293T	47
3.3.2 Fracionamento celular e isolamento da fração mitocondrial	48
3.3.3 Estimativa da concentração de proteínas	49
3.3.4 Análise da localização intracelular de E6 e E7 por western blotting	49
3.3.5 Análise da integridade da membrana mitocondrial por western blotting	50
3.3.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) para análise morfológica	50

3.3.7 Imunocitoquímica ultraestrutural	51
3.4 Revelação e ampliação de filmes	53
3.4.1 Revelação	53
3.4.2 Ampliação	53
3.5 Análise da interação de E6.....	54
3.5.1 Coimunoprecipitação.....	54
3.5.2 SDS-PAGE e Western blotting	54
4 RESULTADOS	56
4.1 Análise ultraestrutural celular	56
4.2 Expressão intracelular das oncoproteínas E6 e E7.....	58
4.3 Expressão intracelular de E6 analisada por MET	63
4.4 Análise em MET para estudo da expressão intracelular de E7	65
4.5 Estudo da expressão intracelular de E6 e E7 em células transfectadas por plasmídeos recombinantes	66
4.6 Colocalização de E6 com mitocôndrias	67
4.7 Detecção de E7 intracelular	68
4.8 Detecção de p53 nas células positivas para o HPV	69
4.9 Presença de pRb em células naturalmente transformadas por HPV	70
4.10 Presença de E6, p53 e pRb em células transfectadas por vetores recombinantes	71
4.11 Detecção de E7, p53 e pRb em células HEK 293T transfectadas por E7	75
4.12 Fracionamento celular e isolamento mitocondrial	76
4.13 Coimunoprecipitação para determinação de E6, E7 e possíveis ligantes intramitocondriais	80
4.14 Western blotting para determinação de possíveis ligantes de E6 intramitocondrial	82
5 DISCUSSÃO	84
6 CONCLUSÃO.....	88
REFERÊNCIAS	90

1 INTRODUÇÃO

1.1 HPV

Os Papilomavírus (PV) são pequenos vírus de DNA dupla fita, não envelopados, com capsídeo icosaédrico. Pertencem a família *Papillomaviridae* e gênero *Papillomavirus*. São amplamente distribuídos, foram descritos sendo encontrados pelos cinco continentes, infectando especificamente o epitélio escamoso por todo o reino animal, causando verrugas. Infectam a pele e mucosas de diferentes hospedeiros, entre eles, os humanos. Entretanto são descritos como estritamente espécie-específicos, visto que em condições experimentais os PVs não infectam outros hospedeiros além de seus naturais (SMITH; PATEL; CAMPO, 1984). Para esse sucesso evolutivo, os PVs têm se adaptado e coevoluído junto aos hospedeiros (ANTONSSON; HANSSON, 2002).

A importância do Papilomavírus humano (HPV) reside no fato de que certos tipos têm potencial oncogênico, atuam alterando o ciclo de vida da célula infectada, conduzindo-a ao desenvolvimento descontrolado, a imortalidade e malignidade (BAUER; GREER; MANOS, 1992; EPPEL et al., 2000). São considerados como uma das causas centrais do câncer cervical, e estudos recentes descrevem sua associação também aos cânceres de cabeça e pescoço, pele, pulmão e mama (BARWAD et al., 2011; HENG et al., 2009; KOSHIOL et al., 2011; REUSCHENBACH et al., 2011).

Além disso, em estudo recente foi demonstrado que o HPV, na forma de VLPs (partículas semelhante ao vírus) L1L2, pode interagir com células-tronco da linhagem precursora hematopoiética do líquido amniótico, obtido de mulheres grávidas saudáveis e que não tiveram contato prévio com o vírus, sugerindo a possibilidade de participação da via hematogênica na infecção viral materno-fetal. Portanto, o uso de células tronco como estratégia em terapias celulares deve considerar a possibilidade da presença de HPV ou do DNA viral (KAVATI et al., 2012).

Adicionalmente, novas patologias estão constantemente sendo associadas aos papilomavírus, como a arterite temporal, uma doença inflamatória que atinge os vasos sanguíneos associada a diversos tipos de patógenos, e mais recentemente ao HPV (MOHAMMADI; PFEIFER; LEWIS, 2012).

Outro grave patógeno associado frequentemente ao HPV é o HIV (vírus da imunodeficiência humana), onde diversos estudos demonstraram uma alta prevalência na

infecção por ambos vírus, assim como o aumento da susceptibilidade à contaminação por HIV em indivíduos infectados por HPV (AUVERT et al., 2010; HOULIHAN et al., 2012; WANG et al., 2011).

O isolamento e caracterização do DNA de amostras de verrugas de pele e genitais revelaram a existência de diferentes tipos de HPVs (ZUR HAUSEN et al., 1974). Essa classificação se dá devido aos diferentes genótipos encontrados quando estudadas as seqüências de ORFs (“Open Reading Frames”) codificadoras para a proteína L1, a principal proteína estrutural do capsídeo viral. Devido a essa grande variedade, os HPVs representam um dos mais complexos grupos de viroses patogênicas, sendo que em torno de 120 tipos já foram totalmente caracterizados (DE VILLIERS et al., 2004).

Os HPVs identificados podem ser classificados conforme seu potencial para o desenvolvimento de lesões neoplásicas. O grupo considerado de alto risco está constantemente associado a cânceres e lesões pré-cancerosas, denominadas neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC), sendo que 70% dos casos estão associados aos HPVs 16 e 18, entretanto há registros de HPVs 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59. Os HPVs de baixo risco oncogênico podem induzir a formação de lesões denominadas condilomas na pele ou órgãos genitais (MUNOZ et al., 2006), onde aproximadamente 90% dos casos estão associados à infecção pelos HPVs tipos 6 e 11, além de 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 e 81 (STEBEN; DUARTE-FRANCO, 2007). Já o grupo formado pelos HPVs 26, 53, 66, 68, 73 e 82 pode ser considerado potencialmente de alto risco, visto que já foram descritos casos associados ao câncer cervical, embora sua incidência seja rara e não há estudos suficientes para que sejam considerados efetivamente pertencentes aos demais grupos (MUNOZ et al., 2006).

HPVs são vírus mucoepiteliotrópicos que infectam a camada basal da mucosa e do epitélio queratinizado e, mesmo apresentando uma estrutura genômica muito semelhante, cada tipo de HPV infecta regiões específicas do corpo humano (BOCCARDO; VILLA, 2003). Na tabela abaixo foram listados alguns tipos de lesões e locais onde essas lesões são frequentemente encontradas e o tipo de HPV associado.

A partir da localização da infecção por HPV, sendo cutânea ou mucosa, os HPV também podem ser classificados como beta ou alfa papilomavirus, respectivamente (BERNARD et al., 2010; BURK et al., 2011; DE VILLIERS et al., 2004).

Quadro 1 - Relação dos tipos de HPV e lesões cutânea-mucosas.

Tipo de HPV	Morfologia da lesão	Local da lesão	Oncogenicidade
1, 4	Verrugas palmares	Região palmar/plantar	Baixa
2	Verrugas comuns	Pele	Baixa
3, 10	Verrugas planas	Mãos e face	Baixa
7	Verrugas de Butcher	Mãos	Baixa
5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19-29, 36-38, 47	Epidermodisplasia verruciforme	Testa, braços e tronco	Alta
6, 11	Condiloma acuminato	Urogenital, anal, trato respiratório	Baixa
16, 18, 30, 31, 33, 35, 39, 41-45, 51-59, 61, 62, 64, 68, 72, 73	Lesões intra-epiteliais, Carcinomas invasores	Urogenital, anal, oro-respiratório	Alta
13, 32	Hiperplasias	Cavidade oral	Baixa
30, 40	Carcinomas	Laringe	Alta

Fonte: Adaptado de (LANCELLOTTI et al., 2000).

1.2 Incidência no Brasil e no mundo

Atualmente, a infecção genital por HPV é considerada a doença sexualmente transmissível (DST) viral mais freqüente na população sexualmente ativa, sendo a principal causa do câncer cervical e a segunda maior causa de morte por câncer em mulheres.

Acredita-se que cerca de 50% da população sexualmente ativa teve algum contato com o vírus e desses, de 10% a 20% apresentem infecção por HPV, principalmente na faixa etária de 15 a 49 anos de idade, inclusive em mulheres assintomáticas (NONNENMACHER et al., 2002; PEREZ et al., 2000).

Apesar da alta prevalência, a maioria das infecções não ocasiona o surgimento de sintomas e/ou lesões visíveis. Conforme o *National Cancer Institute* dos Estados Unidos (USA), em um curto período de tempo, aproximadamente 90% das mulheres infectadas por HPV eliminam o vírus pela ação do sistema imune, porém em um pequeno número de

mulheres a infecção é persistente por anos. A persistência da infecção por HPVs de alto risco eleva muito o risco do desenvolvimento e progressão de lesões neoplásicas no trato anogenital (SCHLECHT et al., 2001).

Segundo o CDC (Center for Disease Control and Prevention), aproximadamente 20 mil de americanos estão atualmente infectados por HPV e outros 6,2 mil serão infectados a cada ano (XIAOCHENG et al., 2012).

No Brasil, o Ministério da Saúde registra a cada ano 137 mil novos casos, sendo um dos líderes mundiais em incidência de HPV. As vítimas preferenciais são mulheres entre 15 e 25 anos, embora a doença também acometa os homens. Especialistas acreditam que o número menor de registros entre pessoas do sexo masculino tenha como origem a baixa procura dos homens por serviços de urologia, por fatores como o preconceito ou a falta de informação.

A infecção persistente por HPV está associada a casos de câncer. Estima-se que, em todo o mundo, 12% dos casos de câncer na mulher são causados pelo HPV. Estudos epidemiológicos demonstraram que em 99,7% dos casos totais de câncer cervical foi detectado o DNA viral de HPV (UNGER; DUARTE-FRANCO, 2001). No Brasil, o HPV é responsável por até 91% dos casos de câncer cervical (RABELO-SANTOS et al., 2003).

Figura 1 - Estimativa da incidência mundial de câncer cervical, razão por 100 mil mulheres.

Fonte: GLOBOCAN, 2011.

Dos 550 mil novos casos de câncer cervical estimados por ano, 80% ocorre nos países em desenvolvimento (CUTTTS et al., 2007), como pode ser observado acima (Figura 1). Sendo fatal a aproximadamente 300 mil mulheres por ano em todo mundo. Haiti, Bolívia e Paraguai são os países que apresentam maior incidência de câncer cervical no continente Americano, registrando aproximadamente 55 casos a cada 100 mil mulheres (TORRES et al., 2009). Enquanto que na África, países como Guiné, Zambia, Comores, Tanzânia, Malawi e Moçambique registram mais de 50 casos a cada 100 mil mulheres (GLOBOCAN, 2011).

Nos EUA, segundo o CDC, são estimados cerca de 12 mil novos casos de câncer cervical por ano, levando a morte aproximadamente 4 mil mulheres (XIAOCHENG et al., 2012).

Segundo o INCA (Instituto Nacional do Câncer – Ministério da Saúde, 2012), estima-se que no ano de 2012 serão registrados aproximadamente 18 mil novos casos de câncer cervical, levando a óbito cerca de 5 mil mulheres. Em 2010, a região norte apresentava maior incidência do câncer cervical no país, onde, sem considerar os tumores de pele não-melanoma, é o mais incidente; e o estado com a maior taxa estimada da incidência era o Amazonas. Porém para as estimativas de 2012, o estado do Mato Grosso do Sul aparece com a maior incidência dessa malignidade, com 35,13 casos a cada 100 mil mulheres (Figura 2).

Figura 2 - Representação espacial das taxas brutas de incidência de câncer cervical no Brasil.

Taxa por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2012, segundo a Unidade da Federação (neoplasia maligna do colo do útero).

Fonte: (FACINA, 2011).

Os cânceres de cabeça e pescoço historicamente são associados ao uso de tabaco e álcool (HASHIBE et al., 2007), porém estudos recentes têm mostrado uma forte associação à infecção por HPV (GILLISON, 2004; KREIMER et al., 2005).

Diferenças epidemiológicas entre os cânceres de cabeça e pescoço HPV-positivos e HPV-negativos têm sido notadas, visto que em casos onde foram detectadas presença do DNA do vírus, os pacientes eram, em geral, jovens e com alto número de parceiros sexuais, e estão menos associados ao uso de tabaco como nos casos de cânceres HPV-negativos (HECK et al., 2010). A proporção dos casos de câncer de cabeça e pescoço associados ao HPV é variável, estudos revelam associação de 25 a 35% (KREIMER et al., 2005), enquanto outros descrevem associação de até 80% (HOCKING et al., 2011).

Segundo o CDC (2012), são estimados mais de 1,7 mil novos casos de câncer de cabeça e pescoço associados ao HPV em mulheres por ano nos Estados Unidos, enquanto que a incidência em homens é de aproximadamente 5,7 mil novos casos. No mundo, a estimativa da WHO (World Health Organization) é de que a cada ano mais de 1 milhão de novos casos

de câncer de cabeça e pescoço serão registrados, levando a óbito aproximadamente 750 mil pessoas.

A incidência de OPC (“oropharyngeal carcinoma”) tem aumentado muito nos últimos anos na América do Norte e o DNA dos HPVs de alto risco foi detectado em aproximadamente 90% dos casos (GILLISON et al., 2008). A incidência de OPC nos Estados Unidos foi estimada em 7%, e desses, 1% foram detectados com o DNA do HPV16, o que corresponde a quase 2,2 milhões de indivíduos (GILLISON et al., 2012). Estudos sugerem que o câncer de orofaringe associado à infecção oral por HPV pode ser adquirido sexualmente através do contato oral-genital, e que essa incidência aumenta significativamente conforme maior o número de parceiros sexuais (D'SOUZA et al., 2007; MARUR et al., 2010).

O INCA (2011) estima que, por ano, cerca de 14 mil novos casos de câncer de cabeça e pescoço são registrados no país. Em um artigo recentemente publicado revelou-se que no Hospital A. C. Camargo, em São Paulo, aproximadamente 20% dos casos de câncer de orofaringe estão associados ao HPV (KAMINAGAKURA et al., 2011).

Os diversos tipos de cânceres anogenitais, excluindo o câncer cervical, são considerados normalmente raros, porém estudos demonstraram alta prevalência de HPV. O HPV é responsável por aproximadamente 85% dos casos de câncer anal, 70% do câncer vaginal e 40% dos casos de câncer de pênis e vulvar (DE VUYST et al., 2009). Dados do CDC estimam cerca de 2500 novos casos de câncer anal nos Estados Unidos por ano, 600 e 2300 novos casos de câncer vaginal e vulvar, respectivamente, e 800 novos casos de câncer de pênis. Já o INCA registra 1600 novos casos de câncer anal e cerca de 4500 novos casos de câncer de pênis por ano no Brasil.

Por outro lado, o envolvimento do HPV no desenvolvimento do câncer de mama é bastante controverso, pois enquanto alguns estudos descrevem altas taxas de prevalência do DNA viral em amostras estudadas (AKIL et al., 2008; ANTONSSON et al., 2011; HENG et al., 2009), outros grupos revelam a baixa ou nenhuma associação do material obtido de biópsias com o vírus (INTERNATIONAL COLLABORATION OF EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF CERVICAL CANCER, 2006; MENDIZABAL-RUIZ et al., 2009; MOU et al., 2011).

1.3 Biologia do HPV

São pequenos vírus de DNA dupla fita circular, desprovidos de envelope. Possuem um capsídeo icosaédrico de aproximadamente 55 nm de diâmetro formado por 72 capsômeros, o qual é composto por duas proteínas estruturais L1 e L2 (Figura 3A) (BURD, 2003; GNANAMONY; PEEDICAYIL; ABRAHAM, 2007).

O genoma dos HPVs é formado por aproximadamente 8.000 pares de bases associadas às histonas, constituído por regiões regulatórias não traduzidas, “long control region” (LCR), porém críticas para a transcrição, início da replicação e segregação dos genes virais na mitose, além de sete ou oito ORFs (“Open reading frames”) bem definidas que codificam seis proteínas expressas na fase inicial da infecção, denominadas E1, E2, E4, E5, E6 e E7 (E: “Early”), além de duas proteínas expressas na fase tardia da infecção, L1 e L2 (L: “Late”) (Figura 3B) (HEBNER; LAIMINS, 2006).

Figura 3 - Representação esquemática do HPV e de seu genoma.

(A) Modelo atômico do capsídeo icosaédrico formado por 72 capsômeros compostos pelas proteínas L1 (azul) e L2 (vermelho). (B) Representação esquemática do genoma do HPV, constituído por genes que codificam proteínas precoces (E: “Early”), proteínas tardias (L: “Late”) e por uma região regulatória não traduzida (LCR).

Fonte: Adaptado de (BUCK, 2012); MUÑOZ et al., 2006).

O HPV utiliza extensivamente as proteínas do hospedeiro para replicação e manutenção do seu genoma. Durante a infecção, o genoma viral é encontrado em baixos números de cópias como elementos extracromossômicos denominados episômos. Entretanto, em amostras de biópsias de lesões cervicais de alto-grau ou cânceres provocados por HPVs de alto-risco, o DNA viral não é encontrado como elemento extracromossômico e sim integrado ao DNA genômico da célula hospedeira (FERBER et al., 2003).

Normalmente apenas um segmento do genoma viral é encontrado integrado ao genoma da célula hospedeira, contendo a região LCR e uma parte da região codificadora dos genes precoces, incluindo as ORFs de *E6* e *E7*, os dois principais oncogenes. Esses dois genes são transcritos a partir de dois diferentes RNA mensageiros (mRNA), porém são iniciados por um único promotor, P97 – em HPV16 e HPV31 ou P105 – em HPV18. Outro importante aspecto dessa integração genômica é a quebra de ORFs dos genes *E1* e/ou *E2*, visto que ambos estão envolvidos na replicação do DNA viral. Portanto, a integração do DNA viral ao DNA genômico leva a interrupção da replicação viral, porém contribui para a oncogênese, visto que a proteína E2 tem sido associada à repressão da expressão dos genes *E6* e *E7* (THIERRY, 2009).

A região LCR do genoma do HPV representa 10% do genoma viral e está localizada entre o fim da ORF de *L1* e o início da ORF de *E6*, contém o promotor principal (P97 ou P105) e a origem de replicação (*ori*). Contém também numerosos sítios de ligação para muitos repressores e ativadores da transcrição. A regulação da expressão gênica é complexa e controlada por diferentes fatores de transcrição celular e viral que se ligam a seqüências específicas de LCR, principalmente ao segmento central, denominado de região intensificadora, regulando a transcrição dos genes *E6* e *E7*, induzindo a expressão desses genes nas células infectadas e, conseqüentemente, a oncogenicidade (WEYN et al., 2011).

Dentre todas as proteínas codificadas pelo genoma do HPV, E1 e E2 são as de maior importância na replicação e transcrição do DNA viral, visto que a proteína E1 contém atividade helicase-ATPase, que auxilia na abertura das fitas do DNA viral, enquanto que a proteína E2 tem como uma de suas funções auxiliar no recrutamento específico de E1 para o DNA viral (TYRING, 2000). E1 então se oligomeriza à origem de replicação do DNA viral e interage com fatores de replicação da célula hospedeira como a polimerase α -primase, proteína A de replicação, topoisomerase I e ciclina E/Cdk2 (HEBNER; LAIMINS, 2006). O gene *E1* é reconhecido como o maior e mais conservado da região precoce do genoma de diferentes papilomavírus (ZUR HAUSEN, 1996). E2 também atua como fator de transcrição

sendo capaz de ativar ou reprimir através de sua interação a fatores celulares como as proteínas SR (BODAGHI; JIA; ZHENG, 2009), Brd4, SMCX e EP400 (SMITH et al., 2010). Medeia a segregação do genoma ao DNA hospedeiro, tornando-se essencial para a persistência viral (MCBRIDE; MCPHILLIPS; OLIVEIRA, 2004), e quando expresso em altos níveis é capaz de induzir apoptose (WEBSTER et al., 2000). E2 também foi descrito sendo capaz de inibir a expressão dos genes da região “Late” do genoma viral através da interação com CPFS30, fator celular de poliadenilação, impedindo a formação dos sinais poli-A (JOHANSSON et al., 2012).

O gene *E3* ainda é desconhecido, não foram encontradas regiões ORFs, indicando que talvez não seja transcrito e sua função ainda é indeterminada (SONNEX, 1998). Por outro lado, a proteína E4 parece ser incorretamente designada como um produto de gene precoce, sendo que essa proteína é exclusivamente detectada nas camadas mais diferenciadas do epitélio e em abundantes concentrações (ZUR HAUSEN, 1996). Seu mRNA sofre “splicing” com cinco aminoácidos codificados pela ORF de *E1* gerando uma proteína conhecida como E1^{E4}. A primeira atividade descrita de E1^{E4} de HPV16 foi sua habilidade em ligar e desmanchar a rede de citoqueratina das células, facilitando a saída de partículas virais maduras da célula hospedeira, o que permite ao vírus infectar novas células (DOORBAR et al., 1991; RAJ et al., 2004). A expressão de E1^{E4} é perdida durante a progressão maligna e a expressão de E1^{E4} em culturas celulares causa a parada do ciclo celular na fase G2 pelo seqüestro da ciclina 1 quinase-dependente (Cdk1)/ciclina B1 na rede de citoqueratina, que previne o acúmulo do complexo ativo Cdk1/ciclina B1 no núcleo resultando na inibição da mitose (DAVY et al., 2005).

Os genes *E5*, *E6* e *E7* codificam oncoproteínas que desempenham papel fundamental na patogênese do HPV, pois permitem a replicação do vírus, imortalização e transformação das células hospedeiras, fatores que serão discutidos em detalhes ao longo do presente trabalho.

A região tardia compreende cerca de 40% do DNA viral, envolve dois genes, *L1* e *L2*, que codificam a proteína principal e secundária do capsídeo viral, respectivamente. A partir dessas é possível obter partículas semelhante ao vírus (VLP), desprovido de material genético, produzidas em sistemas distintos de expressão, conforme vem sendo demonstrado através de diferentes estudos (AIRES et al., 2006; BAZAN et al., 2009; CIANCIARULLO et al., 2007, 2009, 2010; MARIGLIANI et al., 2012).

1.4 Alvos terapêuticos

A falha do sistema imune do organismo hospedeiro em combater a infecção persistente do HPV tem sido considerada um dos principais fatores para o desenvolvimento do câncer cervical. Em lesões pré-cancerígenas o genoma do HPV é encontrado na forma epissomal, enquanto que em lesões de alto grau, o genoma do HPV está integrado ao cromossomo do hospedeiro. Nas lesões onde o HPV se encontra na forma epissomal a proteína E2 reprime diretamente a expressão dos genes da região L como parte de um mecanismo para regular o número de cópias do DNA viral. Após a integração do DNA viral a expressão de E2 é inibida, levando a expressão desregulada dos genes virais *E*, principalmente *E6* e *E7*, induzindo aumento da capacidade proliferativa da célula, um passo crucial na progressão tumoral (ZUR HAUSEN, 2002).

O HPV16 é o tipo viral de alto risco predominantemente detectado nos casos de câncer cervical (HOWLEY et al., 1991; ZUR HAUSEN; DE VILLIERS, 1994). Seu genoma codifica três proteínas responsáveis pela transformação maligna das células: E5, E6 e E7. São os principais fatores virais responsáveis pela iniciação e progressão tumoral através da indução excessiva de crescimento celular e indução da instabilidade genômica, característico dos cânceres associados ao HPV (MOODY; LAIMINS, 2010).

As oncoproteínas E6 e E7 são expressas continuamente em tumores HPV-positivos e são essenciais para a manutenção do ciclo viral. Além de controlar o ciclo celular das células infectadas, modulam o sistema imune de forma que as células tumorais tornam-se pouco imunogênicas, podendo desencadear tolerância imunológica ao tumor. Estão associadas ainda a progressão de lesões benignas a carcinomas invasivos (TINDLE, 2002).

A proteína E5 auxilia na transformação de queratinócitos e fibroblastos em cultura, aumentando o potencial de imortalização de E6 e E7. Participam efetivamente do controle da proliferação celular, já que interagem suprimindo as funções das proteínas associadas ao controle do crescimento celular, assim, o potencial oncogênico de alguns tipos de PVs pode ser atribuído a essas interações. Por isso, tais proteínas tornaram-se alvos para o desenvolvimento de vacinas terapêuticas contra os cânceres associados ao HPV (KARANAM et al., 2009; KIM et al., 2010; PENG et al., 2004).

1.4.1 E5

O gene *E5* não é conservado no DNA de PVs e estudos demonstraram seu potencial em transformar células de mamíferos, porém a ORF de *E5* é frequentemente deletada em células de tumores anogenitais, o que sugere que tal proteína não é essencial para a manutenção da transformação maligna de células infectadas por HPV, mas contribui para a transformação celular, aumentando a frequência de mitoses através da interação com receptores de fatores de crescimento (BURKHARDT et al., 1989; KIM; YANG, 2006).

A proteína E5 é pequena, formada por aproximadamente 83 aminoácidos, é altamente hidrofóbica e tem a capacidade de se ligar a membranas. Forma dímeros de duas subunidades ligadas por pontes dissulfeto, é insolúvel, o que dificulta sua detecção e purificação, e pouco eficiente na indução da produção de anticorpos específicos (TSAI; CHEN, 2003).

Os efeitos associados à expressão de E5 nas células são múltiplos. Estudos demonstraram que E5 contribui para a transformação celular induzindo mitoses através da estimulação de receptores de fatores de crescimento, como o EGFR (“Epidermal Growth Factor Receptor”); por associar-se a um subunidade de 16 KDa de uma ATPase vacuolar, uma bomba de prótons, que bloqueia sua ação induzindo a acidificação dos endossomos pelo acúmulo de H^+ , inibindo a degradação dos receptores de superfície celular, incluindo o EGFR, levando a um aumento na reciclagem desses receptores, sendo direcionados novamente às membranas celulares, o que indicaria sua atuação no aumento da sinalização de EGFR (AUVINEN; ALONSO; AUVINEN, 2004; RODRIGUEZ; FINBOW; ALONSO, 2000). Outras atividades que contribuem para o perfil oncogênico de E5 seriam a habilidade de inibir a apoptose, inibir a comunicação intercelular atuando na desfosforilação da conexina 43 das junções comunicantes (“gap junctions”) (GRUENER et al., 2007); alterar a síntese e estabilidade das moléculas do MHC (Complexo de Histocompatibilidade Principal) ou HLA (“Human Leucocytes Antigens”) de classe I prevenindo seu transporte para a superfície celular, devido a sua retenção no complexo de Golgi (ASHRAFI et al., 2006; ASHRAFI et al., 2005); reduzir a transcrição do gene *p21*, um supressor tumoral (AUVINEN; ALONSO; AUVINEN, 2004; BELLEUDI et al., 2011; KIM et al., 2010; MAUFORT et al., 2010; TSAO et al., 1996).

A expressão de E5 do HPV16 também foi descrita associada a fusão célula-célula resultando em formação de células binucleadas, que por sua vez contribui com a carcinogênese, induzindo instabilidade cromossômica (DUELLI et al., 2007; HU et al., 2009).

1.4.2 E6

A oncoproteína E6 dos HPVs de alto risco é formada por aproximadamente 150 aminoácidos e dois motivos de zinco, cuja integridade é essencial para sua função. Essa oncoproteína desempenha papel importante nos processos que culminam com a transformação celular através de sua interação com diversos alvos celulares, sendo que a mais estudada e primeiramente descrita é sua capacidade de interagir com a proteína p53 (ZUR HAUSEN, 1996).

A proteína p53 é um supressor tumoral que regula a progressão do ciclo celular e a sobrevivência da célula em resposta a diversos tipos de estresse, como ativação oncogênica, hipóxia, dano ao DNA ou infecções virais (KANELLOU et al., 2008; MEEK, 2004). Para combater esse obstáculo, diversos vírus codificam proteínas que inativam a p53.

E6 liga-se a proteína E6AP (“E6-associated protein”), uma proteína celular E3 ubiquitina-ligase, formando um heterodímero estável, a E6 – E6AP, que em seguida se associam a p53. A formação deste complexo resulta na degradação de p53 pela via ubiquitina-proteassomo, uma via proteolítica que se inicia com a ubiquitinação da proteína alvo com o objetivo de auxiliar no reconhecimento por proteassomos, onde as proteínas alvo serão degradadas (SCHEFFNER et al., 1990). A proteína E6 tem capacidade de se ligar a p53 independente de E6AP, porém essa interação não é suficiente para induzir sua degradação. A eficiência da degradação de p53 é variável dependendo da habilidade de E6 se ligar a E6AP e p53, sendo observadas diferenças entre os diversos tipos de HPVs, por exemplo, E6 de HPV16 se liga mais eficientemente a E6AP e p53 do que E6 de HPV18; enquanto que E6 de HPV11, considerado de baixo risco, apresenta níveis mínimos de interação a E6AP (MANTOVANI; BANKS, 2001).

A principal razão da degradação de p53 é facilitar a replicação viral e como consequência, podem ocorrer danos ao DNA que não serão reparados, acumulando alterações cromossômicas que contribuem para a transformação maligna das células. Porém, estudos demonstraram que E6 de HPVs de alto e baixo risco cutâneos não interagem com E6AP ou

p53, sendo incapazes de alterar a estabilidade de p53, indicando que há interação com outros alvos celulares, visto o caráter multifuncional da proteína E6 (ELBEL et al., 1997).

Um importante alvo de E6 p53-independente são as proteínas que se ligam ao domínio PDZ (P_{SD}95/Dlg/Z_o-1). O domínio PDZ é uma sequência específica de 80 a 90 aminoácidos que medeiam à interação proteína-proteína e é comumente encontrado em moléculas de sinalização de diversos organismos, desde bactérias e vírus a plantas e animais. Diferentemente do que observado na via p53-dependente, as sequências ligantes de PDZ são encontradas apenas em E6 dos HPVs de alto risco (THOMAS et al., 2008). As proteínas da família PDZ exercem inúmeras funções como definição e manutenção da polaridade celular, medeiam à cinética da polarização – despolarização da actina, atuam na sinalização celular e supressão tumoral. A proteína E6 dos HPVs de alto risco se ligam às proteínas PDZ através do motivo X-(T/S)-X-V localizado na sua extremidade C-terminal, promovendo sua degradação proteossomal (GLAUNSINGER et al., 2000; THOMAS et al., 2002). Alterações nos motivos PDZ têm demonstrado comprometimento na atividade de E6, prevenindo a imortalização celular e crescimento independente de ancoragem, sugerindo que os domínios PDZ atuem em vias fundamentais na indução da oncogênese mediada por E6 (SPANOS et al., 2008).

Um fator importante para a imortalização das células em transformação maligna é a indução da expressão de telomerase, visto que a cada replicação do DNA durante a divisão celular, uma parte terminal dos cromossomos é perdida, os telômeros. Quando os telômeros atingem tamanhos considerados criticamente curtos, as células sinalizam senescência e, conseqüentemente, a morte. A telomerase é um complexo de enzimas transcriptase reversa que utilizam um molde de RNA para inserir cópias repetidas de DNA nas regiões dos telômeros. A E6 parece aumentar a atividade da telomerase pela indução do promotor do gene *TERT* (“Telomerase reverse transcriptase”), ativando sua transcrição e essa interação ocorre via E6AP (HOWIE; KATZENELLENBOGEN; GALLOWAY, 2009; LIU et al., 2009).

E6 atua em outras vias de inibição de apoptose, como na degradação de Bak mediada por ubiquitina. Bak é uma proteína da família Bcl-2, chave para o processo de apoptose, localizada na membrana externa da mitocôndria e quando ativada, altera sua conformação permitindo a formação de poros na membrana mitocondrial por onde há liberação de citocromo c e outros fatores pró-apoptóticos para o citoplasma, ativando as caspases, desencadeando a apoptose. E6 degradando Bak previne a liberação de tais fatores pró-apoptóticos mitocondriais e, conseqüentemente, inibe a apoptose. A inibição dessa via foi

descrita como crucial para a proteção das células tumorais HPV - positivas contra apoptose, facilitando o desenvolvimento do câncer (SIMMONDS; STOREY, 2008; THOMAS; BANKS, 1998; VOGT et al., 2006).

Em culturas celulares também foram descritas vias em que E6 inibe a apoptose mediada por TNF (Fator de necrose tumoral), através de sua ligação ao TNF R1 (Receptor 1 de TNF), prevenindo sua interação com TRADD (“TNF R1-associated death domain”) (FILIPPOVA et al., 2002). A via da apoptose mediada por Fas também é afetada por E6, ligando-se a FADD (“Fas-associated death domain”) e mediando sua degradação via ubiquitina-proteassomo (FILIPPOVA; PARKHURST; DUERKSEN-HUGHES, 2004). A ação de E6 sobre TRADD e FADD pode ser observada em detalhes no esquema abaixo.

Figura 4 – Atuação de HPV16 E6 nas vias de sinalização pró-apoptóticas.

HPV16 E6 atua de forma semelhante nas vias de sinalização pró-apoptóticas TNF, Fas/FasL e TRAIL. E6 inibe apoptose mediada por TNF e Fas através da ligação a TNF R1 e FADD. Ainda protege as células da apoptose mediada por TRAIL, acelerando a degradação de FADD e caspase 8.

Fonte: Adaptado de (GARNETT; FILIPPOVA; DUERKSEN-HUGHES, 2006).

Outra via pró-apoptótica regulada por E6 é a *anoikis*, indução de apoptose relacionada à perda de adesão, induzindo a expressão de altos níveis de FAK (“Focal adhesion kinase”) e fibronectina, que aumenta a fosforilação da paxilina, levando a reorganização do citoesqueleto e formação da adesão focal pela interação de fibronectina e matriz extracelular (TONG; HOWLEY, 1997; VANDE POL; BROWN; TURNER, 1998).

Assim, os resultados da interação de E6 com inúmeras proteínas diferentes medeiam a apoptose, regulam a transcrição, a estabilidade cromossômica, organização epitelial, diferenciação, adesão célula-célula, polaridade e controle da proliferação das células infectadas. Algumas dessas interações são demonstradas na figura abaixo (Figura 5). Portanto, as interações de E6 com várias proteínas celulares contribuem, de modo geral, para a eficácia da promoção da oncogenicidade mediada por HPV (TUNGTEAKKHUN; DUERKSEN-HUGHES, 2008).

Figura 5 - Proteínas celulares e vias de sinalização que podem ser afetadas pela oncoproteína E6 de HPVs de alto risco

Fonte: (MOODY; LAIMINS, 2010).

1.4.3 E7

A oncoproteína E7 é formada por aproximadamente 98 aminoácidos, com duas regiões bem conservadas em sua extremidade amino-terminal, CR1 e CR2, onde CR significa *conserved region*. Tais domínios compartilham homologias com as seqüências conservadas de E1A adenovírus e antígeno T (“Large tumor antigen”) de Simian virus (SV40), como por exemplo, um motivo LXCXE (Leu-X-Cys-X-Glu) necessário e suficiente para a interação desses vírus com a proteína pRB (proteína supressora tumoral em retinoblastoma) (MUNGER et al., 2001; MUNGER et al., 1989) a porção C-terminal de E7 contém um domínio de ligação ao zinco, domínio CXXC, importante na dimerização e estabilização intracelular de E7 (HEBNER; LAIMINS, 2006; PHELPS et al., 1992).

A oncoproteína E7 apresenta três diferentes isoformas, com peso molecular, PI (ponto isoeletrico) e localização celular diferentes, tais isoformas foram denominadas E7a1, E7a e E7b. A localização em compartimentos celulares distintos, talvez seja importante para a interação de E7 com suas proteínas alvo e na transformação celular. Assim, sugere-se a presença de outras modificações pós-transcricionais, além da fosforilação (VALDOVINOS-TORRES et al., 2008).

Da mesma forma que E6, E7 exerce papel importante nos mecanismos de transformação celular. Um dos mais importantes e mais estudados mecanismos é sua interação às proteínas da família pRb. Durante o ciclo celular normal, a pRb é fosforilada pelo complexo ciclina D1/ciclina quinase-dependente 4 (CDK4) e ciclina 2/CDK2, sendo então ativada e permitindo sua interação a E2F, uma família de fatores de transcrição. Tal interação inibe a progressão normal da célula da fase G1 para a fase S do ciclo celular. Porém em células infectadas por HPV, E7 se liga a pRB prevenindo sua interação a E2F, liberando-o e promovendo a entrada prematura da célula na fase S, levando a uma proliferação descontrolada. A interação de E7 e pRb resulta na degradação da última através da via ubiquitina-proteassomo (DYSON, 1998; DYSON et al., 1989; MCLAUGHLIN-DRUBIN; MUNGER, 2009).

O heterodímero formado por Rb e E2F recruta o complexo formado por histona desacetilases (HDAC), que por sua vez interage com o DNA, formando heterocromatina, reprimindo a transcrição. Tal interação é resultado da desacetilação de resíduos de lisina, desmascarando sua carga positiva, sendo atraída fortemente pela carga negativa do DNA. E7 foi demonstrada se ligando a HDACs através de uma proteína intermediária, a Mi2 β , um

membro do complexo NURD (“Nucleosome remodeling and histone deacetylation”) que tem a habilidade de modificar a estrutura da cromatina por desacetilar as histonas e reposicionar os nucleossomos de forma ATP-dependente. Essa interação desregula a transcrição de genes que regulam o ciclo celular, promovendo um crescimento desregulado das células, expandindo o ciclo de vida e resultando na perda da integridade do genoma (BREHM et al., 1999; LONGWORTH; LAIMINS, 2004).

A expressão de E7 também foi descrita alterando a divisão de centríolos, fazendo com que a divisão ocorra mais vezes e de forma mais rápida, o que foi correlacionado a erros na divisão celular. Essa superdivisão de centríolos se dá pelo aumento nos níveis de mRNA de PLK4 (“Polo-like kinase 4”), quinase responsável pela regulação da duplicação dos centríolos durante o ciclo celular (KORZENIEWSKI; TREAT; DUENSING, 2011).

p21 e p27 são proteínas inibidoras de CDK responsáveis por reprimir o ciclo celular em resposta a diferentes sinais antitumorais, como presença de DNA danificado. E7 se liga a p21 inibindo atividade de CDK e a replicação de DNA dependente de PCNA (“Proliferating cell nuclear antigen”), onde o PCNA atuaria auxiliando a DNA polimerase interagir ao DNA e aumentaria sua atividade na replicação e reparo do DNA (FUNK et al., 1997). Já a ação de E7 sobre p27 foi descrita como inibindo CDK, ativando ciclina E e ciclina A, induzindo progressão do ciclo celular e consequentemente, a proliferação das células (ZERFASS-THOME et al., 1996).

Durante a mitose, as células sofrem uma série de alterações para garantir a segregação dos cromossomos de forma fiel à célula-mãe. No início da mitose, a proteína NUMA (“nuclear mitotic apparatus protein 1”) é direcionada aos pólos das células pelos microtúbulos contendo dineína, auxiliando na organização e estabilização dos fusos mitóticos para o alinhamento correto dos cromossomos. Porém E7 foi observada retirando a dineína dos fusos mitóticos, através de sua interação a NUMA, o que prolongaria a fase da mitose, potencialmente devido ao defeito no alinhamento dos cromossomos, contribuindo para a desestabilização do genoma da célula (NGUYEN; MUNGER, 2009).

Assim, a oncoproteína E7 de HPVs de alto risco atuam de diversas formas afetando inúmeros processos celulares através de sua interação a várias proteínas da célula hospedeira, de forma a reprogramar o ciclo celular, induzir instabilidade genômica através do acúmulo de erros no DNA, inibir a apoptose, induzir proliferação e transformação maligna das células, causando a imortalização. Alguns desses processos e interações podem ser observados na figura abaixo (Figura 6).

Figura 6 - Efeitos da oncoproteína E7 de HPV em diferentes processos celulares.

Oncoproteína E7 de HPVs de alto risco atuam de diversas maneiras sobre diferentes processos celulares através de sua interação com proteínas-alvo.

Fonte: (MOODY; LAIMINS, 2010).

1.5 Localização intracelular das proteínas do HPV

O conhecimento preciso da localização intracelular das proteínas pode contribuir para o melhor entendimento de suas funções e atividades dentro do contexto celular. Pode, inclusive, auxiliar no desenvolvimento de técnicas experimentais para testar sua ação na complexidade do sistema (MEISSNER et al., 2011).

Os diferentes componentes celulares e proteínas alteram sua localização intracelular e são direcionados a outros compartimentos onde encontrarão seus substratos específicos e induzirão distintos efeitos como consequência a diferentes estímulos (ZEHORAI et al., 2010).

Um dos fatores que influenciam na localização intranuclear de proteínas é a presença de sinais como o de localização nuclear ou NLS (“Nuclear Localization Signal”). São sequências de aminoácidos que atuam como um marcador na superfície da proteína. Essa sequência é usada para direcionar a proteína para o núcleo através dos poros nucleares, permitindo que se ligue a receptores citoplasmáticos, que aparentemente induz uma alteração conformacional no transportador central, permitindo que moléculas circundantes entrem no núcleo. Tipicamente, esses sinais consistem em pequenas sequências de lisinas ou argininas carregadas positivamente (COKOL; NAIR; ROST, 2000).

Assim como foram descritas as sequências que induzem a localização intranuclear de algumas proteínas, outras sequências de aminoácidos têm sido associadas à localização de proteínas no interior de determinadas organelas, como as mitocôndrias (MLS - “Mitochondrial Localization Signal”) (BECKER; BOTTINGER; PFANNER, 2012; OMURA, 1998; VOOS et al., 1999), aparelho de Golgi (FRANCIS et al., 1998), retículo endoplasmático (GUPTA; DONG; LOWE, 2012) e em regiões nucleolares (GONG et al., 2011).

A localização intracelular das proteínas do HPV tem sido frequentemente estudada e relatada, visando o melhor entendimento sobre suas interações, funções e ações.

A proteína E1 do HPV 11 foi descrita como uma típica proteína que transita entre o citoplasma e núcleo das células hospedeiras. Como E1 é expressa no citoplasma e possui funções diretamente relacionada a replicação do DNA viral, é localizada no núcleo apenas durante as fases S e G2 do ciclo celular. É ativamente importada ao núcleo por possuir sinais LNS e mutações nesses sinais podem inibir a localização nuclear dessas proteínas (YU et al., 2007).

A proteína E2 atua de forma complementar a E1 na regulação da replicação e na modulação da transcrição viral, assim E2 também possui segmentos LNS conhecidos que auxiliam no seu transporte ao núcleo celular (KLUCEVSEK et al., 2007).

Como já descrito nesse trabalho, E1^{E4} tem a habilidade em ligar rede de citoqueratina das células, assim E4 é, preferencialmente, uma proteína citoplasmática (KHAN et al., 2011; ROBERTS et al., 1994). Porém, estudos demonstraram a presença de E1^{E4} interagindo a mitocôndrias, apesar de nenhuma sequência MSL ter sido identificada. Sugere-se que após essa interação, E1^{E4} induz a separação das mitocôndrias aos microtúbulos, permitindo a formação de clusters mitocondriais na região perinuclear, seguido de redução do potencial de membrana mitocondrial e consequente apoptose (RAJ et al., 2004).

Já E5 é uma pequena proteína de membranas hidrofóbicas predominantemente encontrada no retículo endoplasmático, complexo de Golgi e membrana nuclear das células hospedeiras (OETKE et al., 2000). Sua porção N-terminal é restrita ao lúmen do retículo ou núcleo, enquanto sua porção C-terminal fica exposta no citoplasma e medeia interações entre as proteínas internas e do citoplasma (KRAWCZYK et al., 2011; KRAWCZYK et al., 2010; SUPRYNOWICZ et al., 2008).

Estudos demonstram que E6 do HPV16, em linhagens de células de carcinoma humano, pode ser encontrada na região perinuclear do citoplasma em células SiHa

(DANIELS; SANDERS; MAITLAND, 1998), e no citoplasma, colocalizando com p53, em células CaSki (LIANG et al., 1993). Já em células COS1, transfectada por E6 do HPV16 e superexpressando a proteína, E6 demonstrou-se essencialmente encontrada no núcleo (SCHWALBACH et al., 2000). Em células humanas transfectadas por HPV18 E6, sua distribuição foi uniforme pelo núcleo e citoplasma (GUCCIONE et al., 2002), porém estudos mais recentes, demonstraram que uma ampla gama de tipos diferentes de HPV expressando E6 de forma transiente, tanto HPVs de alto-risco como HPVs de baixo-risco, foi encontrada distribuída de forma homogênea tanto no núcleo como no citoplasma das mesmas células (MESPLEDE et al., 2012).

A análise da sequência da proteína E6 identificou que um aminoácido cisteína na posição 66 (Cys-66), mas não Cys-166, seria essencial para sua localização intranuclear (KANDA et al., 1991). Entretanto, estudos posteriores demonstraram que na porção C-terminal de E6 do HPV16, entre os resíduos 120 e 151, abrigava uma região NLS, e que sua deleção inibia a marcação intranuclear dessas proteínas (SHERMAN; SCHLEGEL, 1996).

Essa disparidade encontrada na localização intracelular de E6 em diferentes tipos celulares deve-se aos diferentes níveis de expressão da proteína endógena e a diferentes tipos de anticorpos e técnicas utilizadas na sua identificação. E6 também foi descrita como sendo encontrada em baixos níveis colocalizando com ribossomos no citoplasma (MASSON et al., 2003).

Diversos autores descrevem a localização intracelular de E6 como um processo altamente controlado, resultante da inibição da via de degradação proteossomal, que induz a relocação das proteínas para o núcleo em um curto período de tempo. Sugerindo que a importação de E6 para o núcleo se dê de forma ativa (GUCCIONE et al., 2002), o que sugere que E6 seja uma proteína altamente sofisticada, sendo deslocada do citoplasma para o núcleo e vice-versa (MASSON et al., 2003).

Já a oncoproteína E7 é demonstrada como uma parte integral de um complexo de proteínas dispersos no citoplasma e núcleo com múltiplas funções bioquímicas na desregulação de vias necessárias ao potencial oncogênico do vírus (DREIER et al., 2011).

Diversos estudos baseados na técnica de imunofluorescência indicam que E7 do HPV16 é predominantemente nuclear (GREENFIELD et al., 1991; GUCCIONE et al., 2002). Entretanto, estudos utilizando análises em microscopia confocal demonstrou microestruturas de E7 localizadas no citoplasma e compartimento nuclear em células CaSki. Porém foi demonstrado que a localização subcelular do E7 endógeno varia durante o ciclo celular, pois a

observação de células na intérfase mostrou marcação predominantemente difusa no citoplasma, formando uma estrutura em forma de anel, circundando o núcleo, e fraca presença no núcleo celular. Já estudos em células com superexpressão transiente de E7 demonstraram que muitas das células, com E7 predominantemente citoplasmática, encontravam-se na fase de transição da fase citocinese/G1, no início da fase G1, enquanto que a grande maioria das células em interfase, demonstraram E7 predominantemente nuclear (DREIER et al., 2011).

1.6 Interação de proteínas virais e mitocôndria

As mitocôndrias estão envolvidas em uma ampla variedade de processos celulares como produção de ATP, homeostase de cálcio, proliferação celular, apoptose, síntese de aminoácidos, nucleotídeos e lipídeos. A distribuição, forma e funções dessa organela são reguladas por estímulos intrínsecos e extrínsecos, como, em alguns casos, a presença de determinados vírus (OHTA; NISHIYAMA, 2011).

Figura 7 - Esquema representativo da mitocôndria e suas principais estruturas.

Fonte: Adaptado de (CONSERVAPEDIA, 2012).

Nos últimos anos têm se tornado aparente o número de proteínas virais expressas que tem a habilidade de se localizar nas mitocôndrias e de regular as vias apoptóticas, positiva ou negativamente, através de alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial.

Tal relação já foi descrita para as proteínas Vpr do HIV – vírus da imunodeficiência humana adquirida (JACOTOT et al., 2001), p13^{II} do HTLV-1 – vírus T-linfotrófico humano (D'AGOSTINO et al., 2005), proteína X do HBV – vírus da hepatite B (TAKADA et al., 1999), PB1 ORF 2 do vírus influenza (GIBBS et al., 2003), F1L do vírus da varíola (WASILENKO et al., 2005), entre outros. Essas proteínas alvejam as mitocôndrias e sua inserção por entre as membranas mitocondriais pode ocorrer pelos canais de ânions voltagem-dependente (VDAC), a ANT (“adenine nucleotide translocator”), e proteínas da família Bcl-2. Esses últimos são os maiores reguladores da permeabilidade da membrana mitocondrial e são conhecidos por interagir com inúmeras proteínas virais (BANADYGA et al., 2011; ILKOW; GOPING; HOBMAN, 2011; SAINSKI et al., 2011), inclusive com E6 do HPV (UNDERBRINK et al., 2008).

VDAC é normalmente responsável pela difusão passiva de metabólitos como ATP, ADP, NAD(H) ou NADP(H) entre o espaço intermembranas mitocondriais e o citosol, por isso exerce o controle da atividade das mitocôndrias e é crucial no mecanismo de apoptose. ANT normalmente é responsável pelo antiporte de ATP e ADP na membrana interna da mitocôndria, interage também com VDAC e outras proteínas formando o PTPC (“Permeability transition pore complex”) nos locais de contato entre as membranas interna e externa mitocondrial, mediando a permeabilização dessas, intumescimento osmótico da matriz e consequentemente a ruptura seletiva da membrana externa. Devido à importância dessas estruturas na manutenção da homeostase da mitocôndria, e consequentemente das células, parece ser evidente a importância da atuação das proteínas virais sobre as mesmas (BOYA et al., 2003).

1.7 Oncogênese *versus* apoptose

Apoptose é um fenômeno de morte celular programada que contribui para a manutenção da homeostase de um organismo, através da eliminação de células com danos, mutações, em senescência ou infectadas por vírus, reconhece células com potencial oncogênico, selecionando-as, e regula o número de células evitando a “superpopulação” durante seu desenvolvimento (LEVERRIER et al., 2007).

Há duas vias para o início de apoptose: indução de receptores de membrana, ativando e desencadeando a cascata de caspases, e mais tarde, ocorre a permeabilização da membrana mitocondrial (MMP), conhecido como mecanismos extrínsecos; ou através de sinais de morte que atuam diretamente nas mitocôndrias, via intrínseca, levando a MMP e em seguida, as caspases são ativadas e levam a célula à morte (BOYA et al., 2004).

A apoptose é caracterizada pelas alterações morfológicas que promove nas células, sendo específicas, e coordenadas e diferenciadas da necrose (Figura 7). De modo geral, a apoptose induz retração da célula que causa perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas; as organelas mantêm a sua morfologia, com exceção, em alguns casos, das mitocôndrias, que podem apresentar ruptura da membrana externa; a cromatina sofre condensação e se concentra junto à membrana nuclear, que se mantém intacta. A seguir, a membrana celular forma projeções (“blebs”) e o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos pela membrana nuclear. Essas projeções da membrana celular aumentam em número e tamanho e rompem, originando os corpos apoptóticos, que são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos sem causar processo inflamatório (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004).

Os diferentes sinais indutores de apoptose são detectados pelas mitocôndrias, onde ocorre um desacoplamento da cadeia respiratória e conseqüente liberação de citocromo c e proteínas ativadoras da apoptose para o citosol. Quando no citosol, o citocromo c forma um complexo com a APAF-1 (fator de ativação de protease associada a apoptose) e a pró-caspase-9, o chamado apoptossomo, que promove a clivagem da pró-caspase-9, liberando a caspase-9 ativa (Figura 8). Uma vez ativada, a caspase-9 ativa a caspase-3 ocasionando a apoptose (GUPTA, 2003).

Figura 8 - Características morfológicas entre a apoptose e necrose

Apoptose mostrada a direita, com a formação dos corpos apoptóticos e indução de fagocitos, enquanto a necrose, a esquerda induz a digestão enzimática e perda de componentes celulares para o ambiente externo.

Fonte: Adaptado de (ADNAN, 2012).

Embora o câncer exiba características muito heterogêneas, a oncogênese se manifesta principalmente devido a deficiência de quatro diferentes vias: desregulação do ciclo celular, diminuição das vias de diferenciação, diminuição do reparo do DNA e certa resistência a apoptose (MARIANI, 2003).

Como observado nos itens anteriores, o HPV desenvolveu eficientes estratégias para modular a apoptose através da interação das oncoproteínas E6 e E7 com importantes alvos celulares durante a infecção. O processo pelo qual o HPV atua, induzindo a oncogênese e mantendo a progressão tumoral, constitui um modelo excepcional para o entendimento do desenvolvimento de muitos outros tipos de cânceres humanos, permitindo a identificação de muitas vias de sinalização envolvidas na progressão maligna, por atuar em diversas vias de maneiras distintas, mas sempre culminando para o desenvolvimento do tumor.

Figura 9 - Vias Apoptóticas. A apoptose pode ocorrer através de 2 vias diferentes.

A sinalização ativa caspase 8, seguida pela caspase 3, resultando no início da via apoptótica. A via intrínseca, ou mitocondrial, é ativada por estresse celular, sendo regulada pelas proteínas da família Bcl-2. Acúmulo de Bax ou Bak na membrana mitocondrial externa resulta numa alteração conformacional, permitindo sua inserção na membrana e a formação de poros. Proteínas como a citocromo c são liberadas e se ligam a APAF1 e com a caspase 9, formando o apoptossomo. Isto resulta na ativação de mais caspase 3 e início da morte celular. Fonte: Qiagen Inc., 2011.

Portanto, o desenvolvimento dos cânceres associados ao HPV envolve a ação de múltiplas vias coordenadas pelas oncoproteínas de HPVs de alto risco, onde cada via tem distintas funções na progressão maligna. As proteínas do HPV degradam ou interagem de forma a bloquear inúmeras vias de sinalização celular para manutenção das células infectadas no estado proliferativo, a fim de facilitar a replicação viral e persistência da infecção. O melhor entendimento dessas várias vias utilizadas e manipuladas pelo HPV auxilia e permite oportunos estudos para o desenvolvimento de terapias contra esses devastadores tipos de cânceres.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Estudar a localização intracelular das oncoproteínas E6 e E7 do HPV, através da análise de suas expressões gênicas e determinação de possíveis alvos celulares associados, em células naturalmente infectadas por HPV16 e HPV18, devido à relevância de ambas no desenvolvimento de câncer nos indivíduos infectados pelos tipos virais de alto risco.

2.2 Objetivos específicos

- Detectar alvos celulares das oncoproteínas E6 e E7, em células naturalmente infectadas, transformadas e imortalizadas por HPV16 e HPV18, utilizando como controles células não transformadas por HPV, porém, transfectadas com vetores de expressão contendo os oncogenes virais E6 e E7, através de métodos ultraestruturais imunocitoquímicos, imunofluorescência, fracionamento celular e western blotting;
- contribuir com novos dados sobre as interações patógeno-célula hospedeira do HPV, o principal responsável pelo câncer anogenital em humanos;
- avaliar os alvos celulares das oncoproteínas virais como potenciais alvos terapêuticos estratégicos para o desenvolvimento de novas vacinas profiláticas e terapêuticas contra os cânceres associados ao HPV em humanos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultivo Celular

3.1.1 Linhagens celulares

- HEK 293T: linhagem celular com origem em células epiteliais de rim humano, expressa constitutivamente o antígeno “large T” do Simian vírus 40 (SV-40). Além disso, é altamente transfectável;
- HeLa: linhagem celular originada de adenocarcinoma cervical humano, transformadas por HPV18;
- SiHa: originada de carcinoma cervical de células escamosas humanas, transformadas pelo HPV16;
- CaSki: originada de carcinoma epidermóide cervical, contém sequências do DNA do HPV16 e HPV18.

As linhagens celulares acima descritas foram adquiridas da ATCC (“The Global Bioresource Center”), com recursos obtidos da FAPESP.

- *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 α : linhagem que permite manipulações genéticas, como propagação e amplificação de DNAs plasmidiais e clonagem de genes.

A linhagem bacteriana acima foi gentilmente cedida pela Profa. Dra. Itamar Romano Garcia Ruiz, Instituto Butantan – SP/Brasil.

3.1.2 Cultivos celulares

As linhagens celulares foram cultivadas a 37 °C em garrafas ou placas plásticas descartáveis estéreis (TPP[®] Techno Plastic Products AG, Zollstrasse, Trasadingen, Suíça) contendo meio DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco, Cultilab) suplementado com soro fetal bovino 10% (SFB, Cultilab, Campinas, São Paulo, Brasil), mantidas em atmosfera úmida, contendo 5% de CO₂ até atingirem de 50-80% de confluência. Em seguida, as células foram lavadas com PBS (solução salina tamponada com fosfato), tripsinizadas (Solução Tripsina/EDTA, Cultilab) e ressuspensas em DMEM com SFB 10%. Então as

células foram homogeneizadas, com o cuidado para evitar formação de bolhas, e contadas para diluições em repiques celulares e armazenamento.

Os estoques celulares foram mantidos no meio de cultivo contendo SFB 10% e DMSO 10% (dimetilsulfóxido), em tanque de nitrogênio líquido a -192 °C.

A *E. coli* foi cultivada em meio LB líquido composto por triptona a 1%, extrato de levedura a 0,5%, cloreto de sódio (NaCl) a 0,5%, a 37 °C, mantido sob agitação de 250 rpm, para amplificação dos vetores pLXSN/E6 e pLXSN/E7, com a finalidade de se obter colônias viáveis. Para seleção de colônias, as bactérias foram cultivadas em meio LB contendo ágar a 1,5%. Os clones de *E. coli* foram armazenados em meio LB contendo glicerol 20%, a -80 °C.

3.2 Produção de oncoproteínas do HPV16

3.2.1 Obtenção dos vetores de expressão gênica de E6 e E7

Os vetores pLXSN/E6 e pLXSN/E7 humanizados, expressando os genes completos *E6* e *E7* do HPV16, foram gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Denise A. Galloway (Fred Hutchinson Cancer Research Center, University of Washington, Seattle, USA).

O pLXSN (Clontech laboratories) é um vetor retroviral que contém elementos derivados do vírus Moloney Murine Leukemia (MoMuLV) e vírus Moloney Murine Sarcoma (MoMuSV). Em sua porção 5' LTR ("Long terminal repeats") é encontrado o promotor que controla a expressão dos genes de interesse, já o promotor SV40 controla a expressão do gene que confere resistência a neomicina, permitindo a seleção por antibióticos em células eucariontes. O vetor contém ainda uma origem de replicação de bactérias *E. coli*, adquirido por COL E1 e o gene de resistência a ampicilina, para sua seleção em bactérias.

Os fragmentos de DNA contendo os genes *E6* ou *E7* foram isolados usando as enzimas de restrição apropriadas e digeridas por exonuclease III. A transcrição dos genes de HPV foram direcionados para o promotor MoMuLV (HALBERT; DEMERS; GALLOWAY, 1991).

3.2.2 Preparação de bactérias competentes

Os vetores obtidos foram propagados em *E. Coli* DH5- α . A indução da competência foi realizada segundo protocolo estabelecido por Sambrook e cols. (2001), onde bactérias

crescidas em meio LB até a metade da fase exponencial ($D.O_{600nm} = 0,6$) foram incubadas em solução de 0,1 M de $CaCl_2$ por 1 hora no gelo. Em seguida, as bactérias em solução foram centrifugadas a 5000 g por 10 minutos. As bactérias foram ressuspensas em solução 0,1 M de $CaCl_2$ acrescido de 10% de glicerol (m/v). Aliquotas de 200 μ L foram congeladas a $-80^\circ C$ até sua utilização.

3.2.3 Transformação de bactérias competentes

Por choque térmico foram transformadas as bactérias competentes, descritas no item acima, pelos plasmídeos de interesse (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Uma mistura de 10 μ L de DNA plasmidial e bactérias quimiocompetentes foi incubada por 30 minutos no gelo, submetida a um choque térmico por 2 minutos a $42^\circ C$ e incubada novamente no gelo durante 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 350 μ L de meio LB, sendo a mistura incubada por 90 minutos a $37^\circ C$. A mistura foi semeada em placas contendo meio LB-ágar com 100 μ g/ml de ampicilina e estas incubadas a $37^\circ C$ por 18 horas.

3.2.4 Seleção de clones recombinantes

Os clones positivos foram selecionados e inoculados em meio líquido LB na presença de ampicilina a $37^\circ C$, por 18 horas e sob agitação de 250 rpm. Foi centrifugada uma alíquota de 400 μ L de cada cultura. Ao precipitado bacteriano foram acrescidos 100 μ L de tampão *Ficoll dye* 2x e 38 μ L da mistura fenol-cloroformio 1:1, seguido por 30 segundos de agitação no vórtex e 2 minutos de centrifugação a 13.000 rpm. Foi aplicado ao gel de agarose 1% uma fração de 20 μ L do sobrenadante contendo 0,5 g/L de brometo de etídio, em tampão TAE 1X.

3.2.5 Extração de DNA plasmidial

Os clones positivos de *E.coli* DH5 α , resistentes à ampicilina, foram inoculados em 3 ml de meio LB líquido contendo 100 μ g/ml de ampicilina a $37^\circ C$, por 18 horas e sob agitação de 250 rpm. Cada cultura foi centrifugada a $25^\circ C$, por 1 minuto a 10000 rpm para precipitar as bactérias íntegras. Para a purificação do DNA plasmidial, foi utilizado o kit *NucleoSpin® Plasmid* (Macherey Nagel Inc., Duren, Duren, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA purificado foi armazenado a $-20^\circ C$.

3.2.6 Transfecção celular

As transfecções transientes das células da linhagem HEK 293T foram realizadas por lipofecção conforme especificações do fabricante: um dia antes da transfecção, $1,1 \times 10^4$ células/mL foram plaqueadas na presença de DMEM suplementado com 10% SFB sem antibióticos, para adquirir a confluência adequada no momento da transfecção. Em um tubo estéril foram adicionados meio DMEM sem soro e sem antibióticos, o reagente de transfecção *GeneJuice[®] Transfection Reagents* (EMD Biosciences/Merck, Darmstadt, Darmstadt, Alemanha) e misturados por vórtex, sendo incubado por 5 minutos a temperatura ambiente. À mistura foi adicionado o DNA plasmideal de interesse, na proporção adequada, homogeneizado gentilmente e incubado por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, a mistura Meio/GeneJuice/DNA foi adicionada às células com meio de cultura completo, e incubado em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Após 8 horas foi realizada a troca do meio de cultura, agora, meio completo contendo antibiótico e SBF a 10%. A incubação seguiu até aproximadamente 48 horas.

3.2.7 Extratos celulares

As células HEK 293T, após a transfecção transiente com os vetores pLXSN/E6 e pLXSN/E7, além das células HeLa, SiHa e CaSki cresceram em meio DMEM contendo 10% SFB e na ausência de antibióticos. Ao adquirir a confluência desejada, a cultura celular foi lavada repetidas vezes com PBS para remover todo o SFB, foi coletada mecanicamente e centrifugada a 1500 rpm por 10 minutos. O precipitado celular foi ressuspensionado em PBS, seguido de 5 ciclos de agitação no vórtex e incubação no gelo por 1 minuto cada. Os lisados celulares foram clarificados por centrifugação a 2000 rpm por 10 minutos e armazenados a – 20 °C até o momento da análise.

3.3 Expressão e caracterização das oncoproteínas E6 e E7

3.3.1 Expressão intracelular de E6 e E7 em células HEK 293T

Análise da expressão intracelular de E6 e E7 foram realizadas através de ensaios de imunofluorescência como descrito a seguir (CIANCIARULLO et al., 2007, 2009, 2010). As

células foram cultivadas sobre lamínulas redondas de 13 mm de diâmetro em placas de cultura (TPP®) de 12 poços. As linhagens facilmente aderentes foram cultivadas diretamente sobre as lamínulas, enquanto que as células HEK 293T foram cultivadas em lamínulas pré-tratadas com poli-L-lisina, como descrito na seção 3.1.2, e transfectadas conforme o item 3.2.6. Após esta etapa, as células foram fixadas em paraformaldeído (PFA) a 2% em PBS, por 1 hora a 4 °C. Em seguida, lavadas duas vezes com PBS para remoção do excesso de fixador e incubadas em PBS contendo 5% de BSA, durante 1 hora, em câmara úmida a temperatura ambiente. Em seguida, as lamínulas foram lavadas 3 vezes com PBS com BSA a 1%, por 10 minutos. Para detectar a presença das oncoproteínas E6 e E7, as lamínulas foram incubadas com os anticorpos primários específicos anti-E6 ou anti-E7, respectivamente diluídos a 5 µg/mL e 2,5 µg/mL em PBS contendo 0,01% de Tween 20 (Sigma Aldrich®) e 0,5% BSA, durante 2 horas, em câmara úmida, a temperatura ambiente. Assim, foram lavadas três vezes em PBS, durante 10 minutos cada, para seguir a incubação com o anticorpo secundário produzido em cabra anti- IgG de camundongo complexado ao fluorocromo Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes®, Invitrogen™, Carlsbad, Califórnia, U.S.A.), diluído 1:500 em PBS contendo 0,01% de Tween 20 e 1,5% BSA, durante 1 hora, em câmara úmida, a temperatura ambiente, protegido da luz. As células foram novamente lavadas três vezes em PBS, durante 10 minutos cada. Após duas lavagens com PBS, por 10 minutos cada, as lamínulas foram montadas em lâmina com 3 µl de Mowiol. As amostras foram mantidas a 4 °C para análise em MCVL (Microscópio Confocal de Varredura a Laser) LSM 510 Meta Zeiss com o software LSM 5 Image.

3.3.2 Fracionamento celular e isolamento da fração mitocondrial

5 X 10⁶ células da linhagem HeLa, SiHa e CaSki, além de HEK 293T e HEK 293T/E6 e HEK 293T/E7 foram processadas com o kit Qproteome™ Mitochondria Isolation (Qiagen, Hilden, Mettmann, Alemanha) conforme especificações do fabricante, para a obtenção de frações celulares e mitocôndrias isoladas com alto grau de pureza. O kit separa, além da fração mitocondrial das células, proteínas citoplasmáticas, frações contendo o núcleo e fração microssomal das células. Todas essas frações foram recuperadas e analisadas através de western blotting para a detectar a presença de proteínas E6 e E7. E as mitocôndrias isoladas também foram utilizadas para análise ultraestrutural e imunocitoquímica em MET (microscópio eletrônico de transmissão).

3.3.3 Estimativa da concentração de proteínas

Uma pequena alíquota de todo produto obtido no passo 3.3.2 foi utilizado para estimar a concentração de proteínas totais através do método de Bradford (BRADFORD, 1975). Onde, cada amostra foi diluída 50 vezes e 20 µL foram aplicadas em uma placa de microtitulação. Em seguida, adicionou-se 200 µL de reativo de Bradford para cada amostras, incubou-se por 5 minutos e as leituras foram realizadas a 595 nm em leitor multiskan (SunriseTM – Tecan, Seestrasse, Männedorf, Suíça). Foi utilizada uma curva padrão com soluções de diferentes concentrações conhecidas de BSA (Albumina de soro bovino).

3.3.4 Análise da localização intracelular de E6 e E7 por western blotting

A partir das amostras obtidas como descrito na seção 3.3.2 e estimadas as concentrações de proteínas totais como descrito acima (3.3.3), as amostras foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% usando dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE 12%), sob condições desnaturantes, onde cada amostra foi ajustada a uma concentração de 5 µg por poço da eletroforese. Em seguida, foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose (Trans-Blot Transfer Membrane 0,45 µm – BioRad, Benicia, Califórnia, U.S.A.), em uma cuba de transferência (Trans-Blot SD, Semi-Dry Transfer Cell - BioRad) em solução tampão de transferência formada por glicina 250 mM, SDS 1% e metanol 20% em tampão Tris-HCL 25 mM, pH 8,3, sob amperagem constante de 400 mA, por 30 minutos.

As membranas foram então coradas com solução Ponceau (0,5% ponceau e ácido acético a 1%) para confirmar a transferência e marcar o padrão de peso molecular BenchMarkTM Protein Lader (InvitrogenTM). Então, as membranas contendo as proteínas foram bloqueadas com 0,05% PBS-T (Tween 20) suplementado com 5% de leite desnatado, “overnight” a 4 °C. Lavadas duas vezes em PBS – Tween 20 a 0,1%, por 10 minutos. Em seguida, foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com o anticorpo monoclonal anti-HPV18/16 E6 (Calbiochem[®]/Merck) ou anti-HPV16/18 E7 (Oncogene/Merck) específicos, diluídos conforme especificações do fabricante em PBS-T com 5% de leite desnatado. As membranas foram lavadas três vezes em PBS-T, por 10 minutos cada, sob agitação e incubadas com anti-IgG (imunoglobulina) de camundongo, gerado em cabra, conjugada à peroxidase (Sigma Aldrich[®], Saint Louis, Missouri, U.S.A.) diluído em PBS-T com 5% de leite desnatado por 1 hora em temperatura ambiente. As membranas foram

novamente lavadas três vezes por 10 minutos cada. Utilizando reagentes para detecção de peroxidase por quimioluminescência ECL utilizando o kit Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce, Rockford, Illinois, U.S.A.) sendo então, exposta ao filme Amersham Hyperfilm™ ECL (GE Healthcare, Hatfield, Hertfordshire, Reino Unido). Como controle negativo foram utilizadas as linhagens celulares não-tranfectadas HEK 293T e transfectada com vetor vazio.

3.3.5 Análise da integridade da membrana mitocondrial por western blotting

As amostras de frações mitocondriais obtidas como descrito acima, item 3.3.2, foram analisadas por western blotting para avaliar a integridade da membrana mitocondrial após o processo de isolamento, para garantir a presença das oncoproteínas estudadas no interior daquela organela.

Para isso, foi utilizado kit de anticorpos monoclonais, MitoProfile® Mitochondrial Integrity WB Antibody Cocktail (ABCAM, Cambrigde, Cambridgeshire, Inglaterra), que avalia a integridade estrutural de mitocôndrias isoladas pela positividade de reação a cinco proteínas estruturais primárias: porinas, presentes na membrana externa da mitocôndria (39 KDa); citocromo c, encontrado no espaço intermembranas (12 KDa); complexo V α (55 KDa) e complexo III core 1 (49 KDa), membrana interna mitocondrial; e ciclofilina D (21 KDa), matrix mitocondrial.

Além disso, também foi utilizado o MitoProfile® Total OXPHOS Human WB Antibody Cocktail (MitoScience®) para detecção das proteínas no complexo: C-I NDUFB4 (NADH desidrogenase), C-II-30 (SDHB – succinato desidrogenase), C-III-Core 2 (UQCRC2 – ubiquinol citocromo c redutase), C-IV-II (citocromo c oxidase) e C-V-OSCP (anti-ATP5A).

3.3.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) para análise morfológica

As células das linhagens HeLa, SiHa, CaSki, HEK 293T transfectadas ou não transfectadas foram cultivadas para análise morfológica em MET como descrito por Cianciarullo et al., 2007, 2009, 2010. Para isso, 4 garrafas de cultura foram cultivadas de cada linhagem como descrito acima (3.1.2). Após 3 dias de cultivo, as células foram lavadas em solução PBS e tripsinizadas para sua obtenção. Em seguida, as células foram colhidas em tubos tipo Falcon de 15 mL e centrifugadas a 800 rpm, a 22 °C, por 5 minutos para formarem

um precipitado, onde foram lavados 3 vezes em PBS para remoção de resíduos de meio de cultura ou de células mortas. Então, as células foram fixadas em solução contendo tampão fosfato de sódio a 0,1M pH 7,2 onde foram adicionados 3,5% de sacarose e 2,5% de glutaraldeído, sendo incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. Depois as células foram lavadas 3 vezes em solução tampão fosfato de sódio a 0,1 M pH 7,2 contendo 3,5% de sacarose e centrifugadas a 800 rpm, a 22 °C por 5 minutos. As células foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato de sódio a 0,1 M e pH 7,2 acrescido de 3,5% de sacarose, incubou-se por 1 hora a temperatura ambiente em local protegido da luz, agitando-se ocasionalmente. Seguiu-se de uma lavagem em tampão fosfato de sódio a 0,1 M e pH 7,2 acrescido de 3,5% de sacarose, duas lavagens em solução salina a 0,85% e uma lavagem em água bidestilada por 10 minutos.

A contrastação em bloco de ácidos nucleicos foi realizada pela incubação das células em solução de acetato de uranila a 2% em água bidestilada por 2 horas a temperatura ambiente, seguida de 3 lavagens em água bidestilada, 5 minutos cada. Em seguida, iniciou-se a desidratação celular com banhos de etanol nas concentrações de 30%, 50%, 70% e 95% por 15 minutos a temperatura ambiente. Por fim, desidratação com etanol 100% por 30 minutos a temperatura ambiente. Logo, a solução de etanol 100% foi substituída por solução etanol 100% com acetona (proporção 1:1), seguido por incubação de 30 minutos, iniciando-se a pré-embebição da resina em solução de acetona-Epon (2:1) por 30 minutos, solução acetona com Epon (1:1) por 30 minutos e, solução acetona - Epon (1:2) por 18 horas a 4 °C.

A embebição foi realizada em resina Epon pura por aproximadamente 24 horas. Após o período de embebição, centrifugou-se por 30 minutos a 5000 rpm para a substituição da resina Epon pura, sendo mantida por 4 horas a temperatura ambiente.

A emblocagem foi realizada em cápsulas BEEM[®] número 3 e a polimerização ocorreu a 60 °C por 72 horas.

As amostras foram então para ultramicrotomia e os cortes ultrafinos colhidos em grades metálicas de cobre foram novamente contrastados com solução de acetato de uranila a 2%, 10 minutos. O exame das amostras ocorreu em MET Zeiss EM 109, operado a 80 kV.

3.3.7 Imunocitoquímica ultraestrutural

As células das linhagens HeLa, SiHa, CaSki, HEK 293T transfectadas pelos vetores pLXSN/E6 e pLXSN/E7 ou não transfectadas foram cultivadas para análise

imunocitoquímica ultraestrutural em MET. Para isso, 4 garrafas de cultura foram cultivadas de cada linhagem como descrito acima (3.1.2). Após 3 dias de cultivo, as células foram lavadas em solução PBS e tripsinizadas para sua coleta. Em seguida, a suspensão contendo as células foram colhidas em tubos tipo Falcon de 15 mL e centrifugadas a 800 rpm, a 22 °C, por 5 minutos, sendo lavadas 3 vezes em PBS para remoção de resíduos de meio de cultura ou de células mortas. Então, as células foram fixadas em solução contendo tampão fosfato de sódio a 0,1 M pH 7,2 acrescidos de 3,5% de sacarose, 4% de solução de paraformaldeído a 4% e 0,5% de glutaraldeído, sendo incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. Depois as células foram lavadas 3 vezes em solução tampão fosfato de sódio a 0,1 M pH 7,2 contendo 3,5% de sacarose e centrifugadas a 800 rpm, a 22 °C por 5 minutos. Lavadas em solução salina a 0,85% por 10 minutos, 2 vezes, para então iniciar-se o processo de desidratação.

A desidratação foi realizada com banhos sucessivos de solução etanol a 30%, 50%, 70% e 95% por 15 minutos cada a temperatura ambiente, em seguida, desidratação com etanol 100% por mais 15 minutos. A pré-embebição ocorreu em solução etanol 100% diluindo a resina LR Gold (Eletron Microscopy Science, Hatfield, Pensilvânia, U.S.A.) na proporção de 2:1, onde havia 2 porções de etanol, para 1 porção de resina. Incubação por 30 minutos a temperatura ambiente. Pré-embebição em solução etanol 100% e resina (proporção 1:1) e solução etanol 100% e resina (proporção 1:2) por 30 minutos a temperatura ambiente. A embebição ocorreu em resina LR Gold pura a 4 °C por aproximadamente 18 horas. Centrifugação a 2000 rpm por 10 minutos e troca de resina a cada 4 horas, totalizando 4 trocas de resina LR Gold em um dia.

Para a emblocagem foi adicionado o catalizador da resina LR Gold, o peróxido de benzoíla (proporção de 1:100 – g/mL). Polimerização a -20 °C por uma semana sobre luz UV.

As amostras então foram para a ultramicrotomia e, os cortes ultrafinos colhidos em grades metálicas de níquel foram utilizados para a imunomarcagem.

Para a imunomarcagem, os cortes ultrafinos foram primeiramente incubados com os anticorpos primários anti-E6 ou anti-E7 de HPV 16/18, diluídos conforme especificações do fabricante em PBS contendo 0,01% de Tween 20 e 0,5% BSA, durante 3 hora, em câmara úmida, a temperatura ambiente. Foram lavados em PBS contendo 1% de BSA, quatro vezes, durante 10 minutos cada, seguida da incubação com os anticorpos secundários anti- IgG de camundongo (Sigma-Aldrich®), complexados com partículas de ouro coloidal de 5 ou 10 nm diluído em PBS contendo 0,01% de Tween 20 e 1,5% BSA, durante 1 hora, em câmara úmida, a temperatura ambiente. Foram lavados em PBS contendo BSA a 1%, uma vez e em

salina a 0.85%, três vezes, durante 10 minutos cada, e em jato de água bidestilada, uma vez. Logo em seguida, foi realizada contração negativa com solução de acetato de uranila a 2% por 15 minutos. Após secarem naturalmente, as amostras foram examinadas em MET Zeiss EM 109, operado a 80 kV, do Laboratório de Genética do Instituto Butantan, ou em MET Zeiss LEO 906 E, operado a 80 kV, do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Butantan. As imagens foram capturadas pela Câmera Mega View III, utilizando os programas de captura de imagem ITEM, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, version ITEM_E_23082007.

3.4 Revelação e ampliação de filmes

3.4.1 Revelação

As imagens dos cortes ultrafinos realizadas em MET Zeiss EM 109 foram obtidos em filmes fotográficos revelados quimicamente com revelador D-19 e fixador F-5.

A revelação do negativo foi realizada em uma câmara escura sob luz de segurança vermelha, com ausência total de luz branca para proteger o filme. O filme fotografado foi retirado do recipiente usado para protegê-lo e enrolado em uma espiral do tanque de revelação, permitindo que a solução reveladora entre em contato por toda a sua extensão. Foi adicionado o revelador diluído 1:1 em água destilada, por 2 minutos e sob suave agitação. O negativo foi lavado rapidamente em água corrente. Imediatamente após, foi adicionada a solução fixadora por 15 minutos, sob suave agitação para eliminar bolhas de ar. O filme foi removido da espiral e mergulhado em uma cuba com água corrente por 30 minutos. Após secagem em temperatura ambiente, foram realizadas as ampliações fotográficas.

3.4.2 Ampliação

Os negativos foram ampliados em papel fotográfico, em câmara escura sob luz de segurança amarela. O negativo foi colocado em um ampliador fotográfico e ajustado o foco da imagem com o máximo de luz, abertura de 4,5 da lente de ampliação. Para a confecção da fotografia a luz foi diminuída até o ideal para cada negativo. Em seguida, o papel fotográfico foi exposto à luz do ampliador por alguns segundos e, logo após, mergulhado por completo em uma cuba contendo revelador concentrado até aparecer a imagem desejada. Com auxílio

de uma pinça, a fotografia foi transferida para outro recipiente contendo bloqueador (ácido acético 5%), por alguns segundos, e novamente transferida para uma nova cuba contendo fixador concentrado, por 15 minutos. As fotografias foram lavadas em água corrente por 30 minutos. Após a secagem em temperatura ambiente, as fotografias recebem as identificações e as barras de calibração dos respectivos aumentos, devidamente calculadas.

3.5 Análise da interação de E6

3.5.1 Coimunoprecipitação

As mitocôndrias obtidas como descrito no item 3.2 foram solubilizadas em tampão de lise (20 mM Tris-HCl pH 7,4, 50 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 10% (v/v) glicerol, 1 mM PMSF, coquetel inibidor de protease (Sigma- Aldrich[®]) e 0,5% digitonina) e incubadas no gelo por 15 minutos (YAMANO; TANAKA-YAMANO; ENDO, 2010). Em seguida, o lisado celular foi homogeneizado com os anticorpos monoclonais específicos anti-HPV18/16 E6 (Calbiochem[®]) – 2 µg - ou anti-HPV16/18 E7 (Oncogene) – diluição 1:10 – e incubados por 18 horas a 4 °C, sob agitação. E então, à solução antígeno-anticorpo foi adicionada a resina Sepharose[®]-proteína G (Sigma-Aldrich[®]), previamente preparada e equilibrada, e incubada por mais 1 hora a 4°C, sob agitação. Após esse período, a solução passou por uma centrifugação de 3.000 rpm por 10 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi armazenado como controle da reação de coimunoprecipitação e o precipitado foi lavado 5 vezes em tampão de lise mitocondrial por 10 minutos cada. As proteínas ligadas à resina foram então eluídas em tampão glicina-HCl pH 2,7 (100 mM Glicina), por 15 minutos a 4 °C, sob agitação. O eluído foi armazenado a 4°C até o momento de sua análise.

3.5.2 SDS-PAGE e Western blotting

As amostras resultantes da coimunoprecipitação foram analisadas por eletroferese SDS-PAGE e suas imagens foram analisadas pelo fotodocumentador L-Pix (Loccus Biotecnologia, Cotia, São Paulo, Brasil). Em seguida, western blotting foi realizado para detectar a presença das proteínas E6 e E7 e possíveis proteínas associadas que estivessem precipitado junto a elas.

A busca por determinadas proteínas foi sugerida para detecção por western blotting, como as proteínas Bax e Bak, utilizando anticorpos específicos contra tais proteínas. O mesmo protocolo descrito em 3.4 foi utilizado, apenas adequando os anticorpos primários e secundários específicos.

4 RESULTADOS

4.1 Análise ultraestrutural celular

As células HeLa é uma das linhagens celulares mais antigas e mais utilizadas na pesquisa científica. É derivada de células de adenocarcinoma cervical da paciente Henrietta Lacks, que eventualmente faleceu em função do estágio avançado de seu câncer cervical. Através da transferência horizontal de genes do HPV18 as células HeLa foram transformadas e assim, imortalizadas.

Linhagens de células SiHa foram estabelecidas de fragmentos de amostras de tecido de carcinoma cervical de células escamosos de uma paciente após cirurgia. Essa linhagem é reportada contendo genoma do HPV16 integrado, sendo de uma ou duas cópias por célula.

A partir de células em metástase de carcinoma de mesentério do intestino delgado humano foram estabelecidas a linhagem de células CaSki, que são caracterizadas por conter genomas do HPV16 e HPV18 integrados ao seu DNA.

Estudos de análise da transcrição de células SiHa e CaSki demonstraram que o maior transcrito viral em ambas linhagens celulares era composto principalmente pelas sequências derivadas de ORFs E6, E7 e E1 (BAKER et al., 1987).

Linhagem de células HEK 293 foi gerada no início da década de 70 pela transformação de células embrionárias de epitélio de rim humano normal com adenovírus. São muito utilizadas na pesquisa devido a extrema facilidade de trabalho e de simples cultivo e transfecção. Uma importante variante dessa linhagem são as células HEK 293T que expressam constitutivamente o antígeno “Large T” do Simian vírus 40 (SV40), que permite a replicação episomal do plasmídeo transfectado contendo a origem de replicação SV40, que permite a amplificação dos plasmídeos transfectados e expressão por longos períodos do produto do gene inserido.

É de extrema relevância ressaltar que as linhagens HEK 293 e HEK 293T não contém sequências de qualquer papilomavírus.

As linhagens celulares selecionadas para o presente estudo demonstraram fácil manipulação e rápido crescimento. O citoplasma claro em cultivo celular encontrou-se ultraestruturalmente organizado, com abundância de organelas celulares, sendo possível identificar um grande número de mitocôndrias, retículo endoplasmático e complexo de Golgi através da detecção de seu sistema de membranas e lisossomos eletrondensos. No núcleo

observou-se a eucromatina, região menos eletrondensa, típica de célula com elevada atividade sintética, a membrana nuclear bem evidente. Todas as membranas encontraram-se bem preservadas, definidas e íntegras, como pode ser observado na figura abaixo (Figura 10).

Figura 10 - Micrografia eletrônica de cortes ultrafinos de linhagens celulares pré-estabelecidas.

Processamento convencional para microscopia eletrônica de transmissão. Contrastação com acetato de uranila e citrato de chumbo. Lisossomo (l), mitocôndria (m), núcleo (N) e retículo endoplasmático (re). Em (a) células HeLa, (b) SiHa, (c) CaSki e (d) HEK 293T. MET Zeiss EM 109, operado em 80 kV. Aumento original de 4.000 vezes.

4.2 Expressão intracelular das oncoproteínas E6 e E7

Para avaliar a expressão intracelular das oncoproteínas E6 e E7 do HPV nas linhagens celulares pré-estabelecidas transformadas por HPV, foram realizados experimentos de imunofluorescência em células HeLa, SiHa e CaSki.

As oncoproteínas E6 e E7 foram bem reconhecidas pelos anticorpos específicos em todas as linhagens celulares estudadas. Apresentaram-se em formas de pontos distribuídos pelas células, como observado nas figuras abaixo resultantes de ensaios de imunofluorescência (Figuras 11 e 12).

Figura 11 - - Expressão intracelular da oncoproteína E6 de HPV.

Oncoproteína E6 detectadas pelo ensaio de imunofluorescência através do reconhecimento do anticorpo primário anti-E6 de HPV16/18 (Calbiochem®) e sua interação com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo, conjugado ao fluorocromo Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes®) (b). Em (a) canal de luz transmitida, (c) ácidos nucleicos marcados com Iodeto de propídio, e (d) a sobreposição das imagens (b) e (c). MCVL LSM 510 Meta Zeiss. Aumento: Objetiva C-Apocromática 63x /1.4 Óleo.

Figura 12 - Análise da expressão intracelular da oncoproteína E7 em diferentes linhagens celulares.

Expressão intracelular de E7 detectada por imunofluorescência pela associação do anticorpo primário anti-E7 de HPV16/18 (Oncogene®) e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo, conjugado ao Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes®) (b). Em (a) canal de luz transmitida e em (c) a sobreposição das imagens. MCVL LSM 510 Meta Zeiss. Aumento: Objetiva C-Apocromática 63x /1.4 Óleo.

Além da análise da expressão das oncoproteínas nas linhagens celulares naturalmente transformadas por HPV descritas acima, células HEK 293T foram transfectadas pelos vetores pLXSN/E6 ou pLXSN/E7 para o estudo e análise de sua expressão, a fim de avaliar se as oncoproteínas quando são expressas *in vitro* mantêm o padrão de expressão e localização. As imagens abaixo destacam a expressão de ambas proteínas de forma abundante e dispersas, em forma de pontos distribuídos por toda a célula. Pode-se observar também que a maioria das células apresentaram eficiência na transfecção, visto que grande parte das células visualizadas nas imagens de imunofluorescência, apresentam-se expressando a proteína heteróloga (Figura 13).

Figura 13 - Expressão de E6 e E7 em células HEK 293T transfectadas com os vetores recombinantes.

Expressão das proteínas do HPV16 em células HEK 293T transfectadas com o vetor pLXSN/E6 (primeira linha) ou pLXSN/E7 (segunda linha), detectadas por imunofluorescência através do reconhecimento do anticorpo primário e sua interação com anticorpo secundário, conjugado ao Alexa Fluor® 488 (Molecular Probes®) em verde (b). Em (a) canal de luz transmitida, em (c) marcação nuclear com iodeto de propídio (vermelho), e em (d) a sobreposição das imagens (b) e (c). MCVL LSM 510 Meta Zeiss. Aumento: Objetiva C-Apocromática 63x /1.4 Óleo.

Analisando superficialmente as imagens acima, podemos sugerir que a expressão de E6 é mais eficiente, ou mais abundante, quando comparada com a expressão de E7, pela presença em maiores quantidades da proteína em estudo e pela intensidade de marcação ao compararmos ambas as imagens.

O iodeto de propídio é uma molécula fluorescente que atua como agente intercalante às moléculas de DNA, porém também é capaz de reconhecer e se ligar ao RNA (DEITCH; LAW; DEVERE WHITE, 1982). Ensaios realizados com células HeLa onde foram marcadas as oncoproteínas E6 ou E7 de HPV com anticorpos específicos e iodeto de propídio, demonstrou com possível colocalização entre E6 e a marcação de ácidos nucleicos dispersos no citoplasma da célula, podendo sugerir a interação entre E6 e mtDNA (DNA mitocondrial), como observado na figura abaixo. O mesmo fenômeno não foi observado entre as marcações de E7 e ácidos nucleicos.

Figura 14 – Expressão intracelular de E6 e E7 em células HeLa.

Imunofluorescência indireta em células HeLa onde é possível observar a diferença entre as marcações e possível colocalização entre E6 e ácidos nucleicos citoplasmáticos (RNA e mtDNA) – em (a) e E7, em (d). A colocalização se torna evidente pela sobreposição das colorações resultando em tons alaranjados facilmente observados em (a), e não evidentes em (d). Foram utilizados anticorpos primários específicos anti-E6 (b) e anti-E7 (e) – verde, iodeto de propídio em (c) e (f) - vermelho. MCVL LSM 510 Meta Zeiss. Aumento: Objetiva C-Apocromática 63x /1.4 Óleo.

Ensaio controle também foram realizados para verificar a ausência de possíveis ligações inespecíficas entre os anticorpos utilizados e as células em análise, como pode ser observado na figura 15. Foram realizadas leituras com diferentes lasers contidos no microscópio confocal MCVL LSM 510 Meta Zeiss e nenhuma reação foi observada.

Figura 15 - Imagens de ensaios controle negativos.

Ensaio controle negativo demonstrando que não houveram ligações inespecíficas entre os anticorpos utilizados e as células e preparações em estudo. (a) Células HeLa, (b) SiHa, (c) CaSki e (d) HEK 293T. MCVL LSM 510 Meta Zeiss. Aumento: Objetiva C-Apocromática 63x /1.4 Óleo.

4.3 Expressão intracelular de E6 analisada por MET

Objetivando novas informações e mais detalhes sobre a expressão intracelular de oncoproteína E6, foram realizadas análises das linhagens celulares HeLa, SiHa e CaSki, sendo processadas e preparadas para imunocitoquímica ultraestrutural contra os anticorpos específicos anti-E6.

Os resultados obtidos evidenciaram a presença de E6 de maneira semelhante, independente da linhagem celular analisada, demonstrando uma ampla distribuição intracelular que pode ser observada pela presença das partículas de ouro coloidal. A oncoproteína E6 foi localizada no núcleo, dispersa pelo citoplasma celular e interessante e, sendo mostrado pela primeira vez, no interior de mitocôndrias (Figuras 16 – 18).

Figura 16 - Micrografia eletrônica de corte ultrafino de célula HeLa.

Células HeLa que apresentam o DNA do HPV18 imunomarcada com anticorpo primário anti-E6 de HPV16/18 (Calbiochem®), detectado pelo anticorpo secundário anti-IgG de camundongo complexado com partículas de ouro coloidal de 10 nm (Sigma®), conforme evidenciado pelas setas pretas. Observa-se a detecção da oncoproteína E6 difusamente distribuída pelo citoplasma celular e sua localização no interior das mitocôndrias (m). MET Zeiss EM 109, operado em 80 kV.

Figura 17 - Mitocôndrias isoladas de células HeLa imunomarcadas com anti-E6.

Corte ultrafino de mitocôndrias isoladas de células HeLa imunomarcadas com anticorpo primário específico anti-E6, são evidenciados pelas setas em vermelho. Observam-se a oncoproteína E6 marcada no interior das mitocôndrias (m) e algumas partículas associadas aos debris celulares provenientes do processo de isolamento mitocondrial. MET Zeiss LEO 906 E, operado em 80 kV.

Figura 18 - Células SiHa imunomarcadas com anti-E6.

Células SiHa processadas para MET e imunomarcadas com anticorpo primário anti-E6 HPV16/18 (Calbiochem®) e seu respectivo anticorpo secundário, anti-IgG de camundongo complexado com partículas de ouro coloidal de 10 nm (Sigma-Aldrich®), evidenciados pelas setas em vermelho que destacam a presença da proteína em estudo localizadas no interior do núcleo celular (N), dispersos pelo citoplasma e no interior de mitocôndrias (m). MET Zeiss LEO 906 E, operado em 80 kV.

4.4 Análise em MET para estudo da expressão intracelular de E7

Para analisar e evidenciar a localização intracelular da oncoproteína E7 em células HeLa, SiHa e CaSki foram realizados ensaios de imunocitoquímica ultraestrutural em amostras preparadas e processadas para MET. Como já descrito na literatura, E7 pode ser encontrada distribuída por todo o citoplasma celular, além de porções no núcleo. Diferentemente de E6, E7 não aparece interagindo diretamente com as mitocôndrias, como pode ser observado na figura abaixo (Figuras 19).

Figura 19 - Microscopia eletrônica de célula HeLa imunomarcada com anti-E7.

Microscopia eletrônica de corte ultrafino de célula HeLa imunomarcada com anticorpo primário anti-E7 (Oncogene[®]) detectado pelo complexo formado pelo anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com partículas de ouro coloidal de 10 nm (Sigma[®]), conforme evidenciado pelas setas. Observa-se E7 dispersa no citoplasma e no núcleo celular (N), porém não ocorre nenhuma associação com as mitocôndrias (m). MET Zeiss EM 109, operado em 80 kV.

4.5 Estudo da expressão intracelular de E6 e E7 em células transfectadas por plasmídeos recombinantes

Com a finalidade de estudar expressão intracelular e a localização das proteínas recombinantes expressas após transfecção celular, além de comparar aos resultados obtidos após análises das células naturalmente transformadas por HPV, foram inseridas nas células HEK 293T os vetores de expressão pLXSN/E6 ou pLXSN/E7 e preparadas e processadas para MET como descrito anteriormente.

Figura 20 - Células HEK 293T lipotransfectadas com o vetor pLXSN/E6 e imunomarcado com anti-E6.

Células lipotransfectadas com o vetor pLXSN/E6, expressando E6, em corte ultrafino imunomarcado com anticorpo anti-E6 de HPV16/18 (Calbiochem®) detectado pelo anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com partículas de ouro coloidal de 10 nm (Sigma®), conforme evidenciado pelas setas em vermelho. A oncoproteína E6 encontra-se dispersa pelo citoplasma celular, no núcleo (N) e no interior das mitocôndrias (m). MET Zeiss EM LEO 906 E, operado em 80 kV.

Figura 21- Lipotransfecção de células com vetor pLXSN/E7 imunomarcado com anti-E7.

Lipotransfecção de células HEK 293T com vetor de expressão contendo o gene completo *E7* em corte ultrafino imunomarcado com anticorpo anti-E7 HPV16/18 (Calbiochem®) detectado pelo anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com partículas de ouro coloidal de 10 nm (Sigma®), conforme evidenciado pelas setas em vermelho. A oncoproteína E7 encontra-se dispersa pelo citoplasma celular, no núcleo (N) e não foi observada no interior das mitocôndrias (m). MET Zeiss EM LEO 906 E, operado em 80 kV.

4.6 Colocalização de E6 com mitocôndrias

A fim de confirmar uma possível interação da oncoproteína E6 em estudo com as mitocôndrias, devido seu papel fundamental durante o processo de apoptose, células transformadas por HPV HeLa, SiHa e CaSki, além de células HEK 293T transfectadas com o vetor pLXSN/E6 foram analisadas através de imunofluorescência, onde foram marcadas as proteínas de interesse com anticorpos específicos anti-E6 e, para evidenciar as mitocôndrias foi utilizado MitoTracker® Deep Red FM, um marcador mitocondrial específico.

É possível observar colocalização parcial da oncoproteína E6 com mitocôndrias, pelos tons alaranjados evidenciado pela presença de ambas as marcações (Figuras 22).

Figura 22 - Linhagens celulares evidenciando a colocalização entre mitocôndrias e E6.

Diferentes linhagens celulares evidenciando a colocalização de mitocôndrias e oncoproteína E6, observado pela marcação em (b) E6 marcadas pelos anticorpos anti-E6 HPV 16/18 (Calbiochem®) e AlexaFluor® 488 anti-IgG de camundongo (Molecular Probes® - verde) e em (c) mitocôndrias (MitoTracker® – vermelho). (a) corresponde ao canal de luz transmitida, (d) é a sobreposição das imagens (b) e (c). MCVL LSM 510 Meta Zeiss. Aumento: Objetiva C-Apocromática 63x /1.4 Óleo.

4.7 Detecção de E7 intracelular

Com o mesmo intuito de estudar possíveis relações ou interações de E7 com mitocôndrias ou mesmo em outras organelas, células transformadas por HPV: HeLa, SiHa e CaSki, além das células HEK 293T transfectadas pelo vetor pLXSN/E7 foram processadas para análises em imunofluorescência, onde a presença da proteína E7 foi evidenciada pelo seu anticorpo específico, enquanto que as mitocôndrias foram marcadas com MitoTracker® Deep Red FM.

É possível observar que, ao contrário do que acontece com E6, E7 não interage diretamente com as mitocôndrias, sendo evidenciada apenas marcações isoladas tanto de E7 quanto para as mitocôndrias.

Figura 23 - Linhagens celulares transformadas por HPV, evidenciando a presença de E7.

Três linhagens celulares naturalmente transformadas por HPV, evidenciando a presença de oncoproteínas E7, observado pela marcação em (b) E7 marcadas pelos anticorpos anti-E7 HPV 18 (Oncogene[®]) e AlexaFluor[®] 488 anti-IgG de camundongo (Molecular Probes[®] - verde) e em (c) mitocôndrias (MitoTracker[®] – vermelho). (a) corresponde ao canal de luz transmitida, (d) é a sobreposição de (b) e (c). MCVL LSM 510 Meta Zeiss. Aumento: Objetiva C-Apocromática 63x /1.4 Óleo.

4.8 Detecção de p53 nas células positivas para o HPV

Apesar da principal característica conhecida e mais estudada da oncoproteína E6 estar relacionada a degradação de p53, todas as linhagens naturalmente transformadas por HPV são conhecidas por serem p53 positivas, demonstrando que apesar de ser fundamental para a imortalização e transformação celular, a degradação de p53 não é a única via que atua para essa finalidade.

Assim, experimentos de imunofluorescência foram realizados para demonstrar a presença dessas proteínas p53 no interior das células HeLa, SiHa e CaSki.

Como pode ser observado na imagem abaixo (Fig. 24), em todas as linhagens estudadas foi possível detectar a presença de p53 distribuída pelo citoplasma celular, em forma de pontos bem definidos.

Figura 24 - Linhagens naturalmente transformadas por HPVe p53-positivas.

Linhagens naturalmente transformadas por HPV, demonstram ser p53-positivas através da presença citoplasmática de p53 detectada pelo anticorpo monoclonal primário anti-p53 (Meridian Life Science, Inc. - verde) em (b); as mitocôndrias evidenciadas pelo marcador específico (MitoTracker® – vermelho) em (c); em (a) corresponde ao canal de luz transmitida; (d) demonstra a sobreposição das imagens (b) e (c). MCVL LSM 510 Meta Zeiss. Aumento: Objetiva C-Apocromática 63x /1.4 Óleo.

4.9 Presença de pRb em células naturalmente transformadas por HPV

A degradação de pRb foi a primeira ação descrita da oncoproteína E7 dos HPVs de alto risco. As linhagens HeLa, SiHa e CaSki possuem o gene Rb ativo, e por isso, buscamos mapear a presença de pRb nas linhagens HPV-positivas. E, como observado, é possível visualizar a presença de pRb no citoplasma celular. Porém, essas marcações apresentaram-se menos intensas, de maneira pouco destacada, mas presentes em todas as linhagens em estudo.

Figura 25 - Linhagens HeLa, SiHa e CaSki pRb-positivas.

Linhagens HeLa, SiHa e CaSki utilizadas no mapeamento intracelular de pRb no citoplasma, destacadas em verde, resultante da interação do anticorpo primário anti-Rb (Calbiochem®) e secundário anti-IgG de camundongo conjugado a AlexaFluor® 488 (Molecular Probes®), visualizado em (b); MitoTracker®, em vermelho, como marcador específico de mitocôndrias (c); em (a) são observados os campos de luz transmitida; (d) sobreposição das imagens (b) e (c). MCVL LSM 510 Meta Zeiss. Aumento: Objetiva C-Apocromática 63x /1.4 Óleo.

4.10 Presença de E6, p53 e pRb em células transfectadas por vetores recombinantes

Para comparar se a presença intramitocondrial da oncoproteína E6 também está presente quando esta proteína é expressa artificialmente, células HEK 293T foram transfectadas pelos vetores pLXSN/E6. E como acontece nas linhagens celulares naturalmente transformadas por HPV, a oncoproteína E6 transfectadas em linhagens celulares HEK 293T transfectadas também foi observada, colocalizando com as mitocôndrias (Fig. 26).

Como essa expressão de E6 em células transfectadas é induzida, aparentemente podemos sugerir uma maior concentração dessa proteínas distribuídas pelas células e sendo possível sua visualização por todo o citoplasma celular, inclusive em áreas nucleares. Como aparentemente temos uma maior concentração de E6, sua colocalização com as mitocôndrias também se torna mais evidente.

A presença de p53 e pRb nas linhagens naturalmente transformadas por HPV foram observadas nos experimentos descritos anteriormente. Para verificar se a expressão induzida de E6 alteraria a presença ou a disponibilidade das proteínas p53 e pRb, foram realizados ensaios de imunofluorescência para detecção em amostras de células HEK 293T transfectadas previamente com o vetor de expressão pLXSN/E6. A imagem abaixo, demonstra que mesmo artificialmente, a presença de E6 não inibe totalmente a presença de p53 nas células, sendo encontrada p53 em todas as células, na forma de pontos bem definidos e fortemente reconhecidos pelo ensaio imunoenzimático. As proteínas são encontradas por toda região do citoplasma celular.

O mesmo acontece com a proteína pRb, que assim como nas linhagens naturalmente transformadas por HPV, as células continuam apresentando pRb, porém aparentemente em baixa expressão, podendo ser verificada pela baixa presença dessa proteína, na maioria das células, porém de forma fraca e pouco distribuída pelo citoplasma celular.

Figura 26 - Células HEK 293T transfectadas com vetor pLXSN/E6 expressando E6, p53 e pRb.

Ensaios realizados em células HEK 293T transfectadas com vetor pLXSN/E6 expressando a oncoproteína E6 (b – primeira linha, 293T/E6 Anti-E6), p53 (b – segunda linha, 293T/E6 Anti-p53) e pRb (b – terceira linha, 293T/E6 Anti-Rb), em verde. Em (c) é possível observar as mitocôndrias reconhecidas pelo seu marcador específico (MitoTracker® - vermelho); em (a) observamos o campo de luz transmitida; (d) a sobreposição as imagens observadas em (b) e (c), em cada coluna, respectivamente. MCVL LSM 510 Meta Zeiss. Aumento: Objetiva C-Apocromática 63x /1.4 Óleo.

Outros ensaios também foram realizados com células HEK 293T transfectadas com o vetor pLXSN/E6 para observar a colocalização de E6 e mitocôndrias em células com marcações específicas nucleares. Como podemos visualizar na imagem abaixo, a presença de uma terceira marcação, confirmou a presença das marcações no interior de células nucleadas, porém a colocalização entre E6 e mitocôndrias não foi evidenciada pela presença de uma terceira cor.

Figura 27 - Tripla marcação em células HEK 293T transfectadas.

Tripla marcação observada em células HEK 293T transfectadas com o vetor pLXSN/E6 expressando E6, evidenciado pela cor verde (a), resultante do reconhecimento e interação do anticorpo primário anti-E6 e secundário anti-IgG de camundongo complexado a AlexaFluor® 488. Em (c) são evidências as mitocôndrias através da utilização de MitoTracker® - vermelho. Já em (d) observamos os núcleos celulares marcados por iodeto de propídio (azul). Em (e) representa a sobreposição de todas as imagens, e (f) a sobreposição das imagens obtidas em (a), (c) e (d). MCVL LSM 510 Meta Zeiss. Aumento: Objetiva C-Apocromática 63x /1.4 Óleo.

4.11 Detecção de E7, p53 e pRb em células HEK 293T transfectadas por E7

Como no item anterior, células HEK 293T foram lipotransfectadas com o vetor pLXSN/E7 para expressarem a proteína E7 a fim de verificar sua localização intracelular. Além disso, foram realizados ensaios para detecção de p53 e pRb nessas células, para verificar se a expressão de E7 altera a localização ou expressão dessas proteínas importantes nas vias de indução ou inibição de apoptose (Figura 28).

Figura 28 - Células transfectadas e imunomarcadas com anti-E7, anti-p53 e anti-pRb.

Imunofluorescência indireta em células HEK 293T transfectadas com o plasmídeo pLXSN/E7 onde é possível observar a expressão da oncoproteína E7 (b - na coluna 293T/E7 Anti-E7), p53 (b - coluna 293T/E7 Anti-p53) e pRb (b - coluna 293T/E7 Anti-Rb), em verde. As mitocôndrias podem ser observadas em vermelho pelo reconhecimento de seu marcador específico (MitoTracker®). Em (a) encontramos o campo de luz visível e, em (d) a sobreposição das imagens (b) e (c). MCVL LSM 510 Meta Zeiss. Aumento: Objetiva C-Apocromática 63x /1.4 Óleo.

4.12 Fracionamento celular e isolamento mitocondrial

Após obtenção das frações celulares utilizando o kit QProteome™ Mitochondria Isolation (Qiagen Inc.) como descrito na seção 3.3.2, foi realizada eletroforese SDS-PAGE para verificar a presença das proteínas totais. As amostras obtidas das frações celulares demonstraram grande diversidade de proteínas de diversos tamanhos e concentrações. Os ensaios de dosagens de proteínas foram bastante heterogêneos quanto a concentração de proteínas totais obtidas a partir de diferentes linhagens celulares.

As amostras referentes aos estágios de lavagens para purificação das mitocôndrias resultaram em frações de baixíssima concentração proteica, aproximadamente 40 ng/mL, e ausência total de proteínas em SDS-PAGE ou presença de pouquíssimas e fracas bandas, como observado na imagem abaixo (Figura 29) nas colunas 4 a 7. Já as amostras referentes aos passos de frações celulares, resultaram em alíquotas ricas com inúmeras e intensas bandas proteicas, observadas nas colunas 1, 2, 3 e 8 da figura abaixo, que se referem a frações contendo proteínas citossólicas, proteínas nucleares, microsomais e mitocondriais, respectivamente.

Figura 29 - Gel SDS-PAGE contendo as amostras obtidas após fracionamento.

Fotodocumentação do gel SDS-PAGE 10% contendo as amostras obtidas após fracionamento celular em linhagem HeLa, sendo: (1) fração contendo as proteínas citossólicas; (2) fração nuclear e debris celulares; (3) fração de proteínas microsomais; (4) a (7) passos de lavagens para preparação das mitocôndrias altamente purificadas; (8) fração mitocondrial; (9) padrão de peso molecular BenchMarck™ (Invitrogen™).

Após fracionamento celular, as amostras celulares foram analisadas através de ensaios de western blotting para detecção de E6 e E7. Tais análises demonstraram resultados semelhantes quando analisadas amostras de linhagens celulares naturalmente transformadas por HPV - HeLa, SiHa e CaSki – assim como em amostras de células HEK 293T transfectadas pelos vetores contendo os genes de E6 e E7. Como observado na figura abaixo, as análises do fracionamento celular realizado com células HEK 293T transfectadas com o vetor pLXSN/E6 demonstraram a presença de E6 nas frações celulares de citoplasma (coluna 5), núcleo (coluna 6) e mitocondriais (coluna 8) através da formação de uma banda de aproximadamente 16 kDa. Apenas na coluna 7, que representa amostras provenientes da fração microsomal das células, não foi possível observar a presença de nenhuma reação ao anticorpo anti-E6.

Por outro lado, podemos verificar que em nenhuma fração celular obtida a partir de células HEK 293T houve reatividade ao anticorpo anti-E6 (Figura 30, colunas de 1 a 4).

Figura 30 - Western blotting após fracionamento celular em células transfectadas e não transfectadas.

Ensaio de western blotting após fracionamento celular realizado em linhagens celulares HEK 293T não transfectadas (colunas de 1 a 4) e transfectadas por vetor contendo gene *E6* (colunas 5 – 8) para avaliação da presença de E6. As colunas (1) e (5) representam amostras de frações contendo as proteínas citoplasmáticas; (2) e (6) frações nucleares; (3) e (7) frações microssomais; e (4) e (8) frações mitocondriais.

Os resultados obtidos a partir do fracionamento celular das células positivas e negativas para HPV podem ser observados na figura abaixo (Figura 31). As células naturalmente transformadas por HPV quando analisadas por western blotting para detecção de E7 apresentaram reatividade a uma banda de aproximadamente 15 KDa nas frações celulares do citoplasmática (coluna 9) e nuclear (coluna 8). Nas frações celulares correspondentes a regiões microssomais (coluna 7) e mitocôndrias (coluna 6), não foi possível detectar a presença de qualquer reatividade ao anticorpo anti-E7. Análises semelhantes foram realizadas com as linhagens celulares SiHa e HeLa, demonstrando resultados semelhantes.

Porém, quando tais análises foram realizadas com amostras de linhagens celulares correspondentes a células HEK 293T, utilizada como controle negativo por não ter associação ao HPV, nenhuma fração celular interagiu ao anticorpo específico anti-E7, como observado na figura abaixo, colunas de 2 a 5.

Figura 31 - Western blotting de amostras contendo frações celulares obtidos de linhagens celulares positivas e negativas para o HPV.

Western blotting contendo amostras de fracionamento celular de amostras negativas para o HPV, HEK 293T – colunas 2 a 5; e amostras obtidas a partir da linhagem CaSki, naturalmente transformada por HPV – colunas de 6 a 9 – contra os anticorpos anti-E7. Assim, em (2) e (6) são observadas amostra da fração mitocondrial; (3) e (7) fração microsomal; (4) e (8) fração nuclear; e (5) e (9) fração contendo as proteínas citossólicas.

Foram realizados também ensaios de western blotting das frações mitocondriais para avaliação da integridade estrutural das mitocôndrias isoladas e detectar a presença das principais proteínas do complexo OXPHOS, e os resultados demonstram que as mitocôndrias obtidas após o processo de isolamento permaneceram íntegras e o complexo OXPHOS não parece ter sido alterado pela presença de E6 no interior dessas organelas.

Figura 32 - Ensaio de western blotting de mitocôndrias isoladas para avaliar integridade de membranas.

Ensaio de western blotting com amostras de mitocôndrias isoladas após fracionamento celular realizado a partir de diferentes linhagens celulares, onde em (1) HEK 293T; (2) HEK 293T transfetada com E6; (3) HEK 293T transfetada e expressando E7; (4) HeLa. Em (A) utilizando MitoProfile® Mitochondrial Integrity WB Antibody Cocktail (MitoScience®) e em (B) Kit MitoProfile® Total OXPHOS+PDH ICC Antibody (MitoScience®).

4.13 Coimunoprecipitação para determinação de E6, E7 e possíveis ligantes intramitocondriais

Após fracionamento celular, as amostras referentes as mitocôndrias isoladas obtidas a partir de células HeLa, SiHa e CaSki foram lisadas, utilizando tampões específicos para lise da membrana mitocondrial, seguido de ensaios de coimunoprecipitação para isolamento das proteínas E6 ou E7 e seus possíveis ligantes.

As amostras obtidas após coimunoprecipitação foram analisadas em gel SDS-PAGE, porém foi possível observar que estas se apresentam em baixíssimas concentrações, visto a baixa concentração de mitocôndrias obtidas isoladamente, e da baixa concentração de proteínas E6, e seus possíveis ligantes, no interior dessas organelas. A imagem abaixo representa um gel após corrida eletroforética, podendo ser observada a presença de proteínas obtidas após coimunoprecipitação de frações mitocôndriais de células HeLa com os anticorpos específicos monoclonal anti-E6 HPV 16/18 (Calbiochem[®]), demonstradas pelas bandas de baixíssima intensidade. Após análise crítica sob intensa fonte luminosa, constatamos a presença de 5 proteínas de aproximadamente 55, 30, 20, 17 e 16 KDa.

Figura 33 - Gel SDS-PAGE após coimunoprecipitação das frações mitocondriais com anti-E6.

Fotodocumentação de um gel SDS-PAGE 10% contendo a amostra obtida após coimunoprecipitação das frações mitocondriais de células HeLa com o anticorpo monoclonal anti-E6 HPV 16/18 (Calbiochem®).

As bandas observadas na imagem acima foram recortadas e digeridas tripticamente para posterior análise em espectrômetro de massa, porém por dificuldades técnicas e baixa resolução do equipamento encontrado no centro técnico de análise de amostras, Central Analítica – IQ/USP, esse processo ainda não foi efetivado. As amostras serão encaminhadas novamente a outros centro específico de análises para realização dessa etapa, LNBio - Campinas.

Os ensaios de coimunoprecipitação também foram realizados com as frações mitocondriais obtidas a partir de células SiHa e CaSki, porém, nenhuma proteína pode ser detectada através de análise eletroferética, provavelmente devido à insuficiência das amostras.

A coimunoprecipitação das frações mitocondriais obtidas a partir de células HeLa e utilizando anticorpos anti-E7 HPV 18 (Oncogene®) resultaram na ausência completa de bandas após análise minuciosa dos géis SDS-PAGE.

4.14 Western blotting para determinação de possíveis ligantes de E6 intramitocondrial

Para confirmar a presença de E6 intramitocondrial, após o ensaio de coimunoprecipitação foi realizado novo ensaio de western blotting, a fim de demonstrar e confirmar a presença de E6 nas amostras, coforme pode ser observado na figura 34, onde é possível visualizar a presença de uma proteína de aproximadamente 16 KDa.

Porém, utilizando-se anticorpos anti-E6 também foi possível detectar uma proteína de aproximadamente 55 KDa que até então não era aparente nos ensaios anteriores à coimunoprecipitação. A natureza dessa proteína não foi determinada, porém a mesma também foi recuperada e digerida para posterior análise em espectrômetro de massa para determinarmos sua origem.

Figura 34 - Western blotting de frações mitocondriais de células positivas e negativas para o HPV com anti-E6.

Frações mitocondriais foram analisados por western blotting, sendo provenientes de células HEK 293T não transfectadas (2), células CaSki (3), HeLa (5) após coimunoprecipitação com anti-E6. Observamos também em (1) a presença de marcador de peso molecular (BenchMarckTM) e em (4) amostra proveniente do sobrenadante resultante da coimunoprecipitação de mitocôndrias isoladas de células HeLa com anticorpos anti-E6.

Como alternativa para pesquisar a identificação dessas proteínas obtidas através da coimunoprecipitação, um novo ensaio de western blotting foi realizado com anticorpos específicos contra alguns possíveis candidatos a ligantes de E6, encontrados na fração intramitocondrial. Os anticorpos utilizados foram anti-Bax e anti-Bak. E como podemos observar na figura 35, demonstramos a presença de tais proteínas, através das bandas de aproximadamente 28 KDa (Bak) e 21 KDa (Bax).

Figura 35 - Ensaio de western blotting para reconhecimento de possíveis ligantes de E6 intramitocondrial.

Ensaio de western blotting de amostras provenientes da coimunoprecipitação com anti-E6 de frações mitocondriais provenientes de células HeLa (1) e CaSki (2). Em (a) western blotting realizado com anticorpo monoclonal anti-Bak (Sigma-Aldrich®) e (b) anticorpo monoclonal anti-Bax (Sigma Aldrich®).

5 DISCUSSÃO

O dogma principal em oncologia é que o câncer é uma doença iniciada e dirigida por aberrações somáticas de nosso genoma. O desafio consiste em decifrar como essas alterações genômicas culminam em transformações malignas e como elas podem ser exploradas para fins terapêuticos. A compreensão molecular proporcionada pelo estudo de cânceres hematopoiéticos tem elucidado muitos princípios fundamentais na biologia do câncer (DAWSON; KOUZARIDES; HUNTLY, 2012).

Mitocôndrias são organelas dinâmicas e versáteis que produzem a maioria do ATP celular e são componentes essenciais de várias vias de sinalização cruciais para a vida e morte celular. Sua versatilidade funcional é comparável à sua complexidade morfológica, que é heterogênea em células vivas, como resultado do balanço entre fusão e fissão de membranas mitocondriais. A morfologia mitocondrial é controlada por um conjunto de proteínas modeladoras mitocondriais que também compartilham homologia estrutural com as grandes GTPases—dinaminas — ou são membros de uma cohort de proteínas não convencionais, das quais a função molecular é menos caracterizada. Evidências crescentes indicam que a morfologia e a regulação da forma mitocondrial são cruciais para a fisiologia celular, assim como para a patologia do organismo e novas proteínas modeladoras mitocondriais continuam sendo descobertas. Portanto, o campo é novo e muitas questões permanecem abertas (CAMPELLO; SCORRANO, 2010).

Contrariamente, nosso conhecimento sobre o papel da dinâmica das mitocôndrias no sistema imune é ainda raro. Contudo, apelamos ainda para dados preliminares que mostram a importância potencial da dinâmica mitocondrial na fisiologia de células-T. Além disso, as cascatas sinalizadoras que levam à ativação de células imunes são razoavelmente bem conhecidas, e modelos genéticos tornam possível isolar as etapas chaves destas cascatas. Então, as células-T são um sistema de referência no qual a dinâmica mitocondrial ocorre no contexto de elementos conhecidos de sinalização. Em longo termo, mitocôndrias e dinâmica mitocondrial poderiam ser desvendadas como um importante alvo terapêutico para modular funções de células-T em doenças comuns autoimunes, transplantes versus doenças hospedeiras e infecções, assim como para modular infecções virais na imunidade inata (CAMPELLO; SCORRANO, 2010).

Estudos recentes têm desvendado a atuação inesperada das mitocôndrias sobre a resposta imune inata, em resposta à presença de RNA viral no citoplasma das células.

Aparentemente, o RNA viral é reconhecido por receptores citoplasmáticos semelhantes a RIG-I (RLRs – “RIG-like receptors”), que ativa MAVS (“Mitochondrial antiviral signaling protein”) induz a produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN (interferon) tipo I, induzindo resposta imune celular (ZEMIRLI; ARNOULT, 2012), demonstrando assim, que a mitocôndria pode atuar efetivamente sobre o sistema imune e que novas atividades e funções dessa organela já bem estudada, devem ser descritas e avaliadas.

Por outro lado, considerando-se os dados epidemiológicos sempre crescentes para as infecções anuais por HPVs, aparentemente e talvez devido às estratégias virais para evasão do sistema imune, este parece não atuar efetivamente na modulação contra a infecção viral por HPV na imunidade inata associada às mitocôndrias.

Com o presente trabalho foi possível observar que as oncoproteínas E6 e E7 do HPV estão presentes e são continuamente expressas pelas células naturalmente transformadas por esse agente viral, visto que foi possível detectar a presença das oncoproteínas em estudo na grande maioria das células, aproximadamente 95% da população analisada.

Em todas as análises qualitativas das imagens obtidas dos ensaios de imunofluorescência foi possível observar a presença das oncoproteínas de forma homogênea, distribuídas no interior das células analisadas, de forma muito semelhante, independente da linhagem celular estudada – HeLa, SiHa ou CaSki (Figuras 11 e 12).

No entanto, quando a oncoproteína E6 foi expressa a partir da lipotransfecção em linhagens celulares não transformadas por HPV, a expressão foi mais intensamente observada, quando analisada por ensaios de imunofluorescência (Figura 13) e de microscopia eletrônica de transmissão, como visualizado nas figuras 20 e 21.

Já a expressão induzida a partir da transfecção utilizando vetor contendo o gene *E7* em células HPV-negativas foi, qualitativamente, bem próxima àquela encontrada em análises de imunofluorescência, em linhagens celulares naturalmente transformadas por HPV. A expressão de E7 ou a sua detecção foi em níveis mais baixos, com relação a E6.

As mitocôndrias observadas através de ensaios de imunofluorescência, marcadas após sua fixação, apresentaram quantidade e qualidade esperadas e distribuição de forma homogênea no interior celular, porém com maior concentração dessas organelas na região perinuclear. Esse acúmulo de mitocôndrias na região próxima ao núcleo é bastante estudado e acredita-se que se deve à função de monitoramento do metabolismo intracelular e regulação do tráfego de cálcio no interior da célula (HASHITANI; LANG; SUZUKI, 2010).

O dado mais importante relatado no atual trabalho foi a observação da colocalização de E6 e mitocôndrias e a possível localização intramitocondrial da oncoproteína estudada. Este dado nunca foi demonstrado na literatura científica até a presente data.

A função de E6 no interior das mitocôndrias ainda não foi estudada, porém sugerimos que seja mais um mecanismo de ação do vírus no intuito de se manter e se multiplicar no interior dos organismos infectados, evadindo o sistema imune e inibindo a apoptose (Figura 36). Visto que durante a coevolução com seus hospedeiros, os vírus têm desenvolvido múltiplas estratégias para manipular os processos biológicos da célula infectada, podendo regular a proliferação celular, diferenciação e a morte. Assim, muitos vírus inibem apoptose, uma estratégia para subverter um dos mecanismos mais primitivos de ação antiviral, o que permite ao vírus replicar antes da morte da célula hospedeira. Além disso, alguns vírus podem induzir apoptose em algumas células infectadas ou células imunologicamente relevantes, com o propósito de aumentar a carga viral ou subverter a resposta imune do hospedeiro (BOYA et al., 2004). A prevenção de apoptose das células infectadas por vírus é importante para que o vírus sustente sua replicação, mas também é necessária para seu estabelecimento e manutenção ou latência da virose (CASTANIER; ARNOULT, 2011).

Com a análise das imagens obtidas após imunocitoquímica ultraestrutural, é possível sugerir que a oncoproteína E6 esteja associada à membrana interna ou dispersa na matriz mitocondrial, visto que as marcações aparentemente se encontram dentro das mitocôndrias e muito próximas das membranas internas e cristas mitocondriais.

Também foi possível observar que quando as células são transfectadas por vetor contendo o gene *E6*, há uma expressão mais abundante da proteína E6, e com isso, sua colocalização com as mitocôndrias se torna mais evidente, sugerindo que a localização subcelular predominante da proteína E6 pode depender de seus níveis de expressão nas células.

Outro dado que corrobora com a hipótese de que o HPV atua sobre as mitocôndrias foi recentemente publicado, demonstrando forte evidência da instabilidade do mtDNA em pacientes com lesões cervicais relacionadas aos HPVs de alto risco, onde foram detectados altos índices de mutações. Porém o mecanismo pelo qual essas mutações ocorrem ainda é desconhecido (GOIA-RUSANU et al., 2011).

A detecção das proteínas p53 e pRb, alvos celulares mais bem caracterizados e estudados pela interação e degradação por E6 e E7, respectivamente, no citoplasma das células que expressam as oncoproteínas virais, sugere que tal degradação não é total e,

certamente, constituem importantes alvos celulares, porém não os únicos e essenciais para a indução da transformação maligna das células. Tal fato explicaria o aumento constante e significativo de alvos celulares descritos por sua interação com as oncoproteínas estudadas.

Figura 36 - Esquema ilustrativo da hipótese proposta no presente estudo sobre a ação anti-apoptótica da oncoproteína viral E6 de HPV16/18.

Em células normais a atividade de Bax é regulada através de ciclos constantes entre as mitocôndrias e o citosol. Bax se associa transientemente com Bcl-xL, resultando em retrotranslocação para o citosol. Durante a indução de apoptose Bcl-xL é inibida e Bax é ativada somente por proteínas BH3. Uma mudança conformacional é induzida em Bax, resultando na inserção dentro da membrana externa mitocondrial - MOM, originando poros na MOM (MOMP), liberação de citocromo c e de outras proteínas mitocondriais, iniciando a apoptose. Em células infectadas por HPV, a presença da oncoproteína E6 promove a interação com proteínas do complexo Bax - Bcl-xL - Bak - BH3, provavelmente inibindo a permeabilização e formação de poros na membrana externa mitocondrial, bloqueando a saída de citocromo c e de outras proteínas mitocondriais, atuando como agente anti-apoptótico.

Fonte: Qiagen Inc., 2011, modificado.

6 CONCLUSÃO

Sendo E6 uma proteína reconhecidamente multifuncional no processo de transformação e imortalização celular, fato esse somado às características moleculares conservadas, suficientemente demonstradas no presente estudo, juntamente com sua possível ação anti-apoptótica em nível mitocondrial, entendemos ser a oncoproteína E6 um alvo terapêutico mais eficaz e eficiente no desenvolvimento de vacinas terapêuticas, para o tratamento de cânceres relacionados com o HPV, quando comparado pelos mesmos parâmetros com as características da oncoproteína E7, no que se refere ao uso da molécula proteica como estímulo à resposta imunológica pelo organismo humano. Entendemos ser mais fácil a produção de anticorpos gerados contra uma molécula estruturalmente bem definida e evolutivamente conservada, envolvida em diversas frentes na manutenção da malignidade celular e da carcinogênese.

A proteína E6 está envolvida diretamente nos processos de imortalização das células infectadas por HPV, pois a diminuição da atividade de E6, observada nas células infectadas com HPV, leva à inibição da proliferação celular, podendo ocorrer a apoptose (ALVAREZ-SALAS; ARPAWONG; DIPAOLO, 1999; BUTZ et al., 2003; CHO; KIM; KIM, 2002; GRIFFIN et al., 2006; YAMATO et al., 2006). Tal fato confirma a conveniência da proteína E6 ser um alvo para introdução terapêutica de carcinoma cervical e dos demais cânceres associados ao HPV.

A observação da presença de E6 no interior das mitocôndrias, assim como sua interação com as proteínas Bak e Bax sugerem mais uma via utilizada pelo vírus para justificar o sucesso evolutivo de sua manutenção nos hospedeiros infectados, através da inibição de apoptose.

A via de ação intramitocondrial da oncoproteína E6 como inibidora de apoptose, ainda é desconhecida. Diversos trabalhos sugerem que alguns vírus se utilizam de alterações na função mitocondrial para mudar a fisiologia celular em favor da replicação viral, porém novos estudos são necessários e estão em andamento para caracterizar o modo como a oncoproteína E6 interage ou tem como alvo as mitocôndrias.

Portanto, o presente estudo contribui para confirmar a hipótese da presença intramitocondrial da oncoproteína viral E6 de HPV16/18 de alto risco, um dado inédito na literatura científica internacional, cuja relevância está diretamente relacionada com a aplicação clínica humana, no desenvolvimento de imunobiológicos e fármacos capazes de neutralizar a ação deste alvo terapêutico aqui apresentado.

REFERÊNCIAS*

ADNAN, M. M. Programmed Cell Death APOPTOSIS. 2012. Disponível em: <http://medicinembbs.blogspot.com.br/2011/03/programmed-cell-death-apoptosis.html>. Acesso em: 01 jun. 2011.

AIRES, K. A.; CIANCIARULLO, A. M.; CARNEIRO, S. M.; VILLA, L. L.; BOCCARDO, E.; PEREZ-MARTINEZ, G.; PEREZ-ARELLANO, I.; OLIVEIRA, M. L.; HO, P. L. Production of human papillomavirus type 16 L1 virus-like particles by recombinant *Lactobacillus casei* cells. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, n. 1, p. 745-752, 2006.

AKIL, N.; YASMEEN, A.; KASSAB, A.; GHABREAU, L.; DARNEL, A. D.; AL MOUSTAFA, A. E. High-risk human papillomavirus infections in breast cancer in Syrian women and their association with Id-1 expression: a tissue microarray study. **Br. J. Cancer**, v. 99, n. 3, p. 404-407, 2008.

ALVAREZ-SALAS, L. M.; ARPAWONG, T. E.; DIPAOLO, J. A. Growth inhibition of cervical tumor cells by antisense oligodeoxynucleotides directed to the human papillomavirus type 16 E6 gene. **Antisense Nucleic Acid Drug Dev.**, v. 9, n. 5, p. 441-450, 1999.

ANTONSSON, A.; HANSSON, B. G. Healthy skin of many animal species harbors papillomaviruses which are closely related to their human counterparts. **J. Virol.**, v. 76, n. 24, p. 12537-12542, 2002.

ANTONSSON, A.; SPURR, T. P.; CHEN, A. C.; FRANCIS, G. D.; MCMILLAN, N. A.; SAUNDERS, N. A.; LAW, M.; BENNETT, I. C. High prevalence of human papillomaviruses in fresh frozen breast cancer samples. **J. Med. Virol.**, v. 83, n. 12, p. 2157-2163, 2011.

ASHRAFI, G. H.; BROWN, D. R.; FIFE, K. H.; CAMPO, M. S. Down-regulation of MHC class I is a property common to papillomavirus E5 proteins. **Virus Res.**, v. 120, n. 1-2, p. 208-211, 2006.

ASHRAFI, G. H.; HAGHSHEENAS, M. R.; MARCHETTI, B.; O'BRIEN, P. M.; CAMPO, M. S. E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I. **Int. J. Cancer**, v. 113, n. 2, p. 276-283, 2005.

AUVERT, B.; LISSOUBA, P.; CUTLER, E.; ZARCA, K.; PUREN, A.; TALJAARD, D. Association of oncogenic and nononcogenic human papillomavirus with HIV incidence. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, v. 53, n. 1, p. 111-116, 2010.

* De acordo com:

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

AUVINEN, E.; ALONSO, A.; AUVINEN, P. Human papillomavirus type 16 E5 protein colocalizes with the antiapoptotic Bcl-2 protein. **Arch. Virol.**, v. 149, n. 9, p. 1745-1759, 2004.

BAKER, C. C.; PHELPS, W. C.; LINDGREN, V.; BRAUN, M. J.; GONDA, M. A.; HOWLEY, P. M. Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. **J. Virol.**, v. 61, n. 4, p. 962-971, 1987.

BANADYGA, L.; LAM, S. C.; OKAMOTO, T.; KVANSAKUL, M.; HUANG, D. C.; BARRY, M. Deerpox virus encodes an inhibitor of apoptosis that regulates Bak and Bax. **J. Virol.**, v. 85, n. 5, p. 1922-1934, 2011.

BARWAD, A.; SOOD, S.; GUPTA, N.; RAJWANSHI, A.; PANDA, N.; SRINIVASAN, R. Human papilloma virus associated head and neck cancer: A PCR based study. **Diagn. Cytopathol.**, 2011.

BAUER, H. M.; GREER, C. E.; MANOS, M. M. Determination of genital human papillomavirus infection by consensus PCR amplification. In: Herrington, C.S.; McGee, J.O.D. (Ed.). **Diagnostic molecular pathology**. New York: Oxford University Press, 1992, p. 131-152.

BAZAN, S. B.; DE ALENCAR MUNIZ CHAVES, A.; AIRES, K. A.; CIANCIARULLO, A. M.; GARCEA, R. L.; HO, P. L. Expression and characterization of HPV-16 L1 capsid protein in *Pichia pastoris*. **Arch. Virol.**, v. 154, n. 10, p. 1609-1617, 2009.

BECKER, T.; BOTTINGER, L.; PFANNER, N. Mitochondrial protein import: from transport pathways to an integrated network. **Trends Biochem. Sci.**, v. 37, n. 3, p. 85-91, 2012.

BELLEUDI, F.; LEONE, L.; PURPURA, V.; CANNELLA, F.; SCROFANI, C.; TORRISI, M. R. HPV16 E5 affects the KGFR/FGFR2b-mediated epithelial growth through alteration of the receptor expression, signaling and endocytic traffic. **Oncogene**, v. 30, n. 50, p. 4963-4976, 2011.

BERNARD, H. U.; BURK, R. D.; CHEN, Z.; VAN DOORSLAER, K.; HAUSEN, H.; DE VILLIERS, E. M. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**, v. 401, n. 1, p. 70-79, 2010.

BOCCARDO, E.; VILLA, L. L. Vírus e câncer. In: Brentani, M. M.; Coelho, F. R.; Kowalski, L. P. (Ed.). **Bases da Oncologia**. 2 ed. São Paulo: Plenun Press, v.1, 2003. 87-104.

BODAGHI, S.; JIA, R.; ZHENG, Z. M. Human papillomavirus type 16 E2 and E6 are RNA-binding proteins and inhibit in vitro splicing of pre-mRNAs with suboptimal splice sites. **Virology**, v. 386, n. 1, p. 32-43, 2009.

BOYA, P.; PAULEAU, A. L.; PONCET, D.; GONZALEZ-POLO, R. A.; ZAMZAMI, N.; KROEMER, G. Viral proteins targeting mitochondria: controlling cell death. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1659, n. 2-3, p. 178-189, 2004.

BOYA, P.; ROUMIER, T.; ANDREAU, K.; GONZALEZ-POLO, R. A.; ZAMZAMI, N.; CASTEDO, M.; KROEMER, G. Mitochondrion-targeted apoptosis regulators of viral origin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 304, n. 3, p. 575-581, 2003.

BRADFORD, H. F. Methods of Neurochemisrry. In: Iversen, L.L.; Iversen, S.D.; Snyder, S.H. (Ed.). **Handbook of Psychopharmacology**. New York: Plenum Press, 1975, p. 191.

BREHM, A.; NIELSEN, S. J.; MISKA, E. A.; MCCANCE, D. J.; REID, J. L.; BANNISTER, A. J.; KOUZARIDES, T. The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. **EMBO J.**, v. 18, n. 9, p. 2449-2458, 1999.

BUCK, C. B. Center for Cancer Research. 2012. Disponível em: <http://ccr.cancer.gov/staff/gallery.asp?profileid=5921>. Acesso em: 01 jun. 2012.

BURD, E. M. Human papillomavirus and cervical cancer. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 16, n. 1, p. 1-17, 2003.

BURK, R. D.; CHEN, Z.; HARARI, A.; SMITH, B. C.; KOCJAN, B. J.; MAVER, P. J.; 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. Panonica Adriat.**, v. 20, n. 3, p. 113-123, 2011.

BURKHARDT, A.; WILLINGHAM, M.; GAY, C.; JEANG, K. T.; SCHLEGEL, R. The E5 oncoprotein of bovine papillomavirus is oriented asymmetrically in Golgi and plasma membranes. **Virology**, v. 170, n. 1, p. 334-339, 1989.

BUTZ, K.; RISTRIANI, T.; HENGSTERMANN, A.; DENK, C.; SCHEFFNER, M.; HOPPE-SEYLER, F. siRNA targeting of the viral E6 oncogene efficiently kills human papillomavirus-positive cancer cells. **Oncogene**, v. 22, n. 38, p. 5938-5945, 2003.

CAMPELLO, S.; SCORRANO, L. Mitochondrial shape changes: orchestrating cell pathophysiology. **EMBO Rep.**, v. 11, n. 9, p. 678-684, 2010.

CASTANIER, C.; ARNOULT, D. Mitochondrial localization of viral proteins as a means to subvert host defense. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1813, n. 4, p. 575-583, 2011.

CHO, N. H.; KIM, Y. T.; KIM, J. W. Alteration of cell cycle in cervical tumor associated with human papillomavirus: cyclin-dependent kinase inhibitors. **Yonsei Med. J.**, v. 43, n. 6, p. 722-728, 2002.

CIANCIARULLO, A. M.; SZULCZEWSKI, V.; AIRES, K. A.; BAZAN, S. B.; HO, P. L.; BOCCARDO, E.; VILLA, L. L.; MULLER, M.; ARMBRUSTER-MORAES, E. Production of HPV 16 L1 VLP in human cell culture for basic studies anogenital cancer. **Appl. Cancer Res.**, v. 8, p. 81-82, 2007.

CIANCIARULLO, A. M.; SZULCZEWSKI, V.; CHAVES, A. A. M.; BAZAN, S. B.; AIRES, K. A.; MÜLLER, M.; ARMBRUSTER-MORAES, E. Production of HPV16 L1L2 VLPs in cultures of human epithelial cells. In: Méndez-Vilas, A.; Diaz, J. (Ed.). **Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology**. Badajoz: Formatex Research Center, 2010, p. 1073-1082.

CIANCIARULLO, A. M.; SZULCZEWSKI, V.; CHAVES, A. A. M.; HO, P. L.; MÜLLER, M.; ARMBRUSTER-MORAES, E. HPV 16 L1L2 gene expressions, protein synthesis and interaction in human cell culture. **Acta Microscopica**, v. 18, n. Supp C, p. 661-662, 2009.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. HPV - Associated Cancer. 2012. Disponível em: <http://www.cdc.gov/cancer/hpv/>. Acesso em: 15 mar 2012.

COKOL, M.; NAIR, R.; ROST, B. Finding nuclear localization signals. **EMBO Rep.**, v. 1, n. 5, p. 411-415, 2000.

CONSERVAPEDIA. Mitochondrion. 2012. Disponível em: http://www.conservapedia.com/Mitochondrion#cite_ref-0. Acesso em: 03 jun. 2012.

CUTTS, F. T.; FRANCESCHI, S.; GOLDIE, S.; CASTELLSAGUE, X.; DE SANJOSE, S.; GARNETT, G.; EDMUNDS, W. J.; CLAEYS, P.; GOLDENTHAL, K. L.; HARPER, D. M.; MARKOWITZ, L. Human papillomavirus and HPV vaccines: a review. **Bull World Health Organ**, v. 85, n. 9, p. 719-726, 2007.

D'AGOSTINO, D. M.; BERNARDI, P.; CHIECO-BIANCHI, L.; CIMINALE, V. Mitochondria as functional targets of proteins coded by human tumor viruses. **Adv. Cancer Res.**, v. 94, p. 87-142, 2005.

D'SOUZA, G.; KREIMER, A. R.; VISCIDI, R.; PAWLITA, M.; FAKHRY, C.; KOCH, W. M.; WESTRA, W. H.; GILLISON, M. L. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 356, n. 19, p. 1944-1956, 2007.

DANIELS, P. R.; SANDERS, C. M.; MAITLAND, N. J. Characterization of the interactions of human papillomavirus type 16 E6 with p53 and E6-associated protein in insect and human cells. **J. Gen. Virol.**, v. 79 (Pt 3), p. 489-499, 1998.

DAVY, C. E.; JACKSON, D. J.; RAJ, K.; PEH, W. L.; SOUTHERN, S. A.; DAS, P.; SORATHIA, R.; LASKEY, P.; MIDDLETON, K.; NAKAHARA, T.; WANG, Q.; MASTERSON, P. J.; LAMBERT, P. F.; CUTHILL, S.; MILLAR, J. B.; DOORBAR, J. Human papillomavirus type 16 E1 E4-induced G2 arrest is associated with cytoplasmic retention of active Cdk1/cyclin B1 complexes. **J. Virol.**, v. 79, n. 7, p. 3998-4011, 2005.

DAWSON, M. A.; KOUZARIDES, T.; HUNTLY, B. J. Targeting epigenetic readers in cancer. **N. Engl. J. Med.**, v. 367, n. 7, p. 647-657, 2012.

DE VILLIERS, E. M.; FAUQUET, C.; BROKER, T. R.; BERNARD, H. U.; ZUR HAUSEN, H. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17-27, 2004.

DE VUYST, H.; CLIFFORD, G. M.; NASCIMENTO, M. C.; MADELEINE, M. M.; FRANCESCHI, S. Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: a meta-analysis. **Int. J. Cancer**, v. 124, n. 7, p. 1626-1636, 2009.

DEITCH, A. D.; LAW, H.; DEVERE WHITE, R. A stable propidium iodide staining procedure for flow cytometry. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 30, n. 9, p. 967-972, 1982.

DOORBAR, J.; ELY, S.; STERLING, J.; MCLEAN, C.; CRAWFORD, L. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. **Nature**, v. 352, n. 6338, p. 824-827, 1991.

DREIER, K.; SCHEIDEN, R.; LENER, B.; EHEHALT, D.; PIRCHER, H.; MULLER-HOLZNER, E.; ROSTEK, U.; KAISER, A.; FIEDLER, M.; RESSLER, S.; LECHNER, S.; WIDSCHWENDTER, A.; EVEN, J.; CAPESIUS, C.; JANSEN-DURR, P.; ZWERSCHKE, W. Subcellular localization of the human papillomavirus 16 E7 oncoprotein in CaSki cells and its detection in cervical adenocarcinoma and adenocarcinoma in situ. **Virology**, v. 409, n. 1, p. 54-68, 2011.

DUELLI, D. M.; PADILLA-NASH, H. M.; BERMAN, D.; MURPHY, K. M.; RIED, T.; LAZEBNIK, Y. A virus causes cancer by inducing massive chromosomal instability through cell fusion. **Curr. Biol.**, v. 17, n. 5, p. 431-437, 2007.

DYSON, N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. **Genes Dev.**, v. 12, n. 15, p. 2245-2262, 1998.

DYSON, N.; HOWLEY, P. M.; MUNGER, K.; HARLOW, E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. **Science**, v. 243, n. 4893, p. 934-937, 1989.

ELBEL, M.; CARL, S.; SPADERNA, S.; IFTNER, T. A comparative analysis of the interactions of the E6 proteins from cutaneous and genital papillomaviruses with p53 and E6AP in correlation to their transforming potential. **Virology**, v. 239, n. 1, p. 132-149, 1997.

EPPEL, W.; WORDA, C.; FRIGO, P.; ULM, M.; KUCERA, E.; CZERWENKA, K. Human papillomavirus in the cervix and placenta. **Obstet. Gynecol.**, v. 96, n. 3, p. 337-341, 2000.

FACINA, T. Estimativa 2012–Incidência de Câncer no Brasil. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 57, n. 4, p. 557, 2011.

FERBER, M. J.; THORLAND, E. C.; BRINK, A. A.; RAPP, A. K.; PHILLIPS, L. A.; MCGOVERN, R.; GOSTOUT, B. S.; CHEUNG, T. H.; CHUNG, T. K.; FU, W. Y.; SMITH, D. I. Preferential integration of human papillomavirus type 18 near the c-myc locus in cervical carcinoma. **Oncogene**, v. 22, n. 46, p. 7233-7242, 2003.

FILIPPOVA, M.; PARKHURST, L.; DUERKSEN-HUGHES, P. J. The human papillomavirus 16 E6 protein binds to Fas-associated death domain and protects cells from Fas-triggered apoptosis. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 24, p. 25729-25744, 2004.

FILIPPOVA, M.; SONG, H.; CONNOLLY, J. L.; DERMODY, T. S.; DUERKSEN-HUGHES, P. J. The human papillomavirus 16 E6 protein binds to tumor necrosis factor (TNF) R1 and protects cells from TNF-induced apoptosis. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 24, p. 21730-21739, 2002.

FRANCIS, M. J.; JONES, E. E.; LEVY, E. R.; PONNAMBALAM, S.; CHELLY, J.; MONACO, A. P. A Golgi localization signal identified in the Menkes recombinant protein. **Hum. Mol. Genet.**, v. 7, n. 8, p. 1245-1252, 1998.

FUNK, J. O.; WAGA, S.; HARRY, J. B.; ESPLING, E.; STILLMAN, B.; GALLOWAY, D. A. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. **Genes Dev.**, v. 11, n. 16, p. 2090-2100, 1997.

GARNETT, T. O.; FILIPPOVA, M.; DUERKSEN-HUGHES, P. J. Accelerated degradation of FADD and procaspase 8 in cells expressing human papilloma virus 16 E6 impairs TRAIL-mediated apoptosis. **Cell Death Differ.**, v. 13, n. 11, p. 1915-1926, 2006.

GIBBS, J. S.; MALIDE, D.; HORNING, F.; BENNINK, J. R.; YEWDELL, J. W. The influenza A virus PB1-F2 protein targets the inner mitochondrial membrane via a predicted basic amphipathic helix that disrupts mitochondrial function. **J. Virol.**, v. 77, n. 13, p. 7214-7224, 2003.

GILLISON, M. L. Human papillomavirus-associated head and neck cancer is a distinct epidemiologic, clinical, and molecular entity. **Semin. Oncol.**, v. 31, n. 6, p. 744-754, 2004.

GILLISON, M. L.; BROUTIAN, T.; PICKARD, R. K.; TONG, Z. Y.; XIAO, W.; KAHLE, L.; GRAUBARD, B. I.; CHATURVEDI, A. K. Prevalence of Oral HPV Infection in the United States, 2009-2010. **JAMA**, 2012.

GILLISON, M. L.; D'SOUZA, G.; WESTRA, W.; SUGAR, E.; XIAO, W.; BEGUM, S.; VISCIDI, R. Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 100, n. 6, p. 407-420, 2008.

GLAUNSINGER, B. A.; LEE, S. S.; THOMAS, M.; BANKS, L.; JAVIER, R. Interactions of the PDZ-protein MAGI-1 with adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus E6 oncoproteins. **Oncogene**, v. 19, n. 46, p. 5270-5280, 2000.

GLOBOCAN. Cervical cancer incidence and mortality worldwide in 2008. 2011. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/cervix.asp>. Acesso em: 01 jul. 2012.

GNANAMONY, M.; PEEDICAYIL, A.; ABRAHAM, P. An overview of human papillomaviruses and current vaccine strategies. **Indian J. Med. Microbiol.**, v. 25, n. 1, p. 10-17, 2007.

GOIA-RUSANU, C. D.; IANCU, I. V.; BOTEZATU, A.; SOCOLOV, D.; HUICA, I.; PLESA, A.; ANTON, G. Mitochondrial DNA mutations in patients with HRHPV-related cervical lesions. **Roum. Arch. Microbiol. Immunol.**, v. 70, n. 1, p. 5-10, 2011.

GONG, M. Z.; YOU, J. F.; CUI, X. L.; ZHENG, J. Identification of nucleolar localization signal sequence of tumor metastasis suppressor gene-1. **Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi**, v. 40, n. 11, p. 767-771, 2011.

GREENFIELD, I.; NICKERSON, J.; PENMAN, S.; STANLEY, M. Human papillomavirus 16 E7 protein is associated with the nuclear matrix. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 88, n. 24, p. 11217-11221, 1991.

GRIFFIN, H.; ELSTON, R.; JACKSON, D.; ANSELL, K.; COLEMAN, M.; WINTER, G.; DOORBAR, J. Inhibition of papillomavirus protein function in cervical cancer cells by intrabody targeting. **J. Mol. Biol.**, v. 355, n. 3, p. 360-378, 2006.

GRUENER, M.; BRAVO, I. G.; MOMBURG, F.; ALONSO, A.; TOMAKIDI, P. The E5 protein of the human papillomavirus type 16 down-regulates HLA-I surface expression in calnexin-expressing but not in calnexin-deficient cells. **Viol. J.**, v. 4, p. 116, 2007.

GUCCIONE, E.; MASSIMI, P.; BERNAT, A.; BANKS, L. Comparative analysis of the intracellular location of the high- and low-risk human papillomavirus oncoproteins. **Virology**, v. 293, n. 1, p. 20-25, 2002.

GUPTA, A.; DONG, A.; LOWE, A. W. AGR2 Gene Function Requires a Unique Endoplasmic Reticulum Localization Motif. **J. Biol. Chem.**, v. 287, n. 7, p. 4773-4782, 2012.

GUPTA, S. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis (Review). **Int. J. Oncol.**, v. 22, n. 1, p. 15-20, 2003.

HALBERT, C. L.; DEMERS, G. W.; GALLOWAY, D. A. The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. **J. Virol.**, v. 65, n. 1, p. 473-478, 1991.

HASHIBE, M.; BRENNAN, P.; BENHAMOU, S.; CASTELLSAGUE, X.; CHEN, C.; CURADO, M. P.; DAL MASO, L.; DAUDT, A. W.; FABIANOVA, E.; FERNANDEZ, L.; WUNSCH-FILHO, V.; FRANCESCHI, S.; HAYES, R. B.; HERRERO, R.; KOIFMAN, S.; LA VECCHIA, C.; LAZARUS, P.; LEVI, F.; MATES, D.; MATOS, E.; MENEZES, A.; MUSCAT, J.; ELUF-NETO, J.; OLSHAN, A. F.; RUDNAI, P.; SCHWARTZ, S. M.; SMITH, E.; STURGIS, E. M.; SZESZENIA-DABROWSKA, N.; TALAMINI, R.; WEI, Q.; WINN, D. M.; ZARIDZE, D.; ZATONSKI, W.; ZHANG, Z. F.; BERTHILLER, J.; BOFFETTA, P. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 99, n. 10, p. 777-789, 2007.

HASHITANI, H.; LANG, R. J.; SUZUKI, H. Role of perinuclear mitochondria in the spatiotemporal dynamics of spontaneous Ca^{2+} waves in interstitial cells of Cajal-like cells of the rabbit urethra. **Br. J. Pharmacol.**, v. 161, n. 3, p. 680-694, 2010.

HEBNER, C. M.; LAIMINS, L. A. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. **Rev. Med. Virol.**, v. 16, n. 2, p. 83-97, 2006.

HECK, J. E.; BERTHILLER, J.; VACCARELLA, S.; WINN, D. M.; SMITH, E. M.; SHAN'GINA, O.; SCHWARTZ, S. M.; PURDUE, M. P.; PILARSKA, A.; ELUF-NETO, J.; MENEZES, A.; MCCLEAN, M. D.; MATOS, E.; KOIFMAN, S.; KELSEY, K. T.; HERRERO, R.; HAYES, R. B.; FRANCESCHI, S.; WUNSCH-FILHO, V.; FERNANDEZ, L.; DAUDT, A. W.; CURADO, M. P.; CHEN, C.; CASTELLSAGUE, X.; FERRO, G.; BRENNAN, P.; BOFFETTA, P.; HASHIBE, M. Sexual behaviours and the risk of head and neck cancers: a pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) consortium. **Int. J. Epidemiol.**, v. 39, n. 1, p. 166-181, 2010.

HENG, B.; GLENN, W. K.; YE, Y.; TRAN, B.; DELPRADO, W.; LUTZE-MANN, L.; WHITAKER, N. J.; LAWSON, J. S. Human papilloma virus is associated with breast cancer. **Br. J. Cancer**, v. 101, n. 8, p. 1345-1350, 2009.

HOCKING, J. S.; STEIN, A.; CONWAY, E. L.; REGAN, D.; GRULICH, A.; LAW, M.; BROTHERTON, J. M. Head and neck cancer in Australia between 1982 and 2005 show increasing incidence of potentially HPV-associated oropharyngeal cancers. **Br. J. Cancer**, v. 104, n. 5, p. 886-891, 2011.

HOULIHAN, C. F.; LARKE, N. L.; WATSON-JONES, D.; SMITH-MCCUNE, K. K.; SHIBOSKI, S.; GRAVITT, P. E.; SMITH, J. S.; KUHN, L.; WANG, C.; HAYES, R. HPV infection and increased risk of HIV acquisition. A systematic review and meta-analysis. **AIDS**, 2012.

HOWIE, H. L.; KATZENELLENBOGEN, R. A.; GALLOWAY, D. A. Papillomavirus E6 proteins. **Virology**, v. 384, n. 2, p. 324-334, 2009.

HOWLEY, P. M.; MUNGER, K.; ROMANCZUK, H.; SCHEFFNER, M.; HUIBREGTSE, J. M. Cellular targets of the oncoproteins encoded by the cancer associated human papillomaviruses. **Princess Takamatsu Symp.**, v. 22, p. 239-248, 1991.

HU, L.; PLAFKER, K.; VOROZHKO, V.; ZUNA, R. E.; HANIGAN, M. H.; GORBSKY, G. J.; PLAFKER, S. M.; ANGELETTI, P. C.; CERESA, B. P. Human papillomavirus 16 E5 induces bi-nucleated cell formation by cell-cell fusion. **Virology**, v. 384, n. 1, p. 125-134, 2009.

ILKOW, C. S.; GOPING, I. S.; HOBMAN, T. C. The Rubella virus capsid is an anti-apoptotic protein that attenuates the pore-forming ability of Bax. **PLoS Pathog.**, v. 7, n. 2, p. e1001291, 2011.

INTERNATIONAL COLLABORATION OF EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF CERVICAL CANCER. Cervical carcinoma and reproductive factors: collaborative reanalysis of individual data on 16,563 women with cervical carcinoma and 33,542 women without cervical carcinoma from 25 epidemiological studies. **Int. J. Cancer**, v. 119, p. 1108-1124, 2006.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - MINISTÉRIO DA SAÚDE. HPV e Câncer. 2012. Disponível em http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=327 . Acesso em: 15 mar. 2012.

JACOTOT, E.; FERRI, K. F.; EL HAMEL, C.; BRENNER, C.; DRUILLENNEC, S.; HOEBEKE, J.; RUSTIN, P.; METIVIER, D.; LENOIR, C.; GEUSKENS, M.; VIEIRA, H. L.; LOEFFLER, M.; BELZACQ, A. S.; BRIAND, J. P.; ZAMZAMI, N.; EDELMAN, L.; XIE, Z. H.; REED, J. C.; ROQUES, B. P.; KROEMER, G. Control of mitochondrial membrane permeabilization by adenine nucleotide translocator interacting with HIV-1 viral protein rR and Bcl-2. **J. Exp. Med.**, v. 193, n. 4, p. 509-519, 2001.

JOHANSSON, C.; SOMBERG, M.; LI, X.; BACKSTROM WINQUIST, E.; FAY, J.; RYAN, F.; PIM, D.; BANKS, L.; SCHWARTZ, S. HPV-16 E2 contributes to induction of HPV-16 late gene expression by inhibiting early polyadenylation. **EMBO J.**, 2012.

KAMINAGAKURA, E.; VILLA, L. L.; ANDREOLI, M. A.; SIMAO, J.; VARTANIAN, J. G.; SOARES, F. A.; NISHIMOTO, I. N.; ROCHA, R.; KOWALSKI, L. P. High-risk HPV in oral squamous cell carcinoma of young patients. **Int. J. Cancer**, v. 130, p. 1726-1732, 2011.

KANDA, T.; WATANABE, S.; ZANMA, S.; SATO, H.; FURUNO, A.; YOSHIIKE, K. Human papillomavirus type 16 E6 proteins with glycine substitution for cysteine in the metal-binding motif. **Virology**, v. 185, n. 2, p. 536-543, 1991.

KANELLOU, P.; ZARAVINOS, A.; ZIOGA, M.; STRATIGOS, A.; BARITAKI, S.; SOUFLA, G.; ZORAS, O.; SPANDIDOS, D. A. Genomic instability, mutations and expression analysis of the tumour suppressor genes p14(ARF), p15(INK4b), p16(INK4a) and p53 in actinic keratosis. **Cancer Lett.**, v. 264, n. 1, p. 145-161, 2008.

KARANAM, B.; GAMBHIRA, R.; PENG, S.; JAGU, S.; KIM, D. J.; KETNER, G. W.; STERN, P. L.; ADAMS, R. J.; RODEN, R. B. Vaccination with HPV16 L2E6E7 fusion protein in GPI-0100 adjuvant elicits protective humoral and cell-mediated immunity. **Vaccine**, v. 27, n. 7, p. 1040-1049, 2009.

KAVATI, E. A.; PALUMBO, A. C. M.; ANDRADE, F. B.; MARIGLIANI, B.; SAKAUCHI, D.; LEÃO, E.; ARMBRUSTER-MORAES, E.; MÜLLER, M.; CIANCIARULLO, A. M. Interaction of HPV16L1L2 VLP with Stem Cells CD34+/CD117+ of the Human Amniotic Fluid. In: Méndez-Vilas, A. (Ed.). **Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology**. Badajoz:Formatex Research Center, 2012, p. *In press*

KHAN, J.; DAVY, C. E.; MCINTOSH, P. B.; JACKSON, D. J.; HINZ, S.; WANG, Q.; DOORBAR, J. Role of calpain in the formation of human papillomavirus type 16 E1^{E4} amyloid fibers and reorganization of the keratin network. **J. Virol.**, v. 85, n. 19, p. 9984-9997, 2011.

KIM, M. K.; KIM, H. S.; KIM, S. H.; OH, J. M.; HAN, J. Y.; LIM, J. M.; JUHNN, Y. S.; SONG, Y. S. Human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein as a new target for cervical cancer treatment. **Biochem. Pharmacol.**, v. 80, n. 12, p. 1930-1935, 2010.

KIM, S. W.; YANG, J. S. Human papillomavirus type 16 E5 protein as a therapeutic target. **Yonsei Med. J.**, v. 47, n. 1, p. 1-14, 2006.

KLUCEVSEK, K.; WERTZ, M.; LUCCHI, J.; LESZCZYNSKI, A.; MOROIANU, J. Characterization of the nuclear localization signal of high risk HPV16 E2 protein. **Virology**, v. 360, n. 1, p. 191-198, 2007.

KORZENIEWSKI, N.; TREAT, B.; DUENSING, S. The HPV-16 E7 oncoprotein induces centriole multiplication through deregulation of Polo-like kinase 4 expression. **Mol. Cancer**, v. 10, p. 61, 2011.

KOSHIOL, J.; ROTUNNO, M.; GILLISON, M. L.; VAN DOORN, L. J.; CHATURVEDI, A. K.; TARANTINI, L.; SONG, H.; QUINT, W. G.; STRUIJK, L.; GOLDSTEIN, A. M.; HILDESHEIM, A.; TAYLOR, P. R.; WACHOLDER, S.; BERTAZZI, P. A.; LANDI, M. T.; CAPORASO, N. E. Assessment of human papillomavirus in lung tumor tissue. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 103, n. 6, p. 501-507, 2011.

KRAWCZYK, E.; SUPRYNOWICZ, F. A.; HEBERT, J. D.; KAMONJOH, C. M.; SCHLEGEL, R. The human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein translocates calpactin I to the perinuclear region. **J. Virol.**, v. 85, n. 21, p. 10968-10975, 2011.

KRAWCZYK, E.; SUPRYNOWICZ, F. A.; SUDARSHAN, S. R.; SCHLEGEL, R. Membrane orientation of the human papillomavirus type 16 E5 oncoprotein. **J. Virol.**, v. 84, n. 4, p. 1696-1703, 2010.

KREIMER, A. R.; CLIFFORD, G. M.; BOYLE, P.; FRANCESCHI, S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 14, n. 2, p. 467-475, 2005.

LANCELLOTTI, C. L. P.; LEVI, J. E.; SILVA, M. A. L. G.; SCHWARZSCHILD, M.; NICOLAU, S. M. Diagnóstico laboratorial. Citologia, histologia, imuno-histoquímica, microscopia eletrônica, biologia molecular. In: CARVALHO, J. M. M.; OYAKAWA, N. (Ed.). **I Consenso Brasileiro de HPV**. São Paulo: BG Cultural, 2000, p. 45-60.

LEVERRIER, S.; BERGAMASCHI, D.; GHALI, L.; OLA, A.; WARNES, G.; AKGUL, B.; BLIGHT, K.; GARCIA-ESCUADERO, R.; PENNA, A.; EDDAOUDI, A.; STOREY, A. Role of HPV E6 proteins in preventing UVB-induced release of pro-apoptotic factors from the mitochondria. **Apoptosis**, v. 12, n. 3, p. 549-560, 2007.

LIANG, X. H.; VOLKMANN, M.; KLEIN, R.; HERMAN, B.; LOCKETT, S. J. Co-localization of the tumor-suppressor protein p53 and human papillomavirus E6 protein in human cervical carcinoma cell lines. **Oncogene**, v. 8, n. 10, p. 2645-2652, 1993.

LIU, X.; DAKIC, A.; ZHANG, Y.; DAI, Y.; CHEN, R.; SCHLEGEL, R. HPV E6 protein interacts physically and functionally with the cellular telomerase complex. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 106, n. 44, p. 18780-18785, 2009.

LONGWORTH, M. S.; LAIMINS, L. A. The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc finger-like motifs of the E7 protein are essential for the life cycle of human papillomavirus type 31. **J. Virol.**, v. 78, n. 7, p. 3533-3541, 2004.

MANTOVANI, F.; BANKS, L. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. **Oncogene**, v. 20, n. 54, p. 7874-7887, 2001.

MARIANI, S. M. Conference report - apoptosis - a graceful death: highlights from the 2003 Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; July 11-14, 2003; Washington, DC. **MedGenMed**, v. 5, n. 4, p. 4, 2003.

MARIGLIANI, B.; KAVATI, E. A.; SAKAUCHI, D.; OLIVEIRA, H. B.; CANALI, R. A.; ARMBRUSTER-MORAES, E.; MÜLLER, M.; CIANCIARULLO, A. M. Intracellular distribution of recombinant Human Papillomavirus capsid proteins. In: Méndez-Vilas, A. (Ed.). **Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology**. Badajoz: Formatex Research Center, 2012, p. *In press*.

MARUR, S.; D'SOUZA, G.; WESTRA, W. H.; FORASTIERE, A. A. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. **Lancet Oncol.**, v. 11, n. 8, p. 781-789, 2010.

MASSON, M.; HINDELANG, C.; SIBLER, A. P.; SCHWALBACH, G.; TRAVE, G.; WEISS, E. Preferential nuclear localization of the human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein in cervical carcinoma cells. **J. Gen. Virol.**, v. 84, n. Pt 8, p. 2099-2104, 2003.

MAUFORT, J. P.; SHAI, A.; PITOT, H. C.; LAMBERT, P. F. A role for HPV16 E5 in cervical carcinogenesis. **Cancer Res.**, v. 70, n. 7, p. 2924-2931, 2010.

MCBRIDE, A. A.; MCPHILLIPS, M. G.; OLIVEIRA, J. G. Brd4: tethering, segregation and beyond. **Trends Microbiol.**, v. 12, n. 12, p. 527-529, 2004.

MCLAUGHLIN-DRUBIN, M. E.; MUNGER, K. The human papillomavirus E7 oncoprotein. **Virology**, v. 384, n. 2, p. 335-344, 2009.

MEEK, D. W. The p53 response to DNA damage. **DNA Repair**, v. 3, n. 8-9, p. 1049-1056, 2004.

MEISSNER, B.; ROGALSKI, T.; VIVEIROS, R.; WARNER, A.; PLASTINO, L.; LORCH, A.; GRANGER, L.; SEGALAT, L.; MOERMAN, D. G. Determining the sub-cellular localization of proteins within *Caenorhabditis elegans* body wall muscle. **PLoS One**, v. 6, n. 5, p. e19937, 2011.

MENDIZABAL-RUIZ, A. P.; MORALES, J. A.; RAMIREZ-JIRANO, L. J.; PADILLA-ROSAS, M.; MORAN-MOGUEL, M. C.; MONTROYA-FUENTES, H. Low frequency of human papillomavirus DNA in breast cancer tissue. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 114, n. 1, p. 189-194, 2009.

MESPLEDE, T.; GAGNON, D.; BERGERON-LABRECQUE, F.; AZAR, I.; SENECHAL, H.; COUTLEE, F.; ARCHAMBAULT, J. p53 Degradation Activity, Expression, and Subcellular Localization of E6 Proteins from 29 Human Papillomavirus Genotypes. **J. Virol.**, v. 86, n. 1, p. 94-107, 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. PORTAL DA SAÚDE. Especialistas alertam sobre o HPV. 2012. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=22444 . Acesso em: 20 jun. 2012.

MOHAMMADI, A.; PFEIFER, J. D.; LEWIS, J. S., JR. Association between human papillomavirus DNA and temporal arteritis. **BMC Musculoskelet Disord.**, v. 13, n. 1, p. 132, 2012.

MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nat. Rev. Cancer**, v. 10, n. 8, p. 550-560, 2010.

MOU, X.; CHEN, L.; LIU, F.; SHEN, Y.; WANG, H.; LI, Y.; YUAN, L.; LIN, J.; TENG, L.; XIANG, C. Low Prevalence of Human Papillomavirus (HPV) in Chinese Patients with Breast Cancer. **J. Int. Med. Res.**, v. 39, n. 5, p. 1636-1644, 2011.

MUNGER, K.; BASILE, J. R.; DUENSING, S.; EICHEN, A.; GONZALEZ, S. L.; GRACE, M.; ZACNY, V. L. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. **Oncogene**, v. 20, n. 54, p. 7888-7898, 2001.

MUNGER, K.; WERNESS, B. A.; DYSON, N.; PHELPS, W. C.; HARLOW, E.; HOWLEY, P. M. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. **EMBO J.**, v. 8, n. 13, p. 4099-4105, 1989.

MUNOZ, N.; CASTELLSAGUE, X.; DE GONZALEZ, A. B.; GISSMANN, L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**, v. 24 Suppl 3, p. S3/1-10, 2006.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. HPV and Cancer. 2012. Disponível em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Risk/HPV> . Acesso em: 13 jun 2012.

NGUYEN, C. L.; MUNGER, K. Human papillomavirus E7 protein deregulates mitosis via an association with nuclear mitotic apparatus protein 1. **J. Virol.**, v. 83, n. 4, p. 1700-1707, 2009.

NONNENMACHER, B.; BREITENBACH, V.; VILLA, L. L.; PROLLA, J. C.; BOZZETTI, M. C. Genital human papillomavirus infection identification by molecular biology among asymptomatic women. **Rev. Saude Publica**, v. 36, n. 1, p. 95-100, 2002.

OETKE, C.; AUVINEN, E.; PAWLITA, M.; ALONSO, A. Human papillomavirus type 16 E5 protein localizes to the Golgi apparatus but does not grossly affect cellular glycosylation. **Arch. Virol.**, v. 145, n. 10, p. 2183-2191, 2000.

OHTA, A.; NISHIYAMA, Y. Mitochondria and viruses. **Mitochondrion**, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2011.

OMURA, T. Mitochondria-targeting sequence, a multi-role sorting sequence recognized at all steps of protein import into mitochondria. **J. Biochem.**, v. 123, n. 6, p. 1010-1016, 1998.

PENG, S.; JI, H.; TRIMBLE, C.; HE, L.; TSAI, Y. C.; YEATERMEYER, J.; BOYD, D. A.; HUNG, C. F.; WU, T. C. Development of a DNA vaccine targeting human papillomavirus type 16 oncoprotein E6. **J. Virol.**, v. 78, n. 16, p. 8468-8476, 2004.

PEREZ, M.; GIL, A. O.; WROCLAWSKI, E. R.; GUIDI, H. G. C.; SCHIAVINI, J. L.; CARVALHO, J. J. M. HPV no homem. In: CARVALHO, J. J. M.; OYAKAWA, N. (Ed.). **I Consenso Brasileiro de HPV**. São Paulo: BG Cultural, 2000, p.7-16.

PHELPS, W. C.; MUNGER, K.; YEE, C. L.; BARNES, J. A.; HOWLEY, P. M. Structure-function analysis of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. **J. Virol.**, v. 66, n. 4, p. 2418-2427, 1992.

QIAGEN Inc. Regulation of BAX mediated apoptosis by BCL2 family members. 2011. Disponível em: <http://www.sabiosciences.com/pathwaymagazine/minireview/apoptosis.php> . Acesso em: 15 jun. 2012.

RABELO-SANTOS, S. H.; ZEFERINO, L.; VILLA, L. L.; SOBRINHO, J. P.; AMARAL, R. G.; MAGALHAES, A. V. Human papillomavirus prevalence among women with cervical intraepithelial neoplasia III and invasive cervical cancer from Goiania, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 2, p. 181-184, 2003.

RAJ, K.; BERGUERAND, S.; SOUTHERN, S.; DOORBAR, J.; BEARD, P. E1 empty set E4 protein of human papillomavirus type 16 associates with mitochondria. **J. Virol.**, v. 78, n. 13, p. 7199-7207, 2004.

REUSCHENBACH, M.; TRAN, T.; FAULSTICH, F.; HARTSCHUH, W.; VINOKUROVA, S.; KLOOR, M.; KRAUTKRAMER, E.; ZEIER, M.; VON KNEBEL DOEBERITZ, M.; SOMMERER, C. High-risk human papillomavirus in non-melanoma skin lesions from renal allograft recipients and immunocompetent patients. **Br. J. Cancer**, v. 104, n. 8, p. 1334-1341, 2011.

ROBERTS, S.; ASHMOLE, I.; GIBSON, L. J.; ROOKES, S. M.; BARTON, G. J.; GALLIMORE, P. H. Mutational analysis of human papillomavirus E4 proteins: identification of structural features important in the formation of cytoplasmic E4/cytokeratin networks in epithelial cells. **J. Virol.**, v. 68, n. 10, p. 6432-6445, 1994.

RODRIGUEZ, M. I.; FINBOW, M. E.; ALONSO, A. Binding of human papillomavirus 16 E5 to the 16 kDa subunit c (proteolipid) of the vacuolar H⁺-ATPase can be dissociated from the E5-mediated epidermal growth factor receptor overactivation. **Oncogene**, v. 19, n. 33, p. 3727-3732, 2000.

SAINSKI, A. M.; NATESAMPILLAI, S.; CUMMINS, N. W.; BREN, G. D.; TAYLOR, J.; SAENZ, D. T.; POESCHLA, E. M.; BADLEY, A. D. The HIV-1-specific protein Casp8p41 induces death of infected cells through Bax/Bak. **J. Virol.**, v. 85, n. 16, p. 7965-7975, 2011.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Molecular cloning. A laboratory manual. In: RUSSELL, D. W. (Ed.). **Molecular cloning. A laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, p. 1.24.

SCHEFFNER, M.; WERNESS, B. A.; HUIBREGTSE, J. M.; LEVINE, A. J.; HOWLEY, P. M. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. **Cell**, v. 63, n. 6, p. 1129-1136, 1990.

SCHLECHT, N. F.; KULAGA, S.; ROBITAILLE, J.; FERREIRA, S.; SANTOS, M.; MIYAMURA, R. A.; DUARTE-FRANCO, E.; ROHAN, T. E.; FERENCZY, A.; VILLA, L. L.; FRANCO, E. L. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. **JAMA**, v. 286, n. 24, p. 3106-3114, 2001.

SCHWALBACH, G.; SIBLER, A. P.; CHOULIER, L.; DERYCKERE, F.; WEISS, E. Production of fluorescent single-chain antibody fragments in Escherichia coli. **Protein Expr. Purif.**, v. 18, n. 2, p. 121-132, 2000.

SHERMAN, L.; SCHLEGEL, R. Serum- and calcium-induced differentiation of human keratinocytes is inhibited by the E6 oncoprotein of human papillomavirus type 16. **J. Virol.**, v. 70, n. 5, p. 3269-3279, 1996.

SIMMONDS, M.; STOREY, A. Identification of the regions of the HPV 5 E6 protein involved in Bak degradation and inhibition of apoptosis. **Int. J. Cancer**, v. 123, n. 10, p. 2260-2266, 2008.

SMITH, J. A.; WHITE, E. A.; SOWA, M. E.; POWELL, M. L.; OTTINGER, M.; HARPER, J. W.; HOWLEY, P. M. Genome-wide siRNA screen identifies SMCX, EP400, and Brd4 as E2-dependent regulators of human papillomavirus oncogene expression. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 107, n. 8, p. 3752-3757, 2010.

SMITH, K. T.; PATEL, K. R.; CAMPO, M. S. Papillomavirus research: a growth area. **Microbiol. Sci.**, v. 1, n. 1, p. 5-8, 1984.

SONNEX, C. Human papillomavirus infection with particular reference to genital disease. **J. Clin. Pathol.**, v. 51, n. 9, p. 643-648, 1998.

SPANOS, W. C.; GEIGER, J.; ANDERSON, M. E.; HARRIS, G. F.; BOSSLER, A. D.; SMITH, R. B.; KLINGELHUTZ, A. J.; LEE, J. H. Deletion of the PDZ motif of HPV16 E6 preventing immortalization and anchorage-independent growth in human tonsil epithelial cells. **Head Neck**, v. 30, n. 2, p. 139-147, 2008.

STEBEN, M.; DUARTE-FRANCO, E. Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology. **Gynecol. Oncol.**, v. 107, n. 2 Suppl 1, p. S2-5, 2007.

SUPRYNOWICZ, F. A.; DISBROW, G. L.; KRAWCZYK, E.; SIMIC, V.; LANTZKY, K.; SCHLEGEL, R. HPV-16 E5 oncoprotein upregulates lipid raft components caveolin-1 and ganglioside GM1 at the plasma membrane of cervical cells. **Oncogene**, v. 27, n. 8, p. 1071-1078, 2008.

TAKADA, S.; SHIRAKATA, Y.; KANENIWA, N.; KOIKE, K. Association of hepatitis B virus X protein with mitochondria causes mitochondrial aggregation at the nuclear periphery, leading to cell death. **Oncogene**, v. 18, n. 50, p. 6965-6973, 1999.

THIERRY, F. Transcriptional regulation of the papillomavirus oncogenes by cellular and viral transcription factors in cervical carcinoma. **Virology**, v. 384, n. 2, p. 375-379, 2009.

THOMAS, M.; BANKS, L. Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. **Oncogene**, v. 17, n. 23, p. 2943-2954, 1998.

THOMAS, M.; LAURA, R.; HEPNER, K.; GUCCIONE, E.; SAWYERS, C.; LASKY, L.; BANKS, L. Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the MAGI-2 and MAGI-3 proteins for degradation. **Oncogene**, v. 21, n. 33, p. 5088-5096, 2002.

THOMAS, M.; NARAYAN, N.; PIM, D.; TOMAIC, V.; MASSIMI, P.; NAGASAKA, K.; KRANJEC, C.; GAMMOH, N.; BANKS, L. Human papillomaviruses, cervical cancer and cell polarity. **Oncogene**, v. 27, n. 55, p. 7018-7030, 2008.

TINDLE, R. W. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, n. 1, p. 59-65, 2002.

TONG, X.; HOWLEY, P. M. The bovine papillomavirus E6 oncoprotein interacts with paxillin and disrupts the actin cytoskeleton. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 94, n. 9, p. 4412-4417, 1997.

TORRES, L. M.; PAEZ, M.; INSAURRALDE, A.; RODRIGUEZ, M. I.; CASTRO, A.; KASAMATSU, E. Detection of high risk human papillomavirus cervical infections by the hybrid capture in Asuncion, Paraguay. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 13, n. 3, p. 203-206, 2009.

TSAI, T. C.; CHEN, S. L. The biochemical and biological functions of human papillomavirus type 16 E5 protein. **Arch. Virol.**, v. 148, n. 8, p. 1445-1453, 2003.

TSAO, Y. P.; LI, L. Y.; TSAI, T. C.; CHEN, S. L. Human papillomavirus type 11 and 16 E5 represses p21(Waf1/Sdi1/Cip1) gene expression in fibroblasts and keratinocytes. **J. Virol.**, v. 70, n. 11, p. 7535-7539, 1996.

TUNGTEAKKHUN, S. S.; DUERKSEN-HUGHES, P. J. Cellular binding partners of the human papillomavirus E6 protein. **Arch. Virol.**, v. 153, n. 3, p. 397-408, 2008.

TYRING, S. K. Human papillomavirus infections: epidemiology, pathogenesis, and host immune response. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 43, n. 1 Pt 2, p. S18-26, 2000.

UNDERBRINK, M. P.; HOWIE, H. L.; BEDARD, K. M.; KOOP, J. I.; GALLOWAY, D. A. E6 proteins from multiple human betapapillomavirus types degrade Bak and protect keratinocytes from apoptosis after UVB irradiation. **J. Virol.**, v. 82, n. 21, p. 10408-10417, 2008.

UNGER, E. R.; DUARTE-FRANCO, E. Human papillomaviruses: into the new millennium. **Obstet. Gynecol. Clin. North. Am.**, v. 28, n. 4, p. 653-666, vii-viii, 2001.

VALDOVINOS-TORRES, H.; OROZCO-MORALES, M.; PEDROZA-SAAVEDRA, A.; PADILLA-NORIEGA, L.; ESQUIVEL-GUADARRAMA, F.; GUTIERREZ-XICOTENCATL, L. Different Isoforms of HPV-16 E7 Protein are Present in Cytoplasm and Nucleus. **Open Virol. J.**, v. 2, p. 15-23, 2008.

VANDE POL, S. B.; BROWN, M. C.; TURNER, C. E. Association of Bovine Papillomavirus Type 1 E6 oncoprotein with the focal adhesion protein paxillin through a conserved protein interaction motif. **Oncogene**, v. 16, n. 1, p. 43-52, 1998.

VOGT, M.; BUTZ, K.; DYMALLA, S.; SEMZOW, J.; HOPPE-SEYLER, F. Inhibition of Bax activity is crucial for the antiapoptotic function of the human papillomavirus E6 oncoprotein. **Oncogene**, v. 25, n. 29, p. 4009-4015, 2006.

VOOS, W.; MARTIN, H.; KRIMMER, T.; PFANNER, N. Mechanisms of protein translocation into mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1422, n. 3, p. 235-254, 1999.

WANG, C.; WRIGHT, T. C.; DENNY, L.; KUHN, L. Rapid rise in detection of human papillomavirus (HPV) infection soon after incident HIV infection among South African women. **J. Infect. Dis.**, v. 203, n. 4, p. 479-486, 2011.

WASILENKO, S. T.; BANADYGA, L.; BOND, D.; BARRY, M. The vaccinia virus F1L protein interacts with the proapoptotic protein Bak and inhibits Bak activation. **J. Virol.**, v. 79, n. 22, p. 14031-14043, 2005.

WEBSTER, K.; PARISH, J.; PANDYA, M.; STERN, P. L.; CLARKE, A. R.; GASTON, K. The human papillomavirus (HPV) 16 E2 protein induces apoptosis in the absence of other HPV proteins and via a p53-dependent pathway. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 1, p. 87-94, 2000.

WEYN, C.; VANDERWINDEN, J. M.; RASSCHAERT, J.; ENGLERT, Y.; FONTAINE, V. Regulation of human papillomavirus type 16 early gene expression in trophoblastic and cervical cells. **Virology**, v. 412, n. 1, p. 146-155, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Cancer. 2012. Disponível em: <http://www.who.int/tobacco/research/cancer/en/> . Acesso em: 21 jun. 2012.

XIAOCHENG, W.; WATSON, M.; CLEVELAND, J. L.; MARKOWITZ, L. Human Papillomavirus–Associated Cancers — United States, 2004–2008. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 61, n. 15, p. 258 - 260, 2012.

YAMANO, K.; TANAKA-YAMANO, S.; ENDO, T. Mdm10 as a dynamic constituent of the TOB/SAM complex directs coordinated assembly of Tom40. **EMBO Rep.**, v. 11, n. 3, p. 187-193, 2010.

YAMATO, K.; FEN, J.; KOBUCHI, H.; NASU, Y.; YAMADA, T.; NISHIHARA, T.; IKEDA, Y.; KIZAKI, M.; YOSHINOUCI, M. Induction of cell death in human papillomavirus 18-positive cervical cancer cells by E6 siRNA. **Cancer Gene Ther.**, v. 13, n. 3, p. 234-241, 2006.

YU, J. H.; LIN, B. Y.; DENG, W.; BROKER, T. R.; CHOW, L. T. Mitogen-activated protein kinases activate the nuclear localization sequence of human papillomavirus type 11 E1 DNA helicase to promote efficient nuclear import. **J. Virol.**, v. 81, n. 10, p. 5066-5078, 2007.

ZEHORAI, E.; YAO, Z.; PLOTNIKOV, A.; SEGER, R. The subcellular localization of MEK and ERK--a novel nuclear translocation signal (NTS) paves a way to the nucleus. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 314, n. 2, p. 213-220, 2010.

ZEMIRLI, N.; ARNOULT, D. Mitochondrial anti-viral immunity. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, 2012.

ZERFASS-THOME, K.; ZWERSCHKE, W.; MANNHARDT, B.; TINDLE, R.; BOTZ, J. W.; JANSEN-DURR, P. Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. **Oncogene**, v. 13, n. 11, p. 2323-2330, 1996.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News Physiol. Sci.**, v. 19, p. 124-128, 2004.

ZUR HAUSEN, H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1288, n. 2, p. F55-78, 1996.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, n. 5, p. 342-350, 2002.

ZUR HAUSEN, H.; DE VILLIERS, E. M. Human papillomaviruses. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 48, p. 427-447, 1994.

ZUR HAUSEN, J.; SCHULTE-HOLTHAUSEN, H.; WOLF, H.; DORRIES, K.; EGGER, H. Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. II. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human herpes group viruses. **Int. J. Cancer**, v. 13, n. 5, p. 657-664, 1974.