

ANDRESSA PALADINO

Estudo do controle da expressão gênica de RECK por oncoproteínas de
papilomavírus humano

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

São Paulo

2019

ANDRESSA PALADINO

Estudo do controle da expressão gênica de RECK por oncoproteínas de
papilomavírus humano

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

Área de Conhecimento: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Enrique Boccardo

Versão Original

São Paulo

2019

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Paladino, Andressa

Estudo do controle da expressão gênica de RECK
por oncoproteínas de papilomavírus humano / Andressa
Paladino; orientador Enrique Mario Boccoardo
Pierulivo. -- São Paulo, 2019.

90 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. HPV. 2. RECK. 3. Expressão gênica. 4.
Neoplasia do colo uterino. 5. Carcinogênese. I.
Mario Boccoardo Pierulivo, Enrique, orientador. II.
Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidata: Andressa Paladino

Título da Dissertação: Estudo do controle da expressão gênica de RECK por oncoproteínas de papilomavírus humano

Orientador: Enrique Mario Boccardo Pierulivo

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

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Examinador(a): Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

Presidente: Assinatura:.....
Nome:.....
Instituição:.....

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família e ao meu namorado pela confiança e apoio em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Enrique Boccardo, por ter me deixado fazer parte do seu grupo de pesquisa. Agradeço imensamente por todos os ensinamentos, pela paciência, por ajudar no meu crescimento profissional, por me orientar em todos os processos deste projeto e por realizar meu sonho de trabalhar com pesquisa.

A Prof. Dra. Luisa Villa e ao INCT do HPV, agradeço as discussões de resultados e as contribuições para este projeto.

Ao meu namorado Marcelo, por me ajudar nas figuras, nas leituras, nas buscas de papers sem fins (rs). Amor, obrigada por me incentivar e por me fazer acreditar que tudo era possível, mesmo nas horas mais difíceis. Tudo foi muito mais tranquilo e gostoso de ser realizado com você por perto.

A minha amiga Suellen, pela ajuda fundamental na elaboração desse projeto, do começo ao fim. Obrigada por acreditar em mim e me presentear com esse projeto maravilhoso. Agradeço a paciência, ensinamentos, companheirismo, e por todos os ensaios que fizemos lado a lado. Obrigada por todo o carinho neste projeto que só nos trouxe muita alegria. RECKets forever!!rs

Aos meus amigos Marcelo Ikeda e Paloma Venâncio pela irmandade e por acreditar em mim e compartilharem seus conhecimentos comigo e neste projeto.

Aos amigos de laboratório (Bruna Prati, Gabi, Filipe, Lucas, Vanesca, José Carlos, Aline, Telma) por toda a troca de experiências e pela ótima convivência.

Aos amigos da USP (Cairo Monteiro, Alexandre Campos) obrigada pelos ouvidos quando eu precisava desabafar e pelos materiais emprestados. Hehe

A todos o que não citei, mas que de alguma forma, contribuíram e muito neste projeto.

Aos membros da banca, agradeço por aceitarem meu convite, por ler, discutir e contribuir com esta dissertação.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A Universidade de São Paulo e aos órgãos de fomento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Processo 1680367), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo 2017/02997-3) e ao INCT – HPV, sem os quais este estudo não seria realizado.

EPÍGRAFE

*“ Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes. ”*

Marthin Luther King

RESUMO

PALADINO, A. **Estudo do controle da expressão gênica de RECK por oncoproteínas de papilomavírus humano**. 2019. 99 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

O desenvolvimento do câncer cervical está associado à infecção persistente por alguns tipos de papilomavírus humano (HPV). Entre os mecanismos de carcinogênese associados ao HPV incluem-se alterações em componentes da matriz extracelular (MEC), como as metaloproteinases de matriz (MMP) e alguns de seus reguladores negativos como a proteína supressora de tumor RECK (do inglês *REversion-inducing Cysteine-rich protein with Kazal motifs*). Resultados publicados previamente por nosso grupo apontam para a correlação entre a expressão da oncoproteína E7 de HPV16, a alta expressão e atividade de MMP-9 e a baixa expressão da proteína RECK. A expressão de RECK também é baixa em lesões do colo uterino de alto grau e em amostras de câncer cervical, quando comparadas a amostras de pacientes com cervicite. O presente estudo visou compreender o mecanismo de regulação da expressão do gene *RECK* por oncoproteínas de papilomavírus humano. Para isto, realizamos ensaios de gene repórter com construções contendo diferentes regiões do promotor do gene *RECK* em células que expressem as oncoproteínas E6 e E7 de HPV de alto e baixo risco oncogênico. Observamos que a atividade do promotor de RECK é regulada negativamente pela expressão de E6 e E7 de HPV11 e HPV16. Além disso, analisamos *in silico* as regiões do promotor clonadas e verificamos a presença de sítios de ligação para fatores de transcrição regulados por proteínas de HPV. Em conjunto, nossos dados mostram, pela primeira vez, a regulação da atividade do promotor do gene RECK por proteínas do HPV.

Palavras-chave: HPV. RECK. Expressão Gênica. Neoplasia do colo uterino. Carcinogênese.

ABSTRACT

Paladino A. **Study of the control of RECK gene expression by human papillomavirus oncoproteins.** 2019. 99 f. Dissertation (MSc in Microbiology) – São Paulo: Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, 2019.

The development of cervical cancer is associated with human papillomavirus (HPV) persistent infection. The HPV carcinogenic mechanisms include alterations in extracellular matrix (ECM) components, as matrix metalloproteinases (MMP) and its regulators such as the tumor suppressor RECK protein (REversion-inducing Cysteine-rich protein with Kazal motifs). Previous results published by our group point to the correlation among oncoprotein expression HPV16 E7, high activity expression of MMP-9 and low expression of RECK protein. RECK expression is also low in high-grade cervical squamous intraepithelial lesion and cervical cancer samples, when compared with with cervicitis. The present study aimed to understand the mechanisms associated with HPV E6 and E7 oncoprotein regulation of the RECK gene promoter. In order to do so, we transfected HEK293 cells (expressing or not HPV11 or HPV16 E6 and/or E7) with different RECK gene promoter constructions and performed gene reporter assays. We observed that HPV11 or HPV16 E6 and E7 expression is associated with lower RECK promoter activity. Moreover, we explored the potential transcriptional factors binding sites in the RECK gene promoter using *in silico* data. We found several binding sites for transcription factors that can be modulated by HPV E6 and E7 oncoproteins, such as p53, pRb, E2F, c-fos, c-jun and Sp1. Altogether, our data show, for the first time, that HPV E6 and E7 regulate the RECK gene promoter activity regulation.

Keywords: HPV. RECK. Gene Expression. Cervical Cancer. Carcinogenesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estimativa da incidência e mortalidade de câncer no Brasil e no Mundo.	17
Figura 2. Mapa genômico e morfologia da partícula viral do Papilomavírus humano.	19
Figura 3. Alterações teciduais e celulares em patologias associadas ao HPV.....	20
Figura 4. Representação esquemática da estrutura da proteína RECK. Esquema da estrutura da proteína RECK.....	25
Figura 5. Esquema das construções geradas com fragmentos do promotor do gene RECK.	30
Figura 6. Mapa do Vetor plasmidial pCR® 2.1-TOPO..	34
Figura 7. Mapa do Vetor plasmidial pGL4-Luc.	35
Figura 8. Análise dos produtos de PCR de diferentes regiões do promotor do gene RECK.....	40
Figura 9. Análise do produto da digestão dos vetores.....	41
Figura 10. Análise do produto da digestão do plasmídeo e fragmentos..	42
Figura 11. Seleção de clones para sequenciamento.	43
Figura 12. Confirmação de clonagem do promotor do gene RECK.....	44
Figura 13. Confirmação de clonagem do promotor do gene RECK.....	44
Figura 14. As proteínas E6 e E7 de HPV inibem a atividade transcricional do promotor de RECK.	46
Figura 15. Efeito da quantidade de E6 e E7 na atividade do promotor do gene RECK.	47
Figura 16. Efeito do Dissulfiram e da Doxorubicina na atividade do promotor de RECK.	48
Figura 17. Representação dos potenciais fatores de transcrição baseado na sequência da região alvo.....	49
Figura 18. Fluxograma das metodologias aplicadas no projeto.....	50
Figura 19. Modelo representativo do mecanismo de HPV com o gene RECK.	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Iniciadores utilizados para amplificar os diferentes fragmentos da região promotora do gene RECK.	30
Tabela 2. Condições de padronização para reação de PCR nas ampliações do promotor do gene RECK.....	31

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

CCL20 - do inglês Langerhans cell attracting chemokine

CDK – quinases dependentes de ciclinas

CIN – neoplasia intraepitelial cervical

CIP2A - inglês cancerous inhibitor of protein phosphatase 2A

CIS – carcinoma in situ

CDKI – inibidores de CDK

C/EBP β - do inglês CCAAT/Enhancer-binding Protein β

D10 – meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino

DNA - ácido desoxirribonucleico

DNMT – DNA metiltransferase

DNMT1 – DNA metiltransferase tipo 1

DSF – dissulfiram

DXR – doxorubicina

ER α – receptor de estrogênio α

EV epidermodisplasia verruciforme

EZH2 - do inglês enhancer of zeste homolog 2

GEO - do inglês Gene Expression Omnibus

GPI - glicosilfosfatidinositol

HDAC – histona deacetilase

HDAC1 – histona deacetilase tipo 1

HIF-1 α - fator induzível de hipóxia 1 α

HPV – Papilomavírus humano

HSIL – Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau

hTERT - do inglês human telomerase reverse transcriptase

INF- β – interferon β

LCR – do inglês long control region

LSIL – Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau

M10 – meio MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino

MEC – matriz extracelular

MMP – metaloproteinases de matriz

MSC – sítio múltiplo de clonagem

ORF – regiões codificantes

PHK – queratinócitos primários humanos

pRb – proteína do retinoblastoma

pRbAp46 – proteína associada à pRb

RECK - do inglês REversion-inducing Cysteine-rich protein with Kazal motifs

SPI – inibidores de Serina Protease

SNP - do inglês single nucleotide polymorphism,

TGF-beta1 - fator de crescimento tumoral beta

TIMP – do inglês tissue inhibitor of metalloproteinase

TIMP-2 - do inglês tissue inhibitor of metalloproteinase-2

TNF – fator de necrose tumoral

URR – região regulatória upstream

LISTA DE SÍMBOLOS

α – letra grega alfa

β – letra grega beta

κ - letra grega kappa

® - marca registrada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. <i>O Câncer de colo uterino.....</i>	17
1.2. <i>O Papilomavírus Humano (HPV).....</i>	18
1.3. <i>O HPV e a Matriz Extracelular (MEC).....</i>	23
2. OBJETIVOS.....	27
2.1. <i>Objetivo geral.....</i>	27
2.2. <i>Objetivos específicos.....</i>	27
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1. <i>Cultura de Células.....</i>	28
3.2. <i>Identificação do promotor do gene RECK.....</i>	28
3.3. <i>Extração de DNA.....</i>	28
3.4. <i>Desenho dos iniciadores.....</i>	29
3.5. <i>Construção de fragmentos para caracterização do promotor do gene RECK....</i>	30
3.6. <i>Padronização das reações em cadeia da polimerase (PCR).....</i>	31
3.7. <i>PCR convencional.....</i>	31
3.8. <i>Eletroforese em gel de agarose.....</i>	31
3.9. <i>Digestão com endonucleases de restrição.....</i>	32
3.10. <i>Sequenciamento dos fragmentos amplificados.....</i>	32
3.11. <i>Eletroeluição.....</i>	32
3.12. <i>Purificação com a técnica de membrana de DEAE-celulose.....</i>	33
3.13. <i>Clonagem dos produtos de PCR.....</i>	33
3.14. <i>Construção de vetores.....</i>	34
3.15. <i>Ensaio de Gene Repórter (Luciferase/Renilla Assay).....</i>	35
3.16. <i>Ensaio de expressão gênica com fármacos indutores de expressão de RECK...</i>	36
3.17. <i>Ensaio curva de dose.....</i>	36
3.18. <i>Obtenção de bactérias competentes.....</i>	37
3.19. <i>Transformação de bactérias competentes.....</i>	37
3.20. <i>Isolamento dos plasmídeos.....</i>	38
3.21. <i>Linhagem celular HEK293 estabelecidas com oncogenes E6 e E7.....</i>	38
3.22. <i>Análise estatística.....</i>	39
3.23. <i>Análise do fragmento do promotor de RECK com ferramentas in silico.....</i>	39

4.	RESULTADOS.....	40
4.1.	<i>Amplificação das regiões promotoras de RECK para clonagem.....</i>	40
4.2.	<i>Clonagem dos produtos de PCR.....</i>	41
4.3.	<i>Reação de sequenciamento.....</i>	43
4.4.	<i>Ensaio de Gene Repórter (Luciferase;Renilla Assay).....</i>	45
4.5.	<i>Identificação de sítios de ligação para fatores de transcrição na região promotora de RECK.....</i>	48
5.	DISCUSSÃO.....	51
5.1.	<i>Construção de vetores para caracterização do promotor do gene RECK.....</i>	51
5.2.	<i>Análise de fatores de transcrição na região promotora de RECK.....</i>	53
6.	CONCLUSÕES.....	59
	REFERÊNCIAS.....	60
	APÊNDICES.....	82

A incidência do câncer do colo de útero nas diferentes regiões do Brasil varia. Por exemplo, este tumor é mais comum na Região Norte (25/100 mil), seguido das Regiões Nordeste e Centro-Oeste (20/100 mil e 18/100 mil, respectivamente), a Região Sul (14/100 mil) e a Região Sudeste (10/100 mil) (INCA, 2017).

Nos países de baixa ou média renda, a infecção pelos vírus de papiloma humano (HPV) e da hepatite são responsáveis por até 25% dos casos de câncer (PLUMMER *et al.*, 2016). A infecção persistente pelo papilomavírus humano (HPV) é o principal fator de risco para o desenvolvimento de lesões precursoras do câncer de colo de útero (SCHLECHT *et al.*, 2001; FORMAN *et al.*, 2012). Além disso, outros fatores são apontados como importantes para o processo de carcinogênese do colo do útero: atividade sexual precoce, paridade, gravidez, imunossupressão, fumo, número de parceiros sexuais e ainda uso de contraceptivos (revisado por ZUR HAUSEN, 2002; FORMAN *et al.*, 2012).

1.2. O Papilomavírus Humano (HPV)

Os papilomavírus pertencem à família *Papillomaviridae* e, são vírus pequenos de DNA, icosaédricos, não envelopados e com tropismo para epitélios e mucosas (figura 2). Os papilomavírus humanos (HPV) são agrupados em 5 gêneros diferentes: alfa-, beta-, gama-, mu- e nu-papilomavírus (PAPILLOMAVIRUS EPISTEME (PAVE, [HTTPS://PAVE.NIAID.NIH.GOV/](https://pave.niaid.nih.gov/)); BERNARD *et al.*, 2010). Após a infecção inicial, o genoma do HPV está localizado no núcleo na forma episomal e possui uma região regulatória *upstream* (URR), oito regiões codificantes (ORFs) e dois sítios de poliadenilação. Os genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7 são genes precoces, conhecidos assim por serem expressos nas primeiras etapas do ciclo viral. L1 e L2, são genes tardios, pois atuam no final do ciclo de vida de HPV, codificando as proteínas para a formação do capsídeo (HEBNER; LAIMINS, 2006). A organização genômica do HPV é apresentada na figura 2.

A primeira associação entre o vírus HPV com o carcinoma cervical foi sugerida por Harald Zur Hausen, em 1976. Já em 1995, a IARC considerava HPV16 e HPV18 como agentes carcinogênicos em humanos. Em 1999, Walboormers e colaboradores (1999) mostraram a presença de DNA de vários tipos diferentes de HPV em 99,7% das amostras de câncer cervical de diferentes regiões do Mundo. Dados epidemiológicos mostram que 75% das mulheres que possuem vida sexualmente ativa já foram expostas

ao HPV, porém em sua maioria, as infecções são eliminadas em 1 ou 2 anos (TROTTIER; FRANCO, 2006).

O carcinoma cervical é uma doença de progressão lenta que se precede por lesões precursoras associadas à infecção persistente por HPV. Estas lesões precursoras podem ser diagnosticadas e detectadas precocemente por métodos específicos e, por conta disso, têm grandes chances de prevenção e também de cura. Existem duas estratégias importantes na prevenção do câncer de colo de útero, são elas: o teste do Papanicolau (exame citopatológico do colo do útero) e a vacinação (WHO, 2012).

O teste do Papanicolau é um método de rastreamento que diagnostica a doença por detecção de lesões precursoras. Este exame foi desenvolvido por Geórgios Papanicolau, por volta de 1940, e se tornou uma estratégia eficaz, pois quando detectadas nas fases iniciais a chance de cura das lesões é de 100%. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), é possível ter uma redução de 60 a 90% da incidência do carcinoma cervical invasivo se houver uma cobertura de pelo menos 80% da população-alvo em conjunto com tratamento e diagnóstico adequados (WHO, 2012).

Outro método de prevenção que diminui o risco de infecção persistente pelo HPV é a vacinação. Em 2014, o Ministério da Saúde, incorporou a vacina tetravalente para proteção contra os tipos de HPV 6, 11, 16 e 18 ao calendário de vacinação. Em conjunto, o Papanicolau e a vacinação se complementam como duas ações importantes na prevenção do câncer de colo de útero (INCA, 2019).

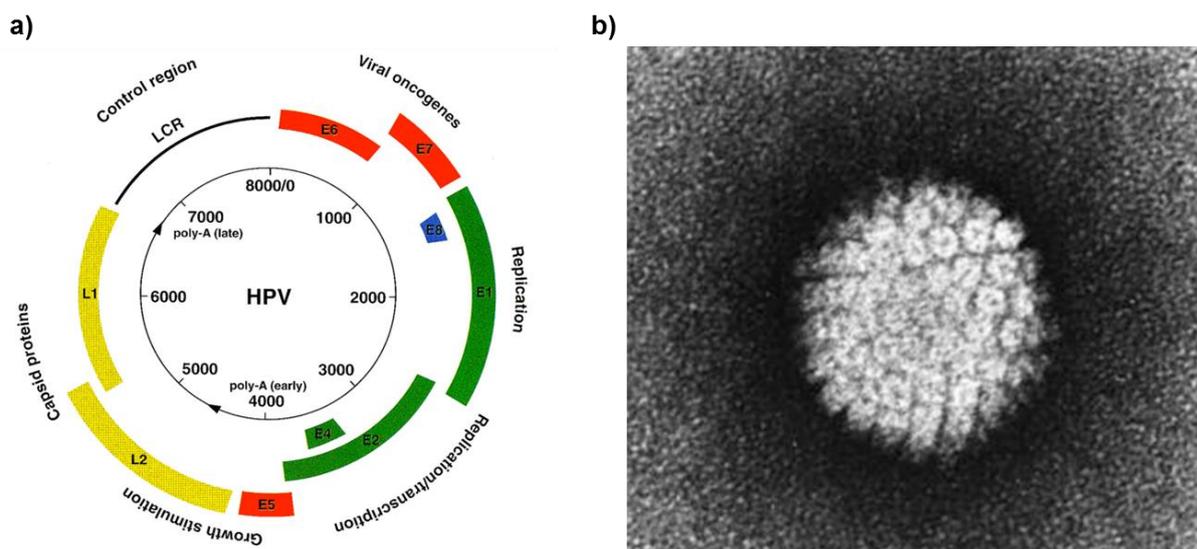


Figura 2. Mapa genômico e morfologia da partícula viral do Papilomavírus humano. a) O genoma do HPV é dividido em 3 regiões: a região regulatória (LCR, do inglês *long control region*), a região precoce composta pelos genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7 e a região tardia compostas pelos genes L1 e L2. b) Imagem do vírus por microscopia eletrônica.

As lesões precursoras do câncer de colo de útero foram classificadas por Richart (1973) como Neoplasias Intraepiteliais Cervicais (CIN – do inglês *cervical intraepithelial neoplasia*). Estas lesões estão divididas em 3 graus de comprometimento epitelial: CIN 1, CIN 2 e CIN 3 conforme descrito na figura 3. As lesões CIN 1 e um subgrupo de lesões CIN 2 são classificadas como lesões produtivas, onde o ciclo do vírus apresenta-se completo; em contrapartida, outro subgrupo de CIN 2 e as lesões da CIN 3 são precursores do câncer do colo do útero. No aspecto morfológico, as lesões CIN 3, que de fato são classificadas como carcinoma *in situ* (CIS), são consideradas como uma lesão precursora de um câncer cervical invasivo mais avançado (figura 3) (SOLOMON et al., 2002; NAYAR; WILBUR, 2015). Por outro lado, estas lesões precursoras podem ser classificadas como Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau (HSIL, do inglês *high-grade cervical squamous intraepithelial lesion*) ou Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau (LSIL, do inglês *low-grade squamous intraepithelial lesion*).

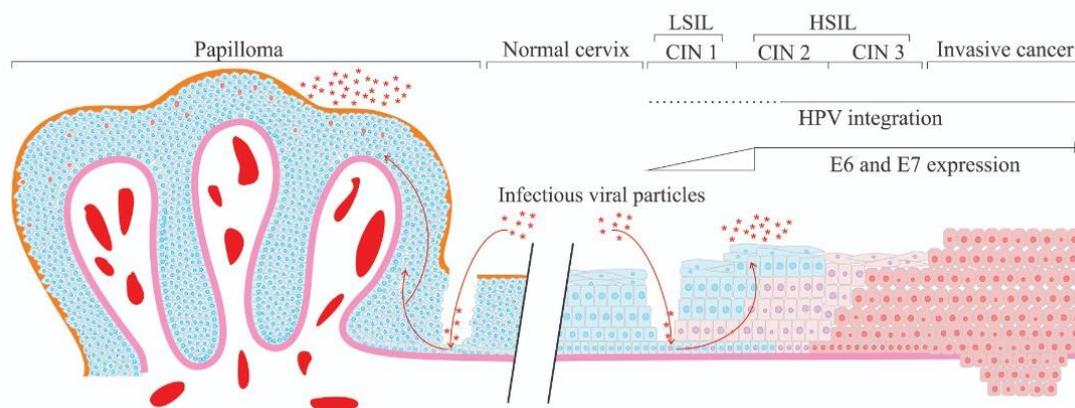


Figura 3. Alterações teciduais e celulares em patologias associadas ao HPV. As infecções por HPV estão associadas ao desenvolvimento de verrugas genitais, de pele e de lesões precursoras do câncer do colo do útero. O vírus do HPV inicia sua infecção quando chega à camada basal do epitélio por meio de microabrasões que expõem esta camada. As verrugas associadas ao HPV são caracterizadas pelo crescimento celular ou hiperplasia (não transformadora) da mucosa anogenital e pele, mediante a infecção viral produtiva. A infecção pelo HPV na epiderme da pele e mucosas pode gerar papilomatose, acantose, hiperqueratose e parakeratose. O genoma do HPV é encontrado em sua forma episossomal tanto nas neoplasias intraepiteliais cervicais de baixo grau (CIN 1/ LSIL) quanto nas verrugas. Em contrapartida, a integração do genoma do HPV e a expressão aumentada dos oncogenes E6 e E7 são características de um subgrupo de CIN 2/HSIL e da maioria das CIN 3/HSIL (alto grau) e carcinomas cervicais invasivos. De modo geral, as lesões associadas ao HPV são caracterizadas pela presença de queratinócitos com uma morfologia conhecida como coilócitos (morfologia atípica) que possuem aumento de tamanho celular e núcleos picnóticos delimitados por um halo perinuclear (adaptado de Herbster et al., 2018).

A infecção por HPV pode causar várias alterações teciduais diferentes como verrugas, papilomas anogenitais, neoplasias intraepiteliais, entre outros (IARC, 2007; FORMAN et. al., 2012). Este vírus inicia a infecção produtiva em células não diferenciadas de epitélios escamosos que são expostas ao vírus através de lesões no tecido. Seu ciclo de vida está associado ao programa de diferenciação dos epitélios escamosos que determina a disponibilidade de fatores celulares necessários para regular a replicação do genoma e a expressão das proteínas virais (ZUR HAUSEN, 2002; DOORBAR et. al., 2012) (figura 3).

Atualmente, mais de 200 tipos de HPV já foram descritos, destes por volta de 40 tipos podem infectar o trato anogenital ([HTTP://PAVE.NIAID.NIH.GOV](http://PAVE.NIAID.NIH.GOV); BERNARD et al., 2010). Os tipos de HPV que infectam a mucosa anogenital são classificados em “alto risco” ou “baixo risco” oncogênico de acordo com sua associação com o desenvolvimento de lesões precursoras do câncer cervical (FEHRMANN; LAIMINS, 2003). Os tipos de HPV de baixo risco oncogênico são 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e estão associados a verrugas genitais (IARC, 2012). A Agência Internacional em Pesquisa em Câncer (IARC) reconhece que existem pelo menos 13 tipos de HPV considerados de alto risco oncogênico. São eles: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68, sendo os mais comuns do tipo HPV16 e HPV18, que estão associados a 70% dos casos de câncer de colo de útero (IARC, 2007; IARC, 2012). Já os tipos HPV6 e HPV11, considerados como de baixo risco para o desenvolvimento de câncer de colo de útero, estão presentes em 90% das verrugas genitais e na quase totalidade dos papilomas respiratórios (INCA, 2015).

No caso de HPV de “alto risco” duas oncoproteínas se destacam: E6 e E7. Estas oncoproteínas exercem papel chave para o processo de transformação mediada por HPV, pois contribuem para a indução da proliferação celular e para imortalização de vários tipos celulares *in vitro* (BOULET *et al.*, 2007; KLINGELHUTZ; ROMAN, 2012).

As oncoproteínas E6 e E7 de HPV de “alto risco” interferem com duas das principais proteínas celulares supressoras de tumor, p53 e a proteína associada ao retinoblastoma (pRb), respectivamente. A proteína E6 interage com a proteína p53 induzindo sua degradação pela via de proteólise dependente de ubiquitina (TOMMASINO, 2014). De maneira semelhante, a proteína E7 leva à degradação da proteína do pRb (RUTTKAY-NEDECKY *et al.*, 2013). Além disso, essas proteínas virais afetam a função de outras proteínas importantes para regulação do crescimento celular, como as quinases dependentes de ciclinas (CDKs) e inibidores de CDKs (CDKIs)

(DYSON *et al.*, 1989; MUNGER *et al.*, 1989; BARBOSA *et al.*, 1990; WERNESS *et al.*, 1990; THOMAS; PIM; BANKS, 1999; LIU *et al.*, 2007; MCLAUGHLIN-DRUBIN; MUNGER, 2009).

A proteína E6 dos HPV de alto risco oncogênico tem aproximadamente 150 aminoácidos, e apresenta dois dedos de zinco. Esta proteína forma um complexo com a ubiquitina ligase (E6-AP) que se liga à região central da proteína celular p53, induzindo sua ubiquitinação e posterior degradação pela via de proteólise dependente de ubiquitina. Isto desregula importantes eventos celulares como a indução de apoptose e controle do ciclo celular (TOMMASINO, 2014). A oncoproteína E6 pode interagir com NFκB, Bak (membro da família Bcl-2), ativadores de transcrição CBP e p300, além da proteína ATR envolvida na sinalização de danos no DNA induzidos por UV.

Outras propriedades importantes de E6 estão representadas pela ativação da expressão da subunidade catalítica da telomerase, hTERT, do *inglês human telomerase reverse transcriptase*, por meio de interações com as proteínas NFX-1 e c-Myc contribuindo para imortalização celular. Um dos mecanismos associados a este efeito de E6 sobre a expressão de hTERT depende da sua interação com E6AP. O complexo E6/E6AP pode levar à redução dos níveis proteicos de NFX1-91, o que gera a ativação transcricional de hTERT. Além disso, o domínio PDZ presente em diversas proteínas interage com a extremidade C-terminal de E6 em HPV de alto risco (ZUR HAUSEN, 2002; TOMMASINO, 2014; MITTAL E BANKS, 2017). Esta interação pode afetar a adesão, polaridade e diferenciação celular permitindo a proliferação e a replicação viral em células infectadas por HPV (TONG AND HOWLEY, 1997).

A ligação de E6 com proteínas do citoesqueleto e de sinalização entre a célula e a matriz extracelular (MEC), como a paxilina, também leva a desestruturação das fibras de actina (TONG AND HOWLEY, 1997). A proteína E6 de HPV16 e HPV18 ainda regula a expressão de proteínas envolvidas na resposta imune inata ao alterar a resposta ao interferon β (INF-β) (RONCO *et al.*, 1998) e citocinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF) (HUANG; MCCANCE, 2002; BOCCARDO *et al.*, 2004) e inibe as vias de sinalização associadas a TLR9 (HASAN *et al.*, 2007; MORALE *et al.*, 2018).

A proteína E7 dos HPV de alto risco oncogênico tem aproximadamente 100 aminoácidos e possui domínios proteicos de ligação a átomos de zinco (TOMMASINO, 2014). Essa proteína é capaz de interagir com vários fatores que regulam a proliferação

celular, especialmente os que atuam na transição entre as fases G1 e S do ciclo celular. Isto inclui interações com outras proteínas da família do pRb (p107 e p130) que estão associados a membros da família E2F, histona deacetilase (HDAC), o fator de transcrição AP-1 e as ciclinas A, D, E (FUNK *et al.*, 1997; THOMAS; LAIMINS, 1998; MÜNGER, 2009; SPARDY *et al.*, 2009; TOMMASINO, 2014). Ademais, E7 atua na desregulação do ciclo celular interagindo com p21WAF1/CIP1 e p27KIP1 (conhecidos como inibidores de CDK) e promove a translocação nuclear do complexo IKK e NP73, que posteriormente associam-se com DNMT1 (DNA metiltransferase tipo 1) e EZH2, do inglês *enhancer of zeste homolog 2*. E vale ressaltar que a expressão de E7 também tem associação com níveis proteicos reduzidos de hTERT (TOMMASINO, 2014).

Por fim, foi observado que a proteína E7 é capaz de induzir aneuploidia, erros de segregação cromossômica e perda de fidelidade mitótica através da indução da amplificação dos centríolos e da indução de quebras no DNA (DUENSING; MÜNGER, 2002; GHITTONI *et al.*, 2010; KORZENIEWSKI *et al.*, 2011A, KORZENIEWSKI *et al.*, 2011B). Em conjunto, estes eventos contribuem para o desenvolvimento do fenótipo maligno associado ao HPV (ZUR HAUSEN, 2002; MITTAL E BANKS, 2017).

1.3. O HPV e Matriz Extracelular (MEC)

A matriz extracelular (MEC) é considerada como fonte de reserva de fatores de crescimento e de remodelamento de tecidos, sendo composta por proteínas especializadas e estruturais, proteoglicanos e glicosaminoglicanos, (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2004; BISSELL; LABARGE, 2005). As metaloproteinases de matriz (MMPs) são um grupo de proteases zinco dependentes que regula vários processos fisiológicos associados ao remodelamento de componentes da matriz extracelular (MEC). As MMPs são responsáveis pela degradação da MEC e sua expressão aumentada desempenha um papel importante na invasão e progressão tumoral (MYSLIWIEC *et al.*, 2002; SHEU *et al.*, 2003).

Algumas alterações moleculares associadas ao papel carcinogênico do HPV incluem a interferência na expressão e atividade de metaloproteinases de matriz (MMP) e de seus reguladores negativos, como a proteína RECK (do inglês *REversion-inducing Cysteine-rich protein with Kazal motifs*) que atua como supressora de MMPs e angiogênese (OH *et al.*, 2001; SHEU *et al.*, 2003; CARDEAL *et al.*, 2006; CLARK *et al.*, 2007; CARDEAL *et al.*, 2012).

Dados gerados anteriormente por nosso grupo demonstraram que a expressão da oncoproteína E7 de HPV16 se associa com a redução da expressão proteica de RECK em culturas organotípicas de queratinócitos primários. Neste trabalho, observamos ainda uma associação direta entre a expressão de E7 e a expressão e atividade de MMP-9, molécula cuja função pode ser modulada pela proteína RECK (CARDEAL *et al.*, 2012). Nosso grupo também avaliou a expressão e atividade de diferentes MMP (MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP) e seu inibidor TIMP-2 (do inglês *tissue inhibitor of metalloproteinase-2*) em três linhagens celulares derivadas de carcinomas cervicais invasivos. Neste estudo foi observada uma maior expressão de MMP-2, MT1-MMP, e de TIMP-2 em linhagens celulares derivadas de tumores da cérvix uterina infectadas por HPV quando comparadas a uma linhagem HPV negativa. Por outro lado, observamos uma baixa expressão do mRNA de MMP-9 em todas as linhagens derivadas de tumores da cérvix uterina avaliadas (CARDEAL *et al.*, 2006). Estes resultados sugerem que a presença de HPV pode estar associada ao aumento de expressão e/ou atividade de MMP-2, MT1-MMP, TIMP-2 e MMP9 em carcinoma de cérvix uterina (CARDEAL *et al.*, 2006).

A descoberta inicial da proteína RECK ocorreu por meio de uma biblioteca de cDNA de fibroblastos humanos que apresentavam mutação no gene *Ki-ras* associado com o fenótipo de células não planas (NODA *et al.*, 1989; TAKAHASHI *et al.*, 1998b). O gene *RECK* hoje é considerado um supressor de tumor e codifica uma proteína com 971 aminoácidos (TAKAHASHI *et al.*, 1998b; NODA, 2003). Entre suas funções conhecidas estão incluídas o remodelamento de tecidos, maturação e organização de vasos durante a embriogênese e interferência na angiogênese tumoral por meio de regulação pós-transcricional da atividade de MMP (OH *et al.*, 2001). O gene *RECK* está localizado na região cromossômica 9p13 → p12, encontra-se em uma extensão de 87 kb no genoma humano e inclui 20 íntrons, 21 éxons e 13 SNPs, do inglês *single nucleotide polymorphism*, conhecidos. Curiosamente, no braço curto do cromossomo 9 foi identificada a presença de uma série de genes supressores de tumor, que inclui o gene p16^{INK4a} (KIM *et al.*, 1997; EISENBERG *et al.*, 2002).

A proteína RECK é formada por uma região hidrofóbica nas duas extremidades, N-terminal e C-terminal. A região N-terminal possui cinco regiões com repetições de cisteína e a C-terminal contém um sinal de ancoragem à membrana por meio de glicosilfosfatidinositol (GPI). Além disso, RECK possui também três domínios que atuam como Inibidores de Serina Protease (SPI - do inglês *serine protease inhibitor*) que apresentam motivos Kazal, duas regiões semelhantes ao Fator de Crescimento Epidérmico (EGF) e cinco sítios de glicosilação (TAKAHASHI et al., 1998b; NODA et al., 2003) (figura 4). Um esquema da estrutura da proteína RECK é apresentado na figura 4. Recentemente, Trombetta-Lima e colaboradores (2015) demonstraram que o RNAm de RECK pode sofrer *splicing* alternativo resultando em uma isoforma denominada RECK B (1,548bp).

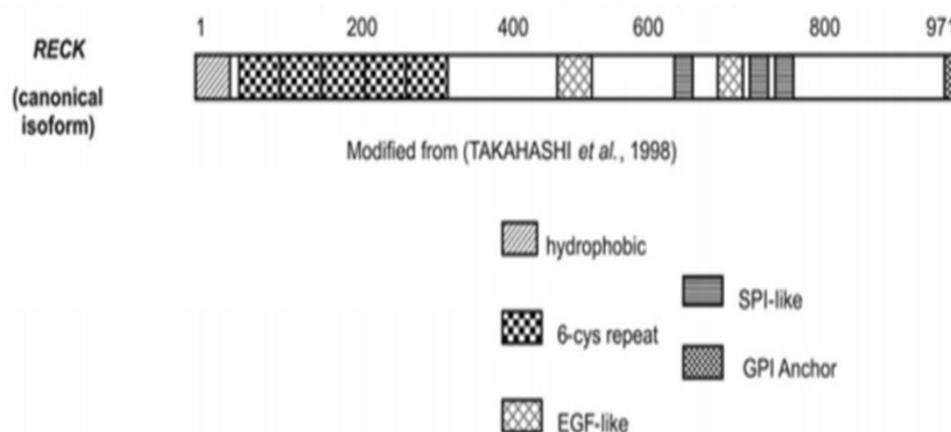


Figura 4. Representação esquemática da estrutura da proteína RECK. **Esquema da estrutura da proteína RECK.** Esta proteína apresenta regiões hidrofóbicas, repetições de cisteína, domínios dos tipos Fator de Crescimento Epidérmico (GFP) e Inibidor Serina Protease (SPI) e região de ancoragem através de uma molécula de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (adaptado de TAKAHASHI et al., 1998; NODA et al., 2003).

Trabalhos anteriores estabeleceram que TIMP-2 regula positivamente a expressão de RECK em células endoteliais (OH *et al.*, 2006). Além disso, diversos oncogenes como, por exemplo, *Ras*, podem regular negativamente a expressão de RECK (MENG *et al.*, 2008).

Considerando a regulação da expressão de RECK, foi observado que a expressão de seu mRNA estava reduzida diante da atividade aumentada de *Ras* (TAKAHASHI et al., 1998b). Sasahara e colaboradores (1999) indicaram que a proteína *Ras* quando ativa a via ERK, pode facilitar a fosforilação e outras modificações de fatores de transcrição, como por exemplo, Sp1. Estas alterações em Sp1 vão facilitar a ligação na região

promotora do gene RECK, reduzindo a sua expressão. Este trabalho ainda destacou que o papel de Sp1 na repressão gênica de RECK pode depender da interação ou formação de complexo Sp1/HDAC. Ainda, estes autores discutem que a regulação da expressão de RECK pode variar para cada tipo de tumor e que este evento pode ser dependente do status de expressão e função de Sp1 em cada tipo de tumor avaliado. De fato, já foi observado anteriormente que a expressão proteica de Sp1 pode ser regulada positivamente em várias neoplasias humanas e que este evento pode contribuir para a transformação celular (LOU et al., 2005; KANAI et al., 2006).

Diferentes estudos demonstraram que RECK possui um valor prognóstico para alguns tipos de tumor, como câncer de mama, carcinoma pancreático e hepatocarcinoma. De maneira geral, estes trabalhos descrevem que este valor prognóstico da expressão de RECK para estes tumores pode depender da sua função clássica de inibição da atividade de MMP específicas. Entretanto, os mecanismos alternativos pelos quais a alta expressão de RECK apresenta associação com o melhor prognóstico de pacientes com estes tipos de tumores ainda não foram estabelecidos (FURUMOTO et al., 2001; SPAN et al., 2003; MASUI et al., 2003).

Min e seus colaboradores (2009) utilizaram siRNA para silenciar a oncoproteína E6 de HPV18 e assim, analisar o seu efeito sobre a expressão de mRNA global desta linhagem celular. Dentre outros alvos, a lista apresentada de genes diferencialmente expressos quando E6 foi silenciado descreveu um aumento de cinco vezes na expressão do mRNA de RECK em comparação com a linhagem controle (Min et al., 2009).

Algo que nos chamou atenção é o fato de haver regiões responsivas ao fator de transcrição E2F no promotor de RECK, o que poderia atuar na repressão da expressão de RECK uma vez liberado de pRb via ação de E7. A família de fatores de transcrição E2F apresenta papel central na regulação do ciclo celular e da morte celular por apoptose ao ativar, reprimir ou inibir a expressão de diversos fatores críticos para estes eventos celulares (ERTOSUN; HAPIL; OZES, 2016).

Dados do nosso grupo indicam que algumas proteínas de HPV exercem uma regulação negativa sobre os níveis de mRNA e de proteína de RECK. Além disso, foi observado que a baixa expressão de RECK ocorre em pacientes com lesões de alto grau do colo do útero e câncer cervical, mas não em pacientes com cervicite (CARDEAL et al., 2006; CARDEAL et al., 2012; DISCACCIATI et al., 2015). No entanto, os mecanismos moleculares através dos quais as oncoproteínas virais regulam a expressão do gene *RECK* ainda não foram analisados em profundidade.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Avaliar o efeito da expressão das proteínas E6 e E7 de HPV sobre a atividade da região promotora do gene *RECK*.

2.2. Objetivos específicos

- Gerar construções contendo a sequência completa do promotor do gene *RECK* e fragmentos do mesmo à montante do gene da Luciferase;
- Realizar ensaios de gene repórter com as construções descritas em células HEK293 que expressem as proteínas E6 e/ou E7 de HPV 16 e HPV11;
- Realizar uma varredura do promotor de *RECK* para identificar sítios de ligação de fatores de transcrição conhecidos que possam estar associados à regulação da expressão deste gene;
- Uma vez identificada a região essencial para a regulação da expressão do gene *RECK* pelas proteínas E6 e/ou E7, os dados *in silico* e *in vitro* serão reunidos para apontarmos os prováveis fatores envolvidos neste fenômeno.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cultura de Células

As linhagens celulares derivadas de tumores da cérvix uterina positivos para HPV16 (SiHa), HPV18 (HeLa) foram cultivadas em meio Eagle MEM (meio mínimo essencial - Vitrocell®) suplementado com 10% de soro fetal bovino (M10), em estufa úmida, a 37°C, e com 5% de CO₂. A linhagem derivada de fibroblasto de camundongo (NIH3T3 ATCC) e a derivada de rim embrionário humano (HEK293) foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium - SIGMA®) suplementado com 10% de soro fetal bovino (M10), em estufa úmida, a 37°C, e com 5% de CO₂. A linhagem derivada de queratinócitos primários humanos (PHK) foram cultivadas em meio KSFM suplementado com fator de crescimento epidérmico (5 ng/mL) e extrato de pituitária bovina (50 ug/mL), em estufa úmida, a 37°C, e com 5% de CO₂.

3.2. Identificação do promotor do gene *RECK*

A região promotora do gene *RECK* foi identificada a partir da sequência depositada no GenBank (RECK: NC_000009.12 - 36036913..36124455) Esta sequência do promotor de RECK em formato de FASTA foi submetida a previsão de regiões responsivas a fatores de transcrição com a ferramenta online PROMO (<http://algggen.lsi.upc.es/home.html>).

3.3. Extração de DNA

O DNA foi extraído através da digestão com Proteinase K (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA) conforme instrução do fabricante. Esse passo de digestão foi efetuado em banho a 56 ° C até total digestão do tecido. Cada microtubo de centrifuga, contendo o tecido, foi acrescido de 500 µL de solução de Lise seguindo o descrito por Shi e cols. (2002). Nesta solução, Tris-HCl 10 mM pH8,0; EDTA 1mM pH 8,0; SDS 1% e Proteinase K 1mg/mL, adicionamos Proteinase K (0,4 % final), se após 12 horas o tecido não estivesse totalmente digerido. Após essa digestão, foi realizado uma etapa de extração orgânica utilizando o reagente “ULTRAPURE™ Phenol:Chloroform:Isoamyl alcohol” (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA) O DNA contido na fase aquosa resultante foi precipitado utilizando acetato de sódio e etanol 100 % durante 18 horas a temperatura de

-20 ° C. O pellet foi coletado e lavado com etanol 75 % por centrifugação e ressuspenso em água purificada estéril. A concentração do DNA foi determinada pela absorbância à 260 nm.

3.4. Desenho dos iniciadores

A partir da sequência localizada na base de dados, identificamos o início da região codificadora (ATG) e selecionamos cerca de 2200 nucleotídeos a montante. Cada iniciador foi desenhado com a finalidade de amplificar fragmentos específicos da região promotora do gene RECK, sendo que todos os fragmentos obtidos devem incluir o sítio de início da transcrição (Tabela 1, Figura 5, Apêndice 1). Todos os iniciadores possuíam aproximadamente 20 nucleotídeos e deviam gerar fragmentos entre 339pb e 2043pb. A qualidade dos iniciadores foi verificada quanto à formação de estruturas secundárias, utilizando a ferramenta <https://www.idtdna.com/calc/analyser>. As sequências foram submetidas à plataforma do GenBank para avaliar a especificidade, por meio do BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

Todos os iniciadores (*forward* e *reverse*) foram desenhados apresentando um sítio de digestão para endonucleases na extremidade 5', sendo adicionados oligonucleotídeos na sequência *forward* correspondentes ao sítio de restrição da enzima *Acc65I*, e da mesma maneira, oligonucleotídeos correspondentes ao sítio de restrição da enzima *BglII*, na sequência *reverse*. Essas enzimas de restrição foram selecionadas de modo que não apresentassem sítios alvo na região promotora do gene *RECK* e apresentassem um sítio de corte único no *MCS* (*multiple cloning site*) do vetor *pLG4-Luc*, facilitando a clonagem dos fragmentos. Os iniciadores utilizados e o tamanho esperado dos amplificadores gerados estão descritos na tabela 2.

Tabela 1. Iniciadores utilizados para amplificar os diferentes fragmentos da região promotora do gene RECK.

Promotor RECK (tamanho fragmento)	Sequências F (5' → 3')	Sequências R (5' → 3')
Completo (2043pb)	GCTATC GGTACC CTTACCCCAACTGCCAAAGC	CGTATA AGATCT CTTTGGTGACTGGCTGCGGC
Região 1 (1787pb)	GCTATC GGTACC TTACTCTCAGAGGGGAATTG	CGTATA AGATCT CTTTGGTGACTGGCTGCGGC
Região 2 (1365pb)	GCTATC GGTACC AGCAACAGAGTCATCAGAGG	CGTATA AGATCT CTTTGGTGACTGGCTGCGGC
Região 3 (1126pb)	GCTATC GGTACC TAGCCCCAGGTGTCTTCATG	CGTATA AGATCT CTTTGGTGACTGGCTGCGGC
Região 4 (758pb)	GCTATC GGTACC TGCTTGAGGCGAGGAGTTCG	CGTATA AGATCT CTTTGGTGACTGGCTGCGGC
Região 5 (339pb)	GCTATC GGTACC AGAGAAGCCCCTTTGGTTCG	CGTATA AGATCT CTTTGGTGACTGGCTGCGGC

A = Adenina; C = Citosina; G = Guanina; N = Base nitrogenada; T = Timina; F = forward; R = reverse. Em azul, encontra-se o sítio de restrição para a enzima *Acc65I*, e em rosa, o sítio para a enzima *BglII*.

3.5. Construção de fragmentos para caracterização do promotor do gene RECK

Inicialmente, desenhamos iniciadores através da sequência do promotor, que geravam 6 fragmentos específicos: o promotor completo ou fragmentos proximais que nomeamos como regiões 1, 2, 3, 4 e 5, conforme esquema da figura 5.

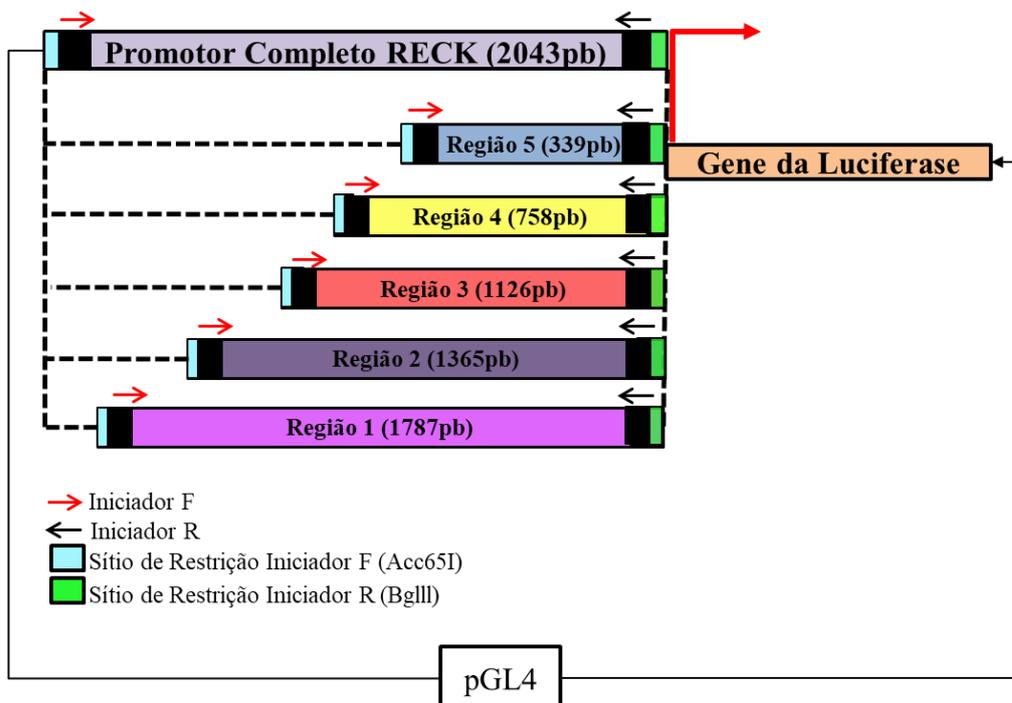


Figura 5. Esquema das construções geradas com fragmentos do promotor do gene RECK. Os diferentes fragmentos do promotor do gene RECK foram amplificados utilizando os iniciadores descritos na tabela 1. Após purificação, os fragmentos foram digeridos com a enzima de restrição (ER) descritas e ligados ao vetor pGL4-Luc.

3.6. Padronização das reações em cadeia da polimerase (PCR)

A amplificação dos fragmentos para análise do gene *RECK* foi realizada a partir de DNA purificado de SiHa, HeLa e NIH 3T3 ATCC. Para padronização da PCR para amplificação dos diferentes fragmentos do promotor, testamos diferentes condições de reações (tabela 2).

Tabela 2. Condições de padronização para reação de PCR nas amplificações do promotor do gene RECK.

Iniciadores	[] de MgCl₂	Temperatura de anelamento
Região 3 (1126pb)	2 mM	65 °C
Região 4 (758pb)	2 mM	67,5 °C
Região 5 (339pb)	2 mM	65 °C

3.7. PCR convencional

A PCR convencional foi padronizada em um volume final de 20 µL contendo uma concentração de 2 mM de MgCl₂, 2 µL de tampão de PCR 10 X, 0,2 mM de cada dNTP, 0,2 µM de P5, 0,2 µM de R1 e 0,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, California, USA). A amplificação foi feita no termociclador, da seguinte forma: 10 minutos a 95 °C a 95 °C por 1 minuto, 60 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto repetidos por 40 ciclos e uma extensão final a 72 °C por 10 minutos.

3.8. Eletroforese em gel de agarose

A amplificação do DNA foi visualizada por eletroforese em gel de agarose 1%. Para o tampão de corrida foi utilizado uma solução Tris Borato 90mM; EDTA 2 mM (TBE) 1X, contendo corante intercalante GelRed (Invitrogen, California, USA) conforme instruções do fabricante. A cada 5 µL de DNA (200ng) foi adicionado 1 µL de tampão de carregamento 6X, sendo esta mistura aplicada no gel. O tampão de carregamento é

composto de glicerol 60% (V/V) e azul de bromofenol 0,04% (P/V). A eletroforese foi realizada a 5 V/cm² em cuba horizontal (Bio-Rad, California, USA). Os fragmentos de DNA foram visualizados em um transiluminador (UVP High Performance Transilluminator).

3.9. Digestão com endonucleases de restrição

Para a digestão simples dos vetores de Luciferase (pGL4.10) e Renilla (pGL4.73) usamos a enzima BamHI (New England Biolabs, USA) por 4 horas, conforme instruções do fabricante. Para a digestão dupla dos vetores de Luciferase (pGL4.10) e dos fragmentos construídos com diferentes tamanhos do promotor de RECK, foram utilizados 3 uL de água; 1 uL de Anza 10X Red Buffer; 0,5 uL de enzima Acc65I (New England Biolabs, USA) e 0,5 uL de BglIII Acc65I (New England Biolabs, USA); 5 uL de DNA (200ng a 1ug), incubados por 12 horas a 37 °C, conforme instruções do fabricante.

3.10. Sequenciamento dos fragmentos amplificados

O sequenciamento das amostras de DNA de interesse foi realizado utilizando The BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo-Fisher Scientific, USA), segundo instruções do fabricante. Homogeneizamos a amostra e transferimos para o termociclador apropriado com o programa de ciclagem com as seguintes etapas: 96 °C por 2 minutos; 96 °C por 45 segundos; 50 °C por 30 segundos; 60 °C por 4 minutos, repetidos por 35 ciclos, e 4 °C infinito. O sequenciamento foi realizado na Central Analítica do IQ-USP.

3.11. Eletroeluição

As bandas de interesse foram alocadas com TAE 1X em sacos de diálise cujas extremidades foram fechadas com fios de Nylon e com prendedores plásticos específicos. Foram então colocados na cuba de eletroforese a 100V até a amostra sair completamente do gel.

Os géis foram descartados e os sacos de diálise contendo as amostras foram deixados submersos em água Milli-Q por 16h para purificação. Os materiais diluídos dos sacos foram recuperados e alocados em microtubos, sendo precipitados com adição de 10% do volume de Acetato de sódio, 2,5X volume total de Etanol 100% e mantidos por

16h a -20°C . Por fim, o material foi lavado com Etanol 75% gelado e ressuspendidos em 30 μl de água pura.

3.12. *Purificação com a técnica de membrana de DEAE-celulose*

Os fragmentos foram purificados através da técnica de interceptação do produto de eletroforese por uma membrana de DEAE-celulose (Schleicher & Schuell, Germany). O produto final foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% corado por brometo de etídio a 0,5%. Em seguida, com o auxílio de um estilete, abriu-se uma fenda no gel na frente da banda desejada. Com uma pinça colocou-se a membrana devidamente tratada (imersa em água destilada e deionizada a 4°C), na fenda. Prosseguiu-se a corrida eletroforética até que todo o fragmento estivesse ligado à membrana (aproximadamente 15 minutos a 90 volts). A membrana foi então removida do gel, e imersa em um tampão de baixo sal (NaCl 0,15 M, EDTA 0,1 mM, Tris 20 mM), a fim de retirar impurezas, incluindo o excesso de agarose retido na membrana. Em seguida, a membrana foi imersa em tampão de alto sal (NaCl 1 M, EDTA 0,1 mM, Tris 20 mM) e incubada a 65°C por 30 minutos; este procedimento foi repetido por mais uma vez. Ao término destas incubações o fragmento estava liberado da membrana conforme observado após exposição da mesma sob luz ultravioleta. Com o objetivo de retirar o brometo de etídio residual do fragmento de DNA, a fase aquosa foi extraída por fenol-clorofórmio-álcool isoamílico e precipitada por 2,5 volumes de etanol 100% e 0,1 volumes de acetato de sódio 3 M por 1 hora a -70°C . Seguiu-se a lavagem com etanol 95% para a retirada do excesso de sal e secagem do sedimento a vácuo. Finalmente, o precipitado foi ressuspendido em 20 μL de água destilada e deionizada.

3.13. *Clonagem dos produtos de PCR*

Com as amostras amplificadas, seus produtos de PCR de interesse foram ligados ao vetor pCR[®] 2.1-TOPO (4.0 Kb), material constituinte do “TA-TOPO cloning kit” (figura 6), código K450002 (Invitrogen, Carlsbad, California, EUA), conforme instruções do fabricante.

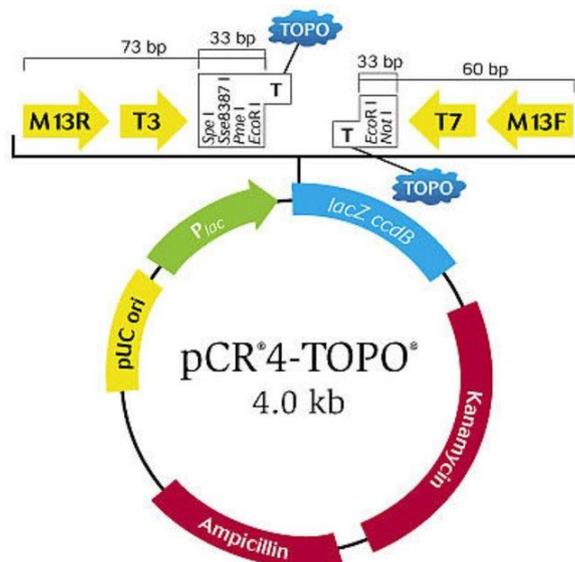


Figura 6. Mapa do Vetor plasmidial pCR® 2.1-TOPO. No mapa são apresentadas as principais regiões funcionais: o gene de resistência a ampicilina (amp^r) para seleção em bactéria e o sítio múltiplo de clonagem (MCS) onde serão clonados os diferentes fragmentos do promotor do gene *RECK*.

3.14. Construção de vetores

Os diferentes fragmentos do promotor do gene *RECK* amplificados por PCR foram clonados no plasmídeo pGL4-Control Vector (pGL4-Luc) (Promega, Wisconsin, USA) que contém o gene da Luciferase (Luc^+) de vagalume (Figura 6). A ligação dos produtos de PCR no vetor de Luciferase (pLG4-Luc) foi realizada com a utilização de 1 μ L da enzima T4 DNA ligase, 2 μ L de tampão de reação em um volume final de 20 μ L a 16 °C por 18 horas. Em seguida, a enzima foi inativada a 65 °C por 15 minutos. A razão entre o número de moléculas de produto de amplificação e plasmídeo utilizada foi de 5:1, respectivamente. Os produtos de ligação foram transformados em bactérias por choque térmico e purificados utilizando o kit comercial *GenElute™ HP Plasmid Miniprep kit* (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), conforme instruções do fabricante. A quantificação dos mesmos foi realizada por medida da absorvância em um aparelho NanoDrop 2000™ (ThermoFisher Scientific, Waltan, EUA). Os plasmídeos purificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose e selecionados para sequenciamento conforme seu perfil de migração.

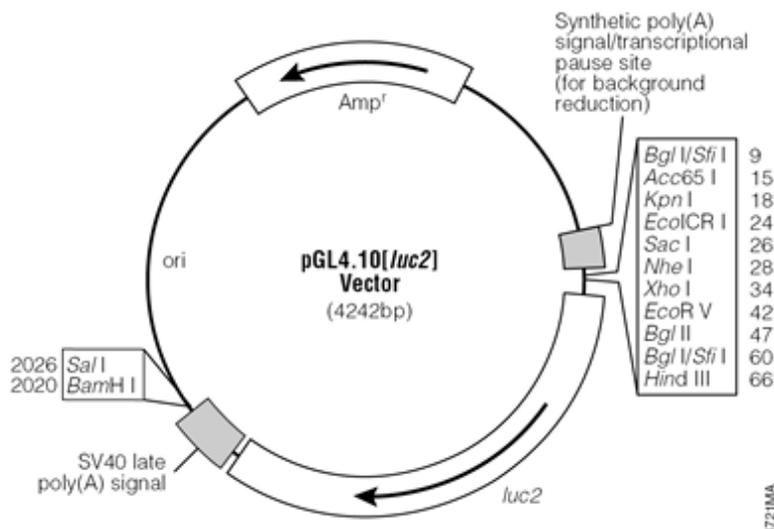


Figura 7. Mapa do Vetor plasmidial pGL4-Luc. No mapa são apresentadas as principais regiões funcionais: o gene que codifica Luciferase (*luc2*), o gene de resistência a ampicilina (*amp^r*) para seleção em bactéria e o sítio múltiplo de clonagem (MCS) onde serão clonados os diferentes fragmentos do promotor do gene *RECK*. Disponível em: <https://www.promega.com.br/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/a/pgl4-10-vector.pdf>

3.15. Ensaio de Gene Repórter (Luciferase/Renilla Assay)

Após confirmação da sequência correta, para definir o efeito das proteínas virais sobre o promotor de RECK, as células da linhagem HEK293 transduzidas com os genes E6 e/ou E7 de HPV16 (pLXSN) e de HPV11 (pBabe) foram semeadas em triplicata em placas de 24 poços (10^5 células/poço) com 1mL de D10 incubadas por 24 horas a 37°C com atmosfera de 5% de CO_2 . Em seguida, foram realizadas as transfeções com as construções de interesse utilizando Lipofectamina 3000 (Life Technologies, EUA), de acordo com protocolo do fabricante. Foram adicionados às células 100 uL de DMEM, 1,5 uL de Lipofectamina 3000, 2 uL de p3000 e 1 ug dos vetores construídos contendo o gene da Luciferase de vagalume e o vetor Renilla pGL4.73[hRluc/SV40] (Promega, Wisconsin, USA) na razão de 30:1, respectivamente. Após a transfecção, foram adicionados 500 uL de D10 e as células foram incubadas novamente. Os controles utilizados foram o pGL4-Control Vector (pGL4-Luc) e pGL3+ que serve como controle positivo por ter um promotor de ativação constitutiva a montante de Luciferase (Promega, Wisconsin, USA). Após 48 horas, o meio foi removido e as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS). Em seguida, foram adicionados 200 uL/poço de 1X Passive Lysis Buffer (PLB). As placas foram agitadas, 15 minutos em temperatura ambiente, para garantir uma cobertura uniforme da monocamada celular. Em seguida, transferimos os lisados para um microtubo de 1,5mL para manuseio e

armazenamento a -80°C . Os níveis de atividade de luciferase dos vetores descritos foi monitorada no leitor de bioluminescência GloMax®-Multi Detection System (Promega, Wisconsin, USA) em placa de 96 poços. Para determinar a atividade transcricional foram feitas 5 leituras por poço, adicionamos 100 uL de Luciferase Assay Reagent II (LAR II), 20 uL do lisado e 100 uL de Stop & Glo® Reagent, conforme instruções do fabricante. Os dados obtidos pelo leitor foram analisados pela razão da atividade de Luciferase pela atividade de Renilla.

3.16. Ensaio de expressão gênica com fármacos indutores da expressão de RECK

A transfecção de células HEK293 com os vetores que expressam luciferase e renilla foi realizada conforme descrito acima. Após 24 horas da transfecção, adicionamos 78 nM de Dissulfiram (DSF) e 1,8 nM de Doxorubicina ao sobrenadante das culturas celulares. Para o veículo de dissulfiram (VDSF) utilizamos dimetilsulfóxido (DMSO) e para doxorubicina somente adicionamos meio D10 fresco, uma vez que este fármaco é eluído em água ultrapura. Os controles utilizados foram o pGL4-Control Vector (pGL4-Luc) e pGL3+ (Promega, Wisconsin, USA). Após 48 horas da transfecção, a determinação do nível da atividade de luciferase foi realizada conforme descrito acima.

3.17. Ensaio curva de dose

As células da linhagem HEK293 foram semeadas em triplicatas em placas de 24 poços (500mil células/poço) com 1mL de D10 e incubadas por 24 horas a 37°C com atmosfera de 5% de CO_2 . Em seguida, foram realizadas as transfecções com as construções dos vetores de interesse utilizando Lipofectamina 3000 (Life Technologies, EUA), de acordo com protocolo do fabricante. Foram adicionados às células 100 uL de DMEM, 1,5 uL de Lipofectamina 3000, 2 uL de p3000 e 2500ng dos vetores construídos contendo o gene da Luciferase de vagalume e Renilla pGL4.73[hRluc/SV40] (Promega, Wisconsin, USA) na razão de 30:1, respectivamente. Além disso, este protocolo de transfecção também inclui os vetores com pLXSN vazio e E6E7 com as seguintes concentrações: 100 ng, 500 ng, 1000 ng e 2500 ng. Após a transfecção, adicionamos 500 uL de D10 e incubamos novamente. Os controles utilizados foram o pGL4-Control Vector (pGL4-Luc) e pGL3+ (Promega, Wisconsin, USA).

Após 48 horas da transfecção, removemos o meio e lavamos gentilmente com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e adicionamos 200 μ L/poço de 1X Passive Lysis Buffer (PLB). As placas foram encaminhadas para um agitador, 15 minutos em temperatura ambiente, para garantir uma cobertura uniforme da monocamada celular. Em seguida, transferimos os lisados para um microtubo de 1,5mL para manuseio e armazenamento a -80°C . O nível de atividade de luciferase dos vetores descritos foi monitorada, como descrito acima.

3.18. Obtenção de bactérias competentes

Uma adaptação da técnica descrita por Hanahan (1993) foi utilizada na obtenção de bactérias competentes. A partir de uma colônia isolada de *E. coli* (cepa JM109) obtida de uma placa recente de LB ágar, 2 mL de meio LB foi inoculado para então ser incubado sob agitação constante a 37°C por aproximadamente 2 horas. Este pré-inóculo foi transferido para 50 mL de meio LB acrescido de 0,5 mL de cloreto de magnésio (MgCl_2) 1M e mantido por cerca de 3 horas, nas mesmas condições de agitação e temperatura para que atingisse DO 600 nm entre 0,5 e 0,6. Ao atingir o ponto desejado, o frasco contendo a cultura foi então transferido para um recipiente com gelo. A cultura foi transferida para tubos de polipropileno previamente resfriados e mantidas em repouso por 15 minutos. A cultura foi então precipitada por centrifugação durante 12 minutos, a 4°C e $3000 \times g$. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento bacteriano foi gentilmente ressuscitado em 10 mL de solução RF I (100 mM KCl; 50 mM $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 30 mM de acetato de potássio; 10 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 15% glicerol; pH 5,8), e mantido em gelo por 15 minutos. As bactérias foram novamente centrifugadas a $3000 \times g$ por 12 minutos a 4°C , o sobrenadante descartado e a cultura foi ressuscitada em 2 mL de solução RF II (10 mM Na-MOPS; 10 mM KCl; 75 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 15% glicerol; pH 6,8). A suspensão obtida foi distribuída em alíquotas de 120 μ L por microtubo e mantida até o momento de sua utilização.

3.19. Transformação de bactérias competentes

Alíquotas de bactérias competentes mantidas a -80°C foram descongeladas em gelo por 15 minutos. Para cada 50 μ L de cultura competente, foram suplementados com 5 μ L do DNA de interesse. Esta mistura foi mantida por 30 minutos em gelo, e então submetida a choque térmico por 1,5 minutos a 42°C e, em seguida mantidos por mais 5

minutos em gelo. Após este período, todo o volume foi transferido para um microtubo de centrifuga contendo 500 μL de meio LB. Esses tubos foram mantidos a 37°C por 1 hora, sob agitação de 200 rpm e tiveram os transformantes coletados por meio de centrifugação a 12.000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado de maneira que apenas 100 μL restasse e fosse então plaqueados em meio LB acrescidas com ampicilina à 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$. As placas foram incubadas por 37°C por 16 horas para crescimento dos clones positivos.

3.20. Isolamento dos plasmídeos

Clones bacterianos contendo plasmídeo de interesse foram crescidos em 5 mL de meio LB, suplementado com ampicilina à 100 $\mu\text{g} / \text{mL}$, por 16 - 18 horas em incubadora a 37 °C com agitação constante de 200 rpm. Após essa etapa foi usado o Kit “GenElute Plasmid Miniprep Kit”, código PLN350 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, EUA), conforme instruções do fabricante.

3.21. Linhagem celular HEK293 estabelecidas com oncogenes E6 e E7

Para a obtenção de HEK293 que expressam os vetores lentivirais contendo os oncogenes E6 e E7 de HPV16 e HPV11 os plasmídeos foram introduzidos em células da linhagem ectópica Bosc23 (ATCC® CCL-11270) por eletroporação. Em seguida, as células foram transferidas para placas de Petri de 100 mm com 7 mL de meio DMEM (Gibco, Life Technologies) com 10% de Soro Fetal Bovino (D10) e incubadas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂.

Após 48 horas, 5 mL do sobrenadante das células Bosc23 foi aspirado com uma seringa e acoplada a um filtro de 0,45 μm e gotejado na linhagem anfitriã de fibroblastos de camundongo Am12 (Markowitz, 1988), mantidas em cultura em placas de Petri de 100 mm em uma confluência de 20%. Em seguida foram adicionados 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de polibreno (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), que minimiza a repulsão eletrostática entre a membrana celular e o envelope viral. Após 8 horas foram adicionados 10 mL de D10 fresco. Após 48 horas o meio foi substituído por meio D10 com 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Geneticina (G418, GibcoBRL, Maryland, USA) ou 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Puromicina (Puromycin Dihydrochloride Gibco®, Life Technologies), para os plasmídeos pLXSN e pBABE, respectivamente.

Após uma semana de seleção, período no qual todas as células controle estavam mortas, e as mesmas foram mantidas em meio D10 fresco até a formação de colônias. O

sobrenadante destas células com os lentivírus capazes de transduzir culturas de HEK293 com as sequências gênicas do HPV, foram gotejados conforme descrito acima. Após 45 minutos foram adicionados 5 mL de D10 e após 4 horas o meio foi trocado por meio fresco. Finalmente as células HEK293 foram selecionadas em meio D10 com G418 (500 µg/mL) ou Puromicina (2,5 µg/mL) por 48 horas, ou até as culturas controle estarem mortas, e utilizadas na obtenção de culturas em monocamada.

3.22. *Análise estatística*

Os experimentos *in vitro* foram analisados pelo teste não paramétrico *t Student*. As análises estatísticas foram realizadas com o software Microsoft Excel.

3.23. *Análise do fragmento do promotor de RECK com ferramentas in silico*

A varredura de potenciais sítios de ligação de fatores de transcrição do promotor do gene RECK foi realizada com o uso da plataforma ALGGEN - PROMO (http://alggen.lsi.upc.es/cgi-bin/promo_v3/promo/promoinit.cgi?dirDB=TF_8.3). A sequência de nucleotídeos do fragmento do promotor de RECK de 339pb foi submetida a análise na plataforma e os resultados relativos aos sítios de ligação encontrados foram coletados. A partir da lista gerada pela plataforma, realizamos a triagem dos sítios de ligação com o critério de dissimilaridade máxima de 10%.

4. RESULTADOS

4.1. Amplificação das regiões promotoras de RECK para clonagem

Para padronização da PCR para amplificação dos diferentes fragmentos do promotor, testamos diferentes condições de reação alterando as concentrações de cloreto de magnésio e temperatura de anelamento (tabela 2). Dos seis fragmentos de interesse, conseguimos padronizar a amplificação de três regiões específicas com tamanhos de 339pb, 758pb e 1126pb.

Os produtos da PCR obtidos a partir da amplificação do DNA das linhagens celulares descritas foram analisados em gel de agarose (1%). A amplificação utilizando o par de iniciadores referente às regiões 3 (Figura 8A), 4 e 5 (Figura 8B) do promotor, geraram fragmentos que correspondiam ao tamanho esperado (Tabela 1).

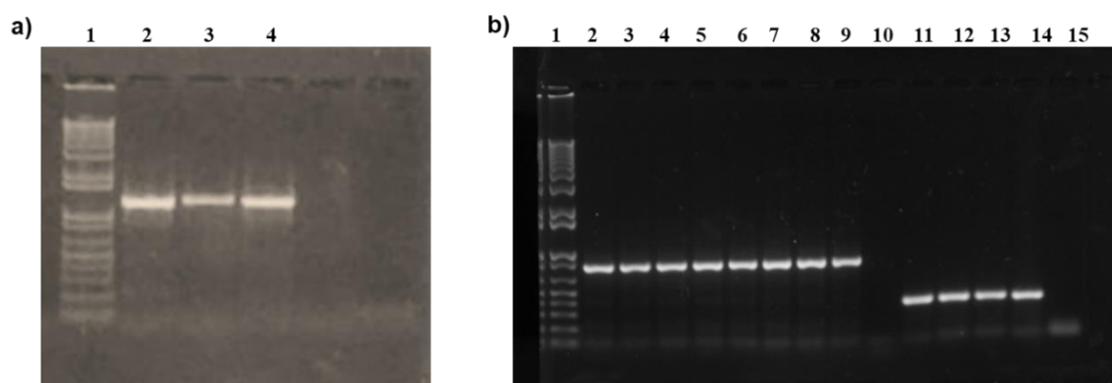


Figura 8. Análise dos produtos de PCR de diferentes regiões do promotor do gene RECK. A amplificação foi realizada utilizando como molde DNA humano (HeLa, SiHa e PHK) e de camundongo (NIH3T3). A análise dos fragmentos amplificados foi realizada em gel de agarose. A) Região 3 correspondente ao fragmento de 1126pb; 1- Marcador de massa molecular 1Kb; 2 - HeLa; poço 3 - SiHa; poço 4 - PHK; poço 5 - NIH 3T3 ATCC; Poço 6 - controle negativo (sem DNA). B) Regiões 4 (poço 2 ao 10) e 5 (poço 11 ao 15) correspondentes aos fragmentos de 758pb e 339pb, respectivamente. Poço 1 - Marcador de massa molecular 1Kb; poço 2 - HeLa; poço 3 - HeLa; poço 4 - SiHa; poço 5 - SiHa; poço 6 - SiHa; poço 7 - PHK; poço 8 - PHK; poço 9 - PHK; poço 10 - controle negativo (sem DNA); poço 11 - HeLa; poço 12 - SiHa; poço 13 - SiHa; poço 14 - PHK; poço 15 - controle negativo (sem DNA).

Em seguida, procedemos com a digestão simples dos plasmídeos pGL4-Luc (4242pb) e pGL4.73-Ren (3921pb) para verificarmos a linearização quando comparadas com o material não digerido. Para isso, utilizamos a enzima de restrição *Bam*HI para ambos vetores. Em seguida, as amostras obtidas foram analisadas em gel de agarose (1%).

Assim, observamos que a digestão utilizando a enzima de restrição referente aos vetores de luciferase e renilla geraram fragmentos que correspondiam ao tamanho esperado (figura 9).

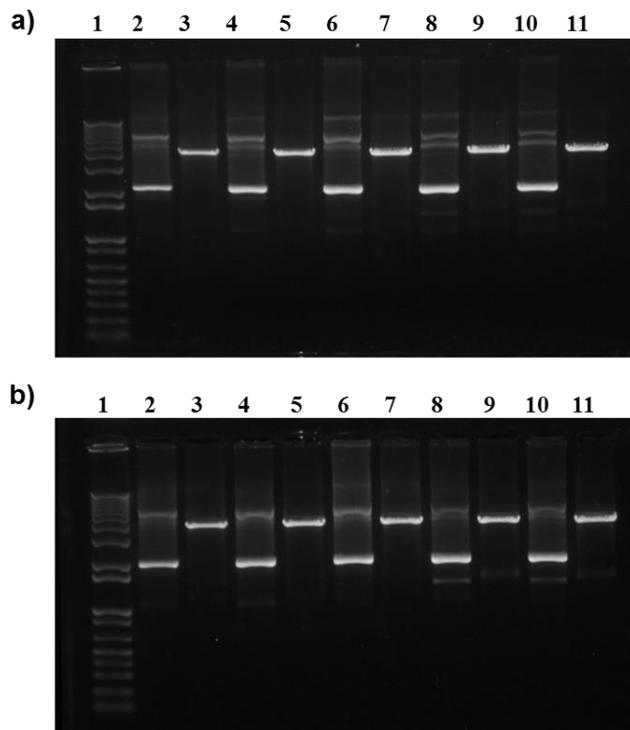


Figura 9. Análise do produto da digestão dos vetores. As digestões simples dos plasmídeos foram realizadas com a enzima BamHI mantidas a 37 °C, 2h30. A) Plasmídeo pGL4-Luc. Poço 1 – Marcador de massa molecular 1Kb; poços 2, 4, 6, 8 e 10 – plasmídeo pGL4-Luc vazio; poços 3, 5, 7, 9, 11 - plasmídeo pGL4-Luc digerido. B) Plasmídeo pGL4.73-Ren. Poço 1 - Marcador de massa molecular 1Kb; poços 2, 4, 6, 8 e 10 – plasmídeo pGL4.73-Ren vazio; poços 3, 5, 7, 9, 11 - plasmídeo pGL4.73-Ren digerido.

4.2. Clonagem dos produtos de PCR

Para criação dos vetores realizamos duas estratégias diferentes descritas na figura 18. A primeira estratégia era clonar o produto da PCR no vetor TOPO, e posteriormente, clonar no vetor de interesse pGL4-luc, porém a interrompemos na etapa de sequenciamento diante do insucesso da purificação do DNA que seria usado nos experimentos seguintes (apêndice 2). Diante deste contexto, optamos por testar outros métodos de purificação, porém sem sucesso. Os métodos testados foram: membrana, eletroeluição, fenol clorofórmio e kit DNA Purification System (Promega), conforme instruções do fabricante. A segunda estratégia era clonar os diferentes produtos de PCR

diretamente no vetor pGL4-luc. Esta abordagem se mostrou bem sucedida em todas as suas etapas iniciais e demos continuidade aos resultados gerados por este trabalho com o uso da mesma.

Com as amostras amplificadas, os produtos de interesse foram ligados ao vetor pGL4-Luc e o produto da digestão para confirmação da clonagem foi visualizado em gel de agarose (1%). Realizamos a digestão dupla do vetor pGL4-Luc (4242pb) e dos fragmentos do promotor de RECK, região 4 (758pb) e 5 (339pb) utilizando duas enzimas de restrição, *Acc65I* e *BgIII*. Os produtos das digestões foram aplicados e analisados em gel de agarose (1%). Na figura 10, podemos observar que as digestões foram realizadas de maneira satisfatória, liberando assim, os fragmentos de interesse correspondentes ao promotor.

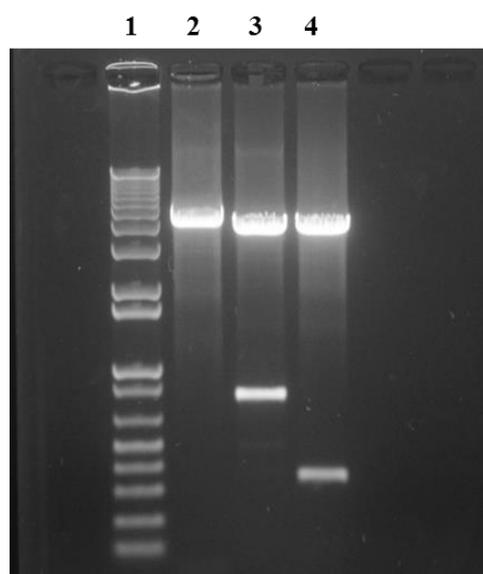


Figura 10. Análise do produto da digestão do plasmídeo e fragmentos. As digestões duplas nos clones pGL4-Luc mais 758pb e pGL4-Luc mais 339pb foram realizadas com as enzimas *Acc65I* e *BgIII* mantidas a 37 °C, 12 horas. Poço 1 – Marcador de massa molecular 1Kb; poço 2 – pGL4-Luc vazio; poço 3 - pGL4-Luc contendo fragmento de 758pb; poço 4 - pGL4-Luc contendo fragmento de 339pb.

Os produtos de ligação foram utilizados para a transformação de bactérias e isolamos, pelo menos, 20 colônias de cada condição. Após a extração de plasmídeos a partir de culturas dos clones de bactérias transformadas, utilizamos o perfil de migração destes plasmídeos em eletroforese para realizar a seleção dos clones de interesse. Para tal, os plasmídeos obtidos foram analisados em gel de agarose e aqueles que apresentaram um padrão de migração diferente ao do vetor controle foram selecionados para sequenciamento. Destes oito clones bacterianos selecionados, 2 clones eram resultado da

ligação do vetor pGL4-Luc com o fragmento da região 4 (758pb), e 6 clones da ligação do vetor pGL4-Luc com o fragmento da região 5 (339pb). Os resultados obtidos estão representados na figura 11. Vale ressaltar que nesta etapa, não foram obtidas colônias com o produto de ligação do fragmento de 1126 pb.

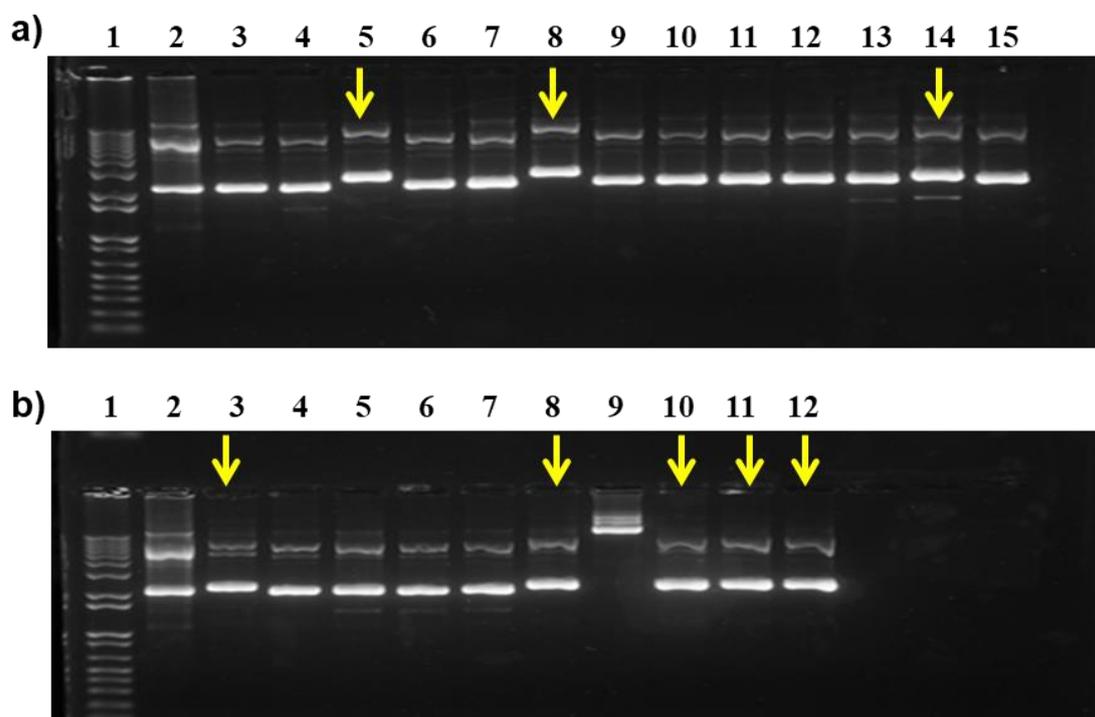


Figura 11. Seleção de clones para sequenciamento. a) Clonagem de diferentes fragmentos do promotor do gene *RECK* no plasmídeo pGL4-Luc. 1 – marcador de massa molecular 1Kb; 2 – produto da miniprep do plasmídeo pGL4-Luc vazio; poço 3 ao 11 – plasmídeo pGL4-Luc contendo fragmento de 758pb; poço 12 ao 13 – plasmídeo pGL4-Luc contendo fragmento de 339pb; b) Clonagem do plasmídeo pGL4-Luc contendo fragmento de 339pb. Poço 1 – marcador de massa molecular 1Kb; poço 2 – produto da miniprep do plasmídeo pGL4-Luc vazio; poço 3 a 12 – plasmídeo pGL4-Luc contendo fragmento de 339pb. As flechas amarelas representam os clones escolhidos para sequenciamento.

4.3. Reação de Sequenciamento

Os clones selecionados foram analisados por sequenciamento da Central Analítica do IQ-USP. A análise dos resultados do sequenciamento foi verificada pela plataforma BLAST, confirmando a identidade com a região de interesse do gene *RECK* humano (figura 12 e 13).

Download [GenBank](#) [Graphics](#)

Homo sapiens chromosome 9, GRCh38.p12 Primary Assembly
Sequence ID: [NC_000009.12](#) Length: 138394717 Number of Matches: 1

Range 1: 36036591 to 36036898 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
569 bits(308)	3e-160	308/308(100%)	0/308(0%)	Plus/Plus

Features: [78493 bp at 5' side: olfactory receptor zsr](#)
[101 bp at 3' side: reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motif...](#)

```

Query 1      AGCCCTTGTTCAGGTGaaccttgacgtgtgatcttgagtaaggtcagtcctcctctca 60
Sbjct 36036591 AGCCCTTGTTCAGGTGAACCTTGACAGTGTGATCTTGAGTAAGGTCAGTCTCCTCTCTCA 36036650

Query 61      cctcagtgccccgaaacctcaggaggtggcagaggttttctaagtactctcccagctctg 120
Sbjct 36036651 CCTCAGTGGCCCGAAACCTCAGGAGGTGGCAGAGGTTTTCTAATGACTCTCCAGCTCTG 36036710

Query 121     acatcctctgaCTTCACTCTGGGAGAACGTGGGCTGGTGGACTCCTGGCAGAAGCCGACA 180
Sbjct 36036711 ACATCCTCTGACTTCACTCTGGGAGAACGTGGGCTGGTGGACTCCTGGCAGAAGCCGACA 36036770

Query 181     CACAGTTGGGCATAACAAAGAGCCCTGGTACGGGGCACGTTCCCGCCCCGGGAGGTTT 240
Sbjct 36036771 CACAGTTGGGCATAACAAAGAGCCCTGGTACGGGGCACGTTCCCGCCCCGGGAGGTTT 36036830

Query 241     TGGAAACACTGTGAGGCAGGGGGCGGGGCTTGAGCGGGCCGCAGCCAGTACCAAAAGGGC 300
Sbjct 36036831 TGGAAACACTGTGAGGCAGGGGGCGGGGCTTGAGCGGGCCGCAGCCAGTACCAAAAGGGC 36036890

Query 301     CGGGCGCT 308
Sbjct 36036891 CGGGCGCT 36036898

```

Figura 12. Confirmação de clonagem do promotor do gene RECK. Análise do resultado do sequenciamento na plataforma BLAST. O resultado mostra que o fragmento amplificado corresponde à região 5 (339pb) de interesse para nosso estudo.

Human DNA sequence from clone RP11-113A10 on chromosome 9, complete sequence
Sequence ID: [AL138834.28](#) Length: 123413 Number of Matches: 3

Range 1: 61001 to 61682 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1249 bits(676)	0.0	681/683(99%)	1/683(0%)	Plus/Plus

```

Query 1      AACCCCTTCTCTGCAaaatccttcaaaataaaattagccaggcgtggtcacctgccccgtgg 60
Sbjct 61001    AACCCCTTCTCTGCAAAAAAAAAATAAAAAATTAGCCAGGCGTGGTCACTGCGCCCGTGG 61060

Query 61      TCCCAGCTATT CAGGAGGCTGAGGTGGGAGGATCGCTTGAGCCGGGAGGCGGAGGTTGC 120
Sbjct 61061    TCCCAGCTATT CAGGAGGCTGAGGTGGGAGGATCGCTTGAGCCGGGAGGCGGAGGTTGC 61120

Query 121     AGTGAGCCGAGATCGGCCACTGCACCCAGCTTGGGCGACAGAGCGACTCTTGCCATAA 180
Sbjct 61121    AGTGAGCCGAGATCGGCCACTGCACCCAGCTTGGGCGACAGAGCGACTCTTGCCATAA 61180

Query 181     TAAATAAATAAATAATTTTTAAAGTACATCAAAGACACATTGAGGCTATATGTCCAAAG 240
Sbjct 61181    TAAATAAATAAATAATTTTTAAAGTACAACAAAGACACATTGAGGCTATA-GTGCCAAAG 61239

Query 241     AGCTCTAGTGATGAACCCCTTGT CAGGGGGCCGTGTCTGCGGGAGGCGGAAGGATCCC 300
Sbjct 61240    AGCTCTAGTGATGAACCCCTTGT CAGGGGGCCGTGTCTGCGGGAGGCGGAAGGATCCC 61299

Query 301     TGACATGCTTTCTTTGGGTGCGAGGCAGCGTCTCGGCAGAAAGAATATTGCGAGTATTAC 360
Sbjct 61300    TGACATGCTTTCTTTGGGTGCGAGGCAGCGTCTCGGCAGAAAGAATATTGCGAGTATTAC 61359

Query 361     TGAGGGTACATGAAGGAGAGAAGCCCTTTGGTTCGGCCTTGACTAAGCCCTTGTCTCT 420
Sbjct 61360    TGAGGGTACATGAAGGAGAGAAGCCCTTTGGTTCGGCCTTGACTAAGCCCTTGTCTCT 61419

Query 421     AGGTGAACCTTGCAAGTGTGATCTTGAGTAAGGTCAGTCTCCTCTCTCACCTCAGTGGCC 480
Sbjct 61420    AGGTGAACCTTGCAAGTGTGATCTTGAGTAAGGTCAGTCTCCTCTCTCACCTCAGTGGCC 61479

Query 481     AAACCTCAGGAGGTGGCAGAGGTTTTCTAATGACTCTCCAGCTCTGACATCCTCTGACT 540
Sbjct 61480    AAACCTCAGGAGGTGGCAGAGGTTTTCTAATGACTCTCCAGCTCTGACATCCTCTGACT 61539

Query 541     TCACCTGGGAGAACGTGGGCTGGTGGACTCCTGGCAGAAAGCCGACACACAGTTGGGCA 600
Sbjct 61540    TCACCTGGGAGAACGTGGGCTGGTGGACTCCTGGCAGAAAGCCGACACACAGTTGGGCA 61599

Query 601     TAACAAAGAGCCCTGGTACGGGGCACGTTCCCGCCCCGGGAGGTTTTGGAAACACTGTG 660
Sbjct 61600    TAACAAAGAGCCCTGGTACGGGGCACGTTCCCGCCCCGGGAGGTTTTGGAAACACTGTG 61659

Query 661     AGGCAGGGGGCGGGGCTTGAGCG 683
Sbjct 61660    AGGCAGGGGGCGGGGCTTGAGCG 61682

```

Figura 13. Confirmação de clonagem do promotor do gene RECK. Análise do resultado do sequenciamento na plataforma BLAST. O resultado mostra que o fragmento amplificado corresponde à região 4 (758pb) de interesse para nosso estudo.

4.4. Ensaio de Gene Repórter (Luciferase/Renilla Assay)

Resultados publicados anteriormente por nosso grupo mostram que as proteínas de HPV exercem uma regulação negativa sobre os níveis de mRNA e de proteína de RECK (CARDEAL et al., 2006; CARDEAL et al., 2012). No entanto, os mecanismos moleculares através dos quais as oncoproteínas virais, E6 e E7, regulam a expressão do gene RECK não foram profundamente analisados. Assim, para verificarmos o efeito da expressão das proteínas virais sobre o promotor de RECK, utilizamos as construções mencionadas acima em linhagens celulares HEK293 transduzidas com vetor pBabe expressando E6 e/ou E7 de HPV11 (baixo risco oncogênico) ou pLXSN expressando os E6 e/ou E7 de HPV16 (alto risco oncogênico). Em seguida a preparação destas ferramentas, realizamos ensaios de transfecção com os vetores pGL4 contendo os diferentes fragmentos do promotor do gene RECK a montante da sequência para expressão do gene Luciferase e o vetor controle Renilla. Após 48h do momento da transfecção, realizamos a lise celular e a partir do material coletado analisamos os níveis de atividade de luciferase em todas as condições testadas. Resultados representativos destes ensaios estão representados na figura 14. Daqui por diante chamaremos os plasmídeos pGL4-Luc contendo os fragmentos de 339pb e 758pb (referentes as regiões 4 e 5) de Luc300 e Luc800, respectivamente.

Os resultados mostram que a ativação do promotor de RECK, tanto para Luc800 quanto para Luc300, é relativamente menor em células que expressam as proteínas E6 e/ou E7 de HPV 11 e 16. Esses resultados foram consistentes em todos os experimentos realizados. Para os ensaios seguintes trabalhamos apenas com o fragmento menor do promotor, o Luc300.

Diante deste primeiro resultado que demonstrou um efeito negativo consistente da expressão de E6 e E7 de HPV16 sobre a ativação do promotor do gene RECK, buscamos observar se havia um efeito dose dependente entre os níveis de proteínas do HPV e a inibição do promotor de RECK. Para este ensaio, as células HEK293 foram transfectadas com quantidades constantes de Luc300 e Renilla e quantidades variáveis do vetor pLXSN contendo genes de E6 e E7 de HPV16. Os resultados são apresentados na figura 15.

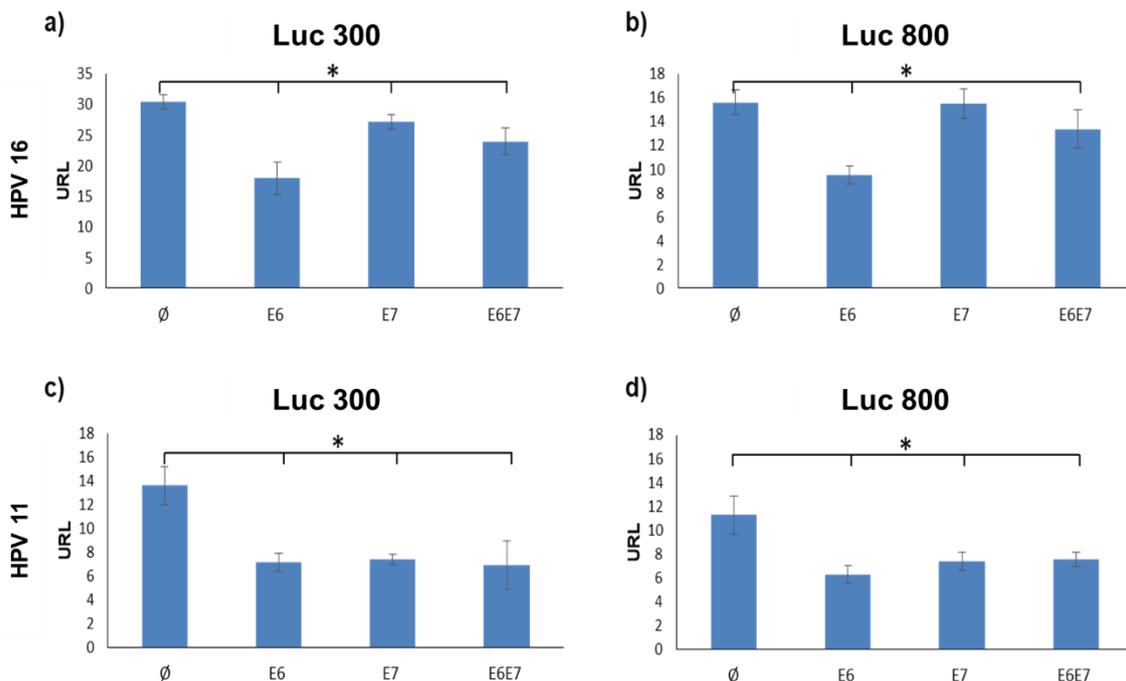


Figura 14. As proteínas E6 e E7 de HPV inibem a atividade transcricional do promotor de RECK. **Ensaio de gene repórter** em linhagens celulares HEK293 transduzidas com E6 e/ou E7 de HPV 16 e 11. Para verificarmos os efeitos das proteínas virais sobre a atividade do promotor do gene RECK, células da linhagem HEK293 transduzidas com os genes E6 e/ou E7 de HPV11 (vetor retroviral pBabe) ou 16 (vetor retroviral pLXSN) foram semeadas em placa de 24 poços (105 células/poço). Após 24 horas, as células foram transfectadas com as construções dos vetores pGL4-Luc contendo os fragmentos de 758pb (800) e 339pb (300). As células foram lisadas e analisadas no leitor de bioluminescência. a) células HEK293 transduzidas com E6/E7 de HPV16 transfectadas com Luc300; b) células HEK293 transduzidas com E6/E7 de HPV16 transfectadas com Luc800; c) células HEK293 transduzidas com E6/E7 de HPV11 transfectadas com Luc300; d) células HEK293 transduzidas com E6/E7 de HPV11 transfectadas com Luc800. URL – unidade relativa de Luminescência. * $p < 0,05$, teste t-Student. Os resultados são representativos de três experimentos independentes realizados em triplicata.

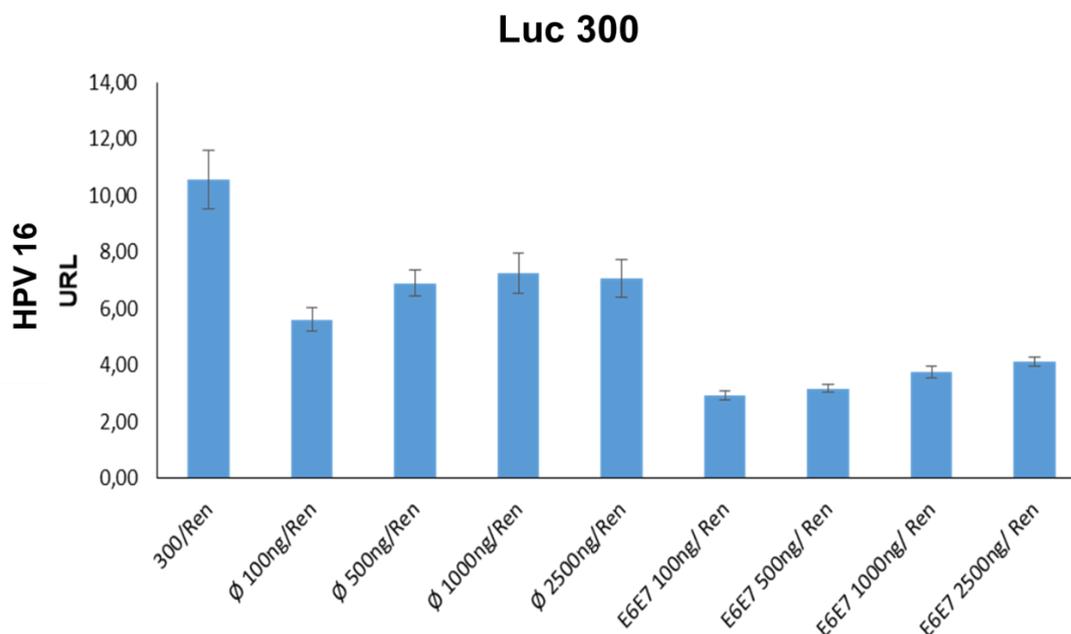


Figura 15. Efeito da quantidade de E6 e E7 na atividade do promotor do gene RECK. Para verificarmos os efeitos dos níveis dos genes de HPV16 E6E7 sobre o promotor de RECK, as linhagens HEK293 foram semeadas (5×10^5 células/poço) em placa de 24 poços. Após 24 horas, foram realizadas as transfecções com as construções de Luc300 e os vetores pLXSN vazio e pLXSN E6E7, em diferentes concentrações. As células foram lisadas e analisadas no leitor de bioluminescência. URL – unidade relativa de Luciferase. Ren – renilla.

Os resultados obtidos não foram conclusivos. Por este motivo, não fizemos os mesmos ensaios com o vetor Luc800. Analisando os ensaios, pudemos verificar uma similaridade destes resultados com os do experimento anterior. Mais uma vez, constatamos que a expressão de E6E7 de HPV 16 inibe a ativação do promotor de RECK quando comparadas com o controle (300/Ren). Porém, quando observamos a relação da quantidade variável de pLXSN versus a ativação do promotor de RECK, não conseguimos notar uma associação bem definida. Assim, acreditamos que o vetor utilizado não seja o apropriado para expressar E6 e E7 de maneira transiente.

Diante dos dados obtidos até o momento, resolvemos buscar na literatura por fármacos que demonstrassem algum efeito sobre a ativação do promotor de RECK. Murai e colaboradores (2010) mostraram que doses específicas dos fármacos dissulfiram (DSF) e cloridrato de doxorubicina (DXR) são capazes de induzir a expressão deste gene (MURAI et al., 2010). Deste modo, para avaliarmos o potencial terapêutico destes fármacos para doenças que possuem associação com HPV, resolvemos verificar o efeito

do DSF e da DXR na atividade do promotor de RECK em linhagens celulares que expressem genes de HPV. Os resultados obtidos neste ensaio são mostrados na figura 16.

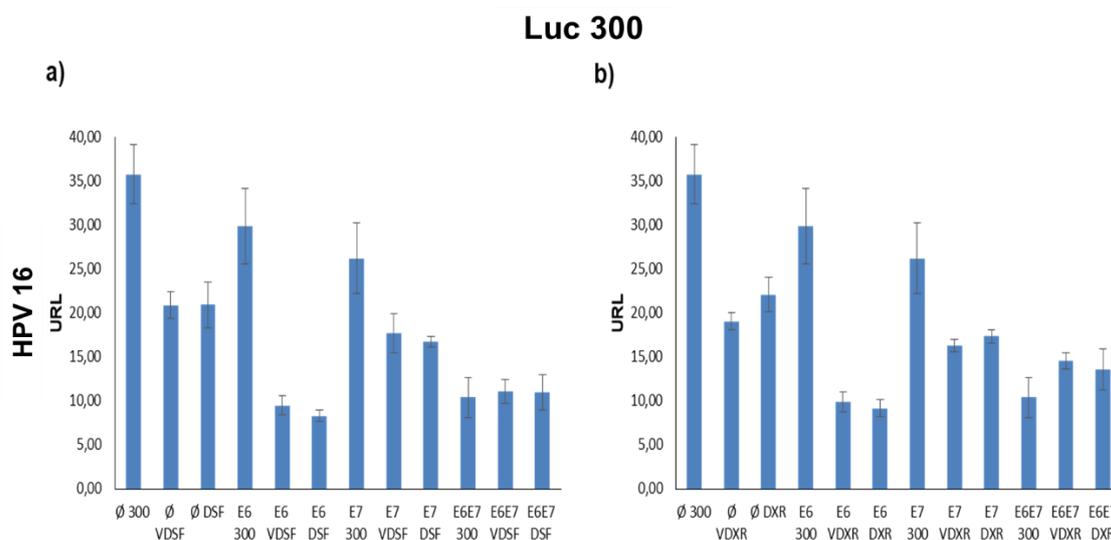


Figura 16. Efeito do Dissulfiram e da Doxorubicina na atividade do promotor de RECK. Para verificarmos os efeitos dos fármacos na atividade do promotor do gene RECK em células que expressam as oncoproteínas de HPV células HEK293 transduzidas com vetores retrovirais que expressam os E6 e/ou E7 de HPV 16 (pLXSN) foram semeadas (105 células/poço) em placa de 24 poços. Após 24 horas, as células foram transfectadas com o vetor Luc300. Após 24 horas, foram adicionados os fármacos dissulfiram (DSF) e doxorubicina (DXR). As células foram lisadas e os extratos analisados em leitor de bioluminescência. a) 78 nM de Dissulfiram; b) 1,8nM de Doxorubicina. URL – unidade relativa de Luciferase; DSF – Dissulfiram; VDSF – veículo de dissulfiram; DXR – Doxorubicina; VDXR – veículo de doxorubicina.

Observando os resultados, mais uma vez, não tivemos respostas conclusivas. Quando comparamos as células tratadas com os fármacos com as tratadas somente com os veículos, não verificamos alterações na ativação do promotor de RECK. Diante disso, acreditamos que a janela de tempo utilizada para a incubação com os fármacos neste experimento não foi suficiente para indução do promotor. Porém, ao analisarmos somente o efeito de E6E7 em todos os experimentos, em conjunto, conseguimos ter uma resposta consistente em relação à inibição da atividade do promotor.

4.5. Identificação de sítios de ligação para fatores de transcrição na região promotora de RECK

Com o intuito de determinar alguns dos mecanismos envolvidos na regulação da expressão do gene *RECK* em células que expressam oncogenes de HPV realizamos, em primeiro lugar, uma análise *in silico* do promotor desse gene (Luc 300).

Para determinarmos o mecanismo pelo qual ocorre a regulação transcricional de RECK, fizemos uma varredura *in silico* dos fatores de transcrição que se ligam a região 5 do promotor de RECK utilizando o programa ALGGEN - PROMO.

De acordo com a dissimilaridade máxima de 10% e tamanho da sequência com largura matricial de 7 ou mais nucleotídeos, foram identificados potenciais reguladores transcricionais para esta região do promotor do gene RECK (apêndice 3). Destes, fizemos uma nova triagem a partir da associação da infecção por HPV com a expressão/atividade destes fatores de transcrição (figura). Estes fatores foram selecionados diante da aplicação do critério mais estrigente de dissimilaridade máxima de 5% e tamanho da sequência com largura matricial de 7 ou mais nucleotídeos na região promotora de RECK. A descrição destes fatores encontra-se em maior detalhe na seção Discussão.

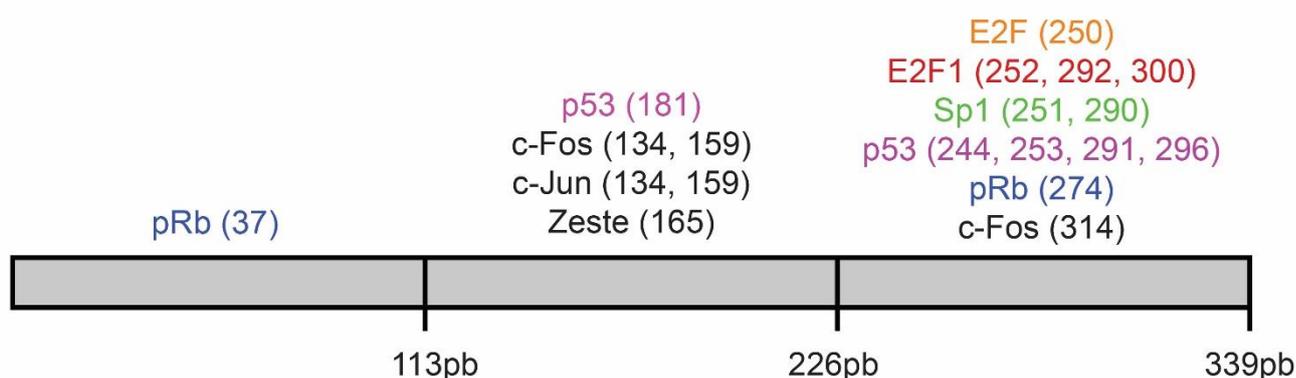


Figura 17. Representação dos potenciais fatores de transcrição baseado na sequência da região alvo. Os potenciais fatores de transcrição foram previstos de uma margem de dissimilaridade menor ou igual a 5% na menor região promotora de RECK (339pb). Os fatores estão localizados de acordo com sua complementariedade ao promotor, e nos parênteses estão os sítios com os quais eles iniciam sua ligação.

Durante a dissertação, publicamos três artigos no qual fui co-autora (HERBSTER et al., 2018; PRADO et al., 2018; HERBSTER et al., manuscrito em preparo) (apêndice 4).

O conjunto de dados gerados por esta dissertação foi organizado na figura 18.

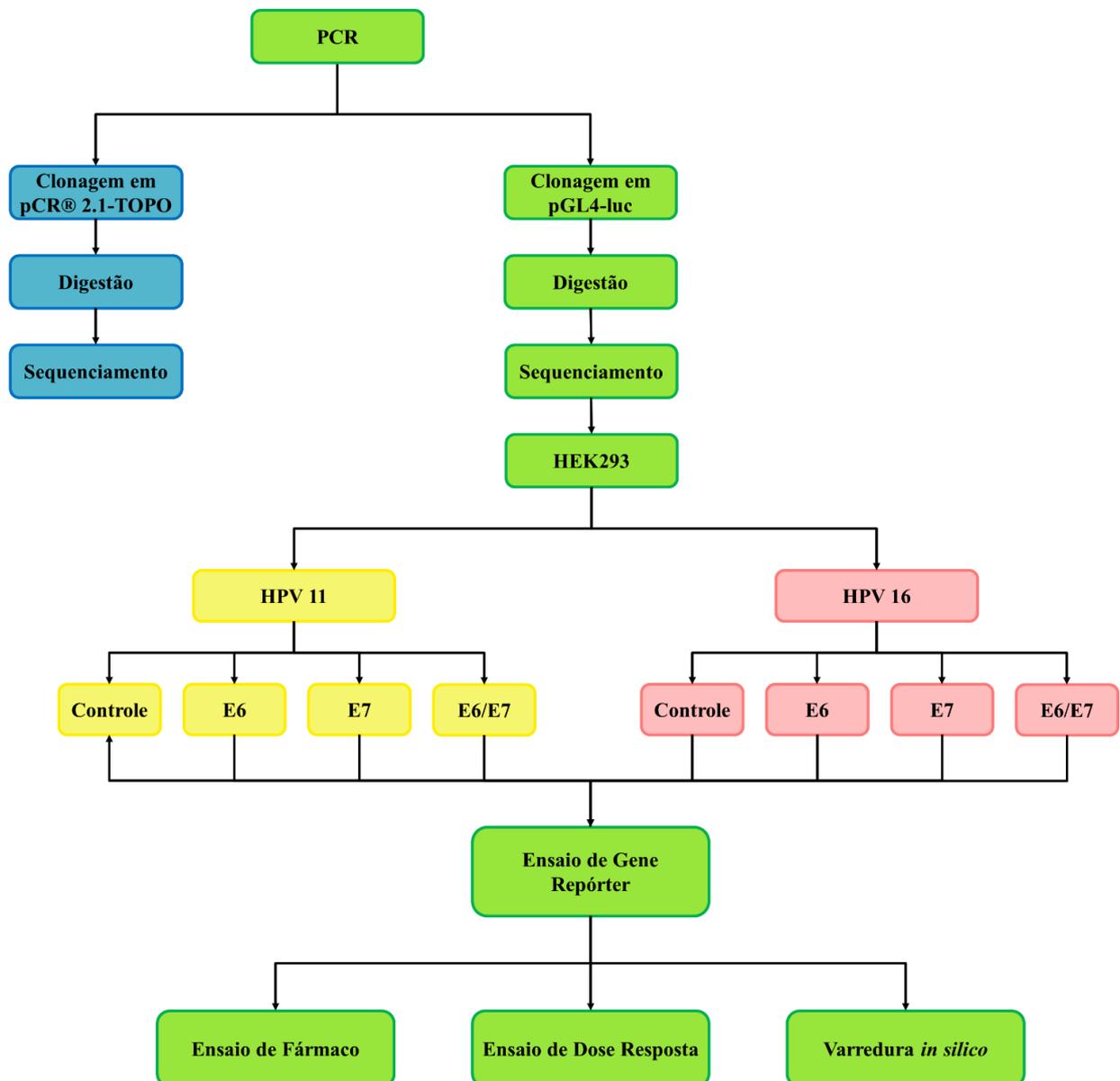


Figura 18. Fluxograma das metodologias aplicadas no projeto. Em azul, a estratégia com o vetor topo; em amarelo, HPV de baixo risco; em rosa, HPV de alto risco e em verde as etapas seguidas no projeto"

5. DISCUSSÃO

5.1. Construção de vetores para caracterização do promotor do gene *RECK*

O gene *RECK* é considerado um supressor de tumor que atua na remodelação de tecidos através de seu controle da MEC e na maturação e organização de vasos durante a embriogênese (TAKAHASHI *et al.*, 1998a; OH *et al.*, 2001; NODA, 2003). Estudos recentes do nosso grupo demonstraram o efeito supressor de tumor do gene *RECK* em linhagens celulares derivadas de tumores cervicais, SiHa (HPV16), SW756 (HPV18) e C33A (HPV negativa). Células derivadas de linhagens superexpressando *RECK* foram injetadas s.c. em camundongos *nude* e apresentaram perda de capacidade de estabelecimento tumoral, retardo no tempo de crescimento e regressão de uma parte dos tumores e (HERBSTER *et al.*, 2019, manuscrito em preparação).

No decorrer do nosso projeto, fizemos construções com os fragmentos incluindo as regiões de 300 e 800 pb a montante do sítio de início da transcrição do gene *RECK* em um vetor que continha o gene da luciferase de vagalume. Tivemos alguns problemas na etapa de amplificação destes fragmentos, onde suspeitamos ser por conta do alto conteúdo em GC apresentados nesta região.

Na literatura, poucos estudos mostraram o uso do ensaio de gene repórter de dupla luciferase (*Dual Luciferase repórter*) em papilomavírus humano (XIAO *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2019; TINGTING *et al.*, 2019). Os resultados obtidos com o ensaio de gene repórter mostraram que a ativação do promotor de *RECK* está diminuída em células que expressam as proteínas E6 e E6/E7 de HPV. Estes resultados são consistentes com as observações publicadas anteriormente por nosso grupo (CARDEAL *et al.*, 2006; CARDEAL *et al.*, 2012). Em contrapartida, observamos que não há uma similaridade quando analisamos o efeito isolado da oncoproteína E7 (CARDEAL *et al.*, 2012). Neste estudo anterior, demonstramos que a expressão de HPV16 E7 ou E6/E7 está associada a uma redução marcante na expressão de mRNA e proteína de *RECK* em queratinócitos primários humanos cultivados tanto em monocamanda, quanto em cultura organotípica. O projeto atual é primeiro estudo a avaliar o efeito da expressão de E6 e E7 sobre a ativação de um fragmento do promotor do gene *RECK*. Diante dos dados que geramos até o momento, acreditamos que E6 e E7 atuam em conjunto para gerar o efeito de menor ativação do promotor do gene *RECK*. Existem várias possibilidades de efeitos combinados de E6 e E7 que podem ocorrer e que não são contemplados pelos nossos

resultados até o. O efeito que observamos anteriormente da expressão de E7 levando a redução de mRNA e proteína de RECK pode indicar que E7 tem papel sobre outros pontos de controle da expressão de RECK além da ativação de seu promotor, como estabilidade de mRNA e expressão de miR (CARDEAL *et al.*, 2006; CARDEAL *et al.*, 2012). Os resultados desta dissertação não anulam o que ela observou. No máximo, mostramos que este efeito que ela observou não depende inteiramente do papel de E7 sobre a ativação do promotor de RECK.

Ainda, analisamos o efeito da quantidade das oncoproteínas, E6 e E7, em relação à atividade do promotor de RECK, porém os resultados foram inconclusivos. Vários fatores podem ter afetado o resultado desse experimento. No entanto, acreditamos que o principal fator é que ao invés de termos trabalhado com um vetor com componentes retrovirais para expressão dos genes de HPV, deveríamos ter trabalhado com um vetor desenvolvido para a expressão transiente desses genes em células eucariotas. O que nos leva a acreditar que isto poderia ter afetado os níveis de expressão dos genes de HPV per se e conseqüentemente, os resultados observados.

Outro fator importante que acreditamos ter afetado nossos resultados, foi a janela de tempo do nosso experimento. É possível que esta janela utilizada não tenha sido suficiente para visualizar os efeitos desejados. Experimentos futuros, com vetores mais apropriados, serão necessários para gerar resultados conclusivos sobre o ensaio de dose resposta. De forma preliminar, avaliamos o status de metilação da região promotora do gene RECK em uma série de dados que reunia amostras clínicas de mucosa cervical normal, CIN1-3 e carcinomas invasivos a partir de bancos de dados depositados na plataforma GEO, do inglês *Gene Expression Omnibus*. Os resultados obtidos apontam para a hipermetilação precoce do gene RECK em lesões CIN e para a manutenção destes níveis de metilação aumentados também nos carcinomas invasivos. De fato, esta análise ainda não contempla se a hipermetilação do gene RECK na história natural câncer de colo de útero está associada à infecção por HPV (HERBSTER *et. al.*, 2019, manuscrito em preparação).

Murai e colaboradores (2010) mostraram que diferentes compostos ativam o promotor do gene RECK, induzindo a expressão do mesmo. Dentre os fármacos selecionados como potenciais indutores da expressão de RECK por este estudo, encontram-se o Dissulfiram e a Doxorubicina. O Dissulfiram (DSF) é um medicamento para tratamento antialcoolismo e tem atividade antitumoral. Trabalhos anteriores mostraram que esse fármaco é um potencial agente terapêutico de câncer de próstata, tem capacidade de

reduzir o crescimento do tumor *in vivo*, e induz a expressão de RECK (CHENG et al., 2006; MURAI et al., 2010; KETOLA; KALLIONIEMI; ILJIN, 2012;). A Doxorrubicina (DXR) também é um indutor da expressão de RECK, e possui atividade antitumoral sendo muito utilizado em tratamentos quimioterápicos em pacientes com câncer de mama metastático (SLEDGE et al., 2003; MURAI et al., 2010). Porém, esse fármaco não é muito utilizado na clínica devido a sua toxicidade crônica e aguda (CHEN et al., 2005). Diante disto, estabelecemos um protocolo de tratamento com os fármacos, porém nossos dados foram inconclusivos. Vale ressaltar que, independente dos fármacos, tivemos resultados muito similares que confirmam o efeito inibitório das proteínas de HPV16 sobre a atividade do promotor de RECK, mostrando que este efeito é consistente. Algo que pode explicar estes resultados é o fato de termos utilizado o fármaco puro e não ele em combinação com cobre ou ainda por termos utilizado a janela de tratamento de apenas 24 horas (CHEN et al., 2006; CONG et al., 2017). Uma das perspectivas desse projeto é avaliar o tratamento combinado de DXR e DSF para ver se conseguimos observar o efeito de ativação do promotor.

5.2. Análise de fatores de transcrição na região promotora de RECK

Diante dos resultados obtidos, realizamos uma análise *in silico* do promotor deste gene para explorar quais os potenciais mecanismos envolvidos na regulação da expressão. Estudos sugerem que AIRE (apêndice 2) pode ser um fator que promove a progressão de câncer de próstata, através da prevenção da morte das células cancerígenas causando assim um aumento na capacidade de invasão, porém não encontramos dados em relação ao câncer de colo de útero (KALRA et al., 2018). Adicionalmente, um trabalho recente descreveu o papel inibitório de uma histona metiltransferase conhecida EZH2 (apêndice 2), do inglês *enhancer of zeste homolog 2*, sobre a expressão de RECK, a nível de promotor, por meio da via ERK (NING; MA, 2019).

O regulador transcricional AP-1, além de ser alvo da sinalização de Notch, também é composto por membros da família c-fos e c-jun que se ligam a sequências encontradas nas regiões promotoras dos genes. Este fator se liga inclusive a regiões reguladoras transcricionais do HPV, demonstrando que alterações em AP-1 podem ser consideradas importantes na transformação mediada por este vírus, porque regula atividade do promotor de HPV, o ativando ou o reprimindo. É digno de nota que a atividade de AP-1 pode ter impacto sobre a regulação da expressão inclusive de E6 e E7

(SOTO et al., 1999; WILDE et al., 2008; HENKEN et al., 2012). Em 2011, foi descrito na literatura a primeira evidencia de que a proteína E6 de HPV16 colabora para a formação do complexo AP-1. Além disso, este estudo demonstrou que a expressão da proteína c-fos mostrou-se dependente da expressão de E6 de HPV16 em seu sistema (LIANG et al., 2011).

Ainda, AP-1 pode exercer um papel de regulação sobre o promotor do microRNA miR-21, em células derivadas de câncer de colo de útero (DÍAZ-GONZÁLEZ et al., 2019). O miR-21 é considerado um oncogene e atua no crescimento, invasão e metástase tumoral, e sua expressão apresenta-se alterada em muitos tipos de câncer (ZHU et al., 2008; YAN et al., 2008; WEN et al., 2015). Em câncer de colo de útero, miR-21 foi significativamente mais expresso quando comparados aos tecidos normais, além de apresentar características de biomarcador preditivo em relação ao status de infecção por HPV em amostras clínicas (PARK et al., 2017; YUAN et al., 2018; ZAMANI et al., 2019).

Outra associação importante com miR-21 é em relação a oncoproteína E7. Kong e colaboradores mostraram que E7 regula positivamente este microRNA, auxiliando na invasão e crescimento das células HeLa, e o efeito contrário também foi discutido com a inibição de miR-21. Isto é interessante porque já foi descrito anteriormente que o mRNA de RECK é um dos alvos clássicos para miR-21 (JUNG et al., 2012; REIS et al., 2012; KOWSHIK et al., 2017). Além de miR21, o miR-9 e miR-155 também tiveram sua expressão aumentada em tecidos de câncer de colo de útero, semelhante a miR-182 que, em conjunto com E7, também apresenta uma regulação positiva, mas por meio da via de sinalização TGF- β / Smad4 (PARK et al., 2017; Cheng et al., 2019).

Estudos recentes mostram que a expressão reduzida de miR-3156-3p e miR-125a está frequentemente associada com o câncer cervical. Vale ressaltar que a superexpressão de miR125a suprime a migração, proliferação e invasão através da diminuição de STAT3 (FAN et al., 2015; XIA et al., 2017). Em contrapartida, foi descrito pela primeira vez que o miR-129-5p regula negativamente o crescimento celular na linhagem celular HeLa. O fator de transcrição Sp1 é alvo direto deste microRNA (ZHANG et al., 2013).

Em estudos recentes, foi discutido que a expressão aumentada de DNMT, do inglês *DNA methyltransferases*, pode ocorrer pela proteína E6 de HPV de alto risco, através de microRNAs e metilação de promotor (LIU et al., 2016; MOREL et al., 2017). Outros grupos demonstraram que a expressão de miR-362-3p, a nível de promotor, também está alterada em alguns tipos de câncer, dentre eles, câncer de colo de útero

(KANG H et al., 2016; MOREL et al., 2017; SONG et al., 2019).

A expressão de E6 de HPV 16 leva a inativação de p53 aumentando o risco de câncer cervical (YANG; LU, 2015). Quando E6 de HPV18 foi silenciado em células HeLa ocorreu uma expressão aumentada em cinco vezes do gene RECK. O fato de termos observado sítios de ligação para p53 na região promotora do gene RECK pode sugerir que ao reduzir a expressão de p53, o HPV pode levar a baixa expressão de RECK. Ou seja, provavelmente p53 pode ter efeito direto sendo um regulador positivo da expressão de RECK a nível de promotor em nosso sistema (MIN et al., 2009).

Já foi descrito anteriormente que o fator de transcrição ATF3 (apêndice 2) regula negativamente em muitos tipos de câncer, entre eles, o câncer de colo de útero (YAN C; BOYD, 2006). Este fator quando se liga a p53, o regula positivamente bloqueando sua ubiquitinação, auxiliando assim a supressão da tumorigênese induzida pelo HPV (Yan C et al., 2005; Wang H et al., 2010).

Alguns autores discutem que somente a degradação de proteínas da família de pRb não explica completamente o impacto da expressão de E7 nas células hospedeiras (Que células hospedeiras. A primeira análise genética da proteína E7 de HPV com Rb foi feita em 2003, nos epitélios escamosos estratificados. Nesta análise, foi visto que E7 degrada pRb e conseqüentemente ocorre aumento da hiperplasia e displasia (BALSITIS et al., 2003). Em um estudo com camundongos, avaliou-se que o desenvolvimento de neoplasia intraepitelial cervical de alto grau se deu pela perda das proteínas pRb, p107 e p130, comprovando que estas são supressoras de tumores de colo de útero (SHIN et al., 2012). Estes argumentos apoiam a ideia de que E7 pode atuar na regulação da expressão gênica por mecanismos alternativos à interação com os membros da família de pRb (BALSITIS et al., 2003, 2006; SHIN et al., 2012).

Outro fato importante é de uma proteína associada a pRb, pRbAp46, ter sido identificada como um fator de regulação de expressão de RECK em um modelo experimental de tumor de pulmão. Este estudo observou que pRbAp46 é um dos genes alvos regulados positivamente pela expressão de Ha-ras^{val12} mutado. Foi observado que a proteína pRbAp46 é capaz de se ligar à histona de acetilase 1 (HDAC1) e Sp1 e este complexo pode se ligar ao promotor de RECK, inibindo sua expressão (YEH *et al.*, 2015).

No promotor de RECK existem regiões responsivas ao fator de transcrição E2F que se ligam à p107 e p300, podendo atuar na expressão do mesmo, o que também confirmamos em nossa análise *in silico* (Ertosun, Hapil & OZES, 2016). Células

cancerígenas possuem crescimentos desordenados que resultam da expressão desregulada de E2F, onde estes são induzidos ou reprimidos. Estudo anterior demonstra que a oncoproteína E7 de HPV ao inativar pRb, ativará membros da família E2F.

Um dos principais membros da família E2F, o E2F4, apresenta-se altamente expresso em linhagens celulares de HPV (WELLS et al., 2000; SLEBOS et al., 2014). Lee e seus colaboradores sugerem que o tumor pode ser suprimido pela perda de E2F4 possibilitando que genes reguladores de pRb (p107 e p130) ativem os fatores de transcrição E2F (LEE et al., 2002). Outro fator de transcrição que atua como repressor da expressão gênica é o E2F8. Em 2010, um estudo com células cancerígenas do cólon humano, sugere que E2F8, quando regulado negativamente, leva a inibição do crescimento das células tumorais por meio da via NF- κ B (YAN; ZHANG, 2019).

Quando a oncoproteína E7 degrada pRb, ela destrói o complexo pRb-E2F levando a liberação de E2F, e conseqüentemente, a uma desregulação na progressão do ciclo celular (ZUR HAUSEN 2002, NARISAWA-SAITO; KIYONO, 2007). O fator de transcrição E2F pode atuar em conjunto com o CIP2A, do inglês *cancerous inhibitor of protein phosphatase 2A*, ambos altamente expressos em tecido de câncer de colo de útero (WANG et al., 2017). Zhang e colaboradores (2015) demonstraram que a oncoproteína CIP2A é regulada positivamente por E7 de HPV16, via E2F, atuando como reguladora do câncer na progressão e proliferação celular.

Em tempo, observamos que o promotor de RECK apresenta algumas sequências responsivas a NF κ B, ER, Sp1, HIF1 α , entre outros. Foi descrito anteriormente que E7 de HPV 16 pode formar complexos com NF- κ Bp50-p65, ER α , HDAC1 e JARID1B. Este complexo, quando ligado a uma região específica do promotor de TLR9, leva à menor metilação e acetilação de histonas a montante ao sítio de início de transcrição de TLR9. Estes resultados foram confirmados ainda em tumores cervicais de pacientes (HASAN *et al.*, 2013). Entretanto, o efeito das oncoproteínas de HPV na regulação da expressão do gene *RECK* não tinha sido estudado até o momento.

Já foi demonstrado que tanto o HPV de baixo risco quanto de alto risco, aumentam a expressão do fator induzível de hipóxia 1 α (HIF-1 α) em lesões benignas e em tumores malignos (NAKAMURA et al., 2009; RODOLICO et al., 2011). Em condições de hipóxia, E6 de HPV16 pode aumentar a expressão de genes alvo de HIF-1 α quando interrompe a sua interação com Von Hippel-Lindau (VHL) (GUO et al., 2014). Ademais, E7 de HPV aumenta a atividade transcricional de HIF-1 α impedindo sua interação em

HDACs (BODILY et al., 2011).

Estudos discutem sobre o papel das histonas desacetilases (HDACs) na regulação de genes que estão envolvidos no desenvolvimento de vários tipos de câncer (ZHU et al., 2004; HRZENJAK et al., 2006; OEHME et al., 2009; PARK et al., 2011). Foi visto anteriormente que células de câncer de cabeça e pescoço tem a expressão de HDAC1 aumentada (KUMAR B et al., 2015).

O estrogênio está envolvido em vários tipos de câncer podendo atuar na supressão ou promoção do desenvolvimento tumoral (DEROO BJ; KORACH, 2006). Estudo recente demonstrou um papel prognóstico na associação do receptor de estrogênio α (ER α) com câncer de orofaringe positivo para HPV (KANO et al., 2019). Park e seus colaboradores (2003) demonstraram que a expressão das oncoproteínas E6 e E7 de HPV18 induzidas por estrogênio pode estar relacionada com o aumento da gravidade de displasia cervical.

Um estudo em células de pacientes com câncer de pulmão apresentou um aumento significativo nos níveis de expressão de mRNA de E6, Sp1 e hTERT, diferente de LKB1, onde seus níveis foram negativos. Este estudo demonstra que E6 de HPV16 regulou a expressão de hTERT e também de Sp1 (YANG et al., 2017). Em células de câncer de colo de útero, as oncoproteínas de HPV16 interagem com o promotor do fator de crescimento tumoral beta (TGF-beta1), aumentando sua atividade (Peralta-Zaragoza O et al., 2006). Recentemente foi mostrado que E7 de HPV8 promove a atividade de Sp1/Sp3, a nível de promotor (KIRSCHBERG M et al., 2019).

Também foi visto, em outro estudo, que a proteína do vírus Epstein Barr, LMP-1, regula negativamente RECK, quando atua sobre a região responsiva de Sp1 de seu promotor, bem semelhante ao efeito de Sp1 em RECK. Esta mesma proteína, também pode ativar a via ERK reprimindo também o gene RECK, mostrando que a regulação de RECK pode ser tanto direta quanto indireta (LIU et al., 2003).

É de grande importância ressaltar que nossos resultados com HPV de alto e baixo risco foram semelhantes. Na década de 1970, o HPV foi associado ao câncer de pele pela primeira vez em pacientes com epidermodisplasia verruciforme (EV, JABLONSKA et al., 1972; AKGÜL et al., 2005). O HPV 5 e 8 são mais encontrados em lesões malignas, os HPV 14, 17, 20 e 47 também são encontrados, porém com menor frequência de infecção (MAJEWSKI et al., 1997). A EV é uma genodermatose autossômica recessiva rara caracterizada por lesões cutâneas verrucosas que possuem maior susceptibilidade a infecções pertencentes ao gênero betapapilomavírus humano (ORTH, 2008; O'BLENES

et al., 2015).

Por fim, em 2012, um estudo demonstrou que as células de Langerhans apresentam-se reduzidas na epiderme positiva para HPV8, em pacientes EV. Nesta análise, foi identificado o fator de transcrição de transcrição C/EBP β , do inglês *CCAAT/Enhancer-binding Protein β* , um regulador de proliferação e diferenciação celular (RAMJI; FOKA, 2002, NERLOV, 2007) que controla a expressão do gene de CCL20, do inglês *Langerhans cell attracting chemokine*, em queratinócitos humanos. Ainda, foi apresentado pela primeira vez que E7 de HPV8 suprimiu a expressão de CCL20 através de seu alvo C/EBP β permitindo sua persistência viral no epitélio (SPERLING T et al., 2012). Este fator, C/EBP β , também pode atuar na ativação ou repressão dos genes precoces de HPV33, sugerindo que esta relação seja comum entre tipos de HPV do gênero α (ALVAREZ et al., 2019).

Em conjunto, sugerimos um modelo referente ao mecanismo pelo qual diferentes proteínas moduladas por HPV podem estar envolvidas na regulação negativa do gene RECK.

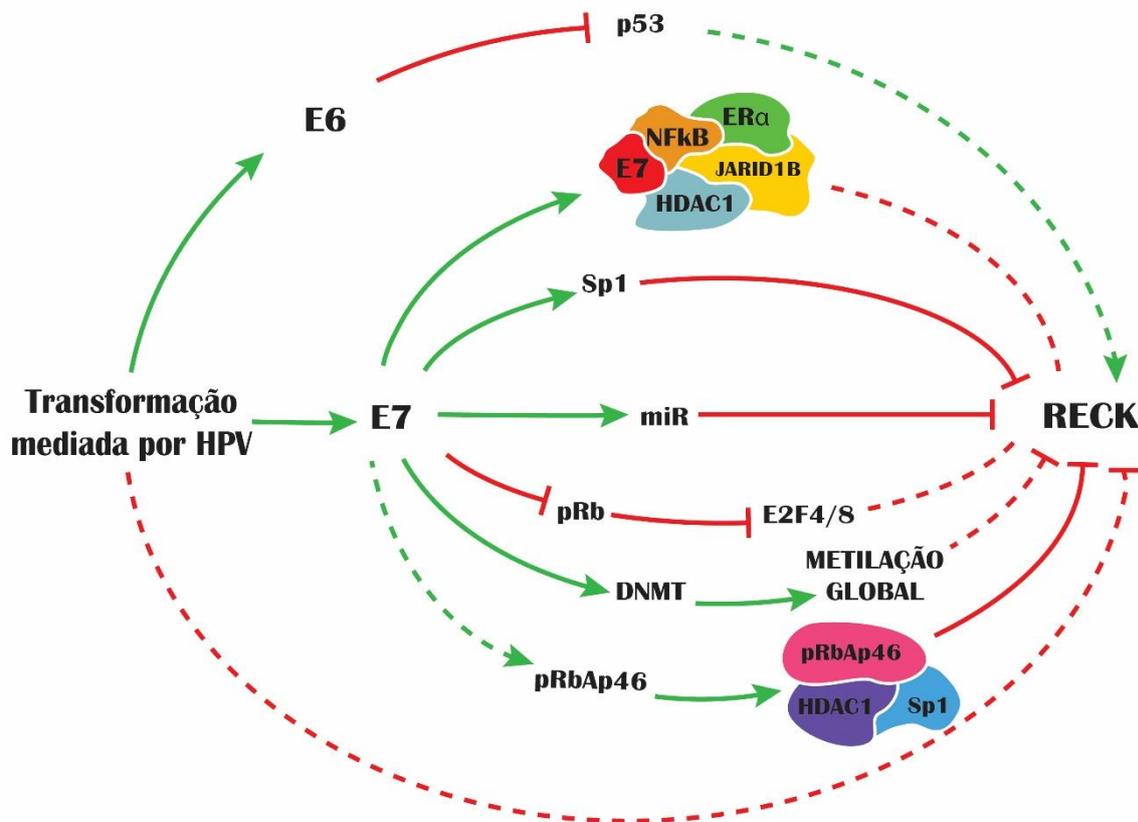


Figura 19. Modelo representativo do mecanismo de HPV com o gene RECK. Esquema sugerido do mecanismo que as proteínas E6 e E7 de HPV podem atuar sobre a regulação negativa do gene RECK.

6. CONCLUSÕES

- A expressão dos genes E6/E7 de HPV de alto e baixo risco oncogênico está associada à regulação negativa da atividade transcricional do promotor proximal do gene *RECK*.
- A expressão do gene E6 de HPV11 e HPV16 é suficiente para inibir a atividade transcricional de Luc300 e Luc800 em nosso sistema.
- O promotor proximal de *RECK* apresenta muitos sítios potenciais para ligação de fatores de transcrição sabidamente regulados por proteínas de HPV. Sugerindo que esses fatores podem estar associados à regulação da expressão deste gene;

REFERÊNCIAS*

* DE ACORDO COM: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 14724: INFORMAÇÃO E DOCUMENTAÇÃO: REFERÊNCIAS: ELABORAÇÃO. SÃO PAULO, 2019.

ADRIEN MOREL,¹ AURÉLIE BAGUET,¹ JÉRÔME PERRARD,¹ CAROLINE DEMERET,² ELISE JACQUIN,³ DAVID GUENAT,^{4,5} CHRISTIANE MOUGIN,^{1,4} AND JEAN-LUC PRÉTET^{1,4}. 5AZADC TREATMENT UPREGULATES MIR-375 LEVEL AND REPRESSES HPV16 E6 EXPRESSION. ONCOTARGET. 2017 JUL 11; 8(28): 46163–46176.

ALVAREZ J^{1,2,3}, GAGNON D^{1,2}, COUPLÉE F⁴, ARCHAMBAULT J^{5,6,7,8}. CHARACTERIZATION OF AN HPV33 NATURAL VARIANT WITH ENHANCED TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY SUGGESTS A ROLE FOR C/EBPB IN THE REGULATION OF THE VIRAL EARLY PROMOTER. SCI REP. 2019 MAR 25;9(1):5113. DOI: 10.1038/S41598-019-41102-7.

BALSITIS S, DICK F, DYSON N, LAMBERT PF. CRITICAL ROLES FOR NON-PRB TARGETS OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 16 E7 IN CERVICAL CARCINOGENESIS. CANCER RES. 66(19): 9393–9400 (2006).

BALSITIS SJ, SAGE J, DUENSING S, MÜNGER K, JACKS T, LAMBERT PF. RECAPITULATION OF THE EFFECTS OF THE HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 16 E7 ONCOGENE ON MOUSE EPITHELIUM BY SOMATIC RB DELETION AND DETECTION OF PRB-INDEPENDENT EFFECTS OF E7 IN VIVO. MOL. CELL. BIOL. 23(24): 9094–9103 (2003).

BARBOSA MS, EDMONDS C, FISHER C, SCHILLER JT, LOWY DR, VOUSDEN KH. THE REGION OF THE HPV E7 ONCOPROTEIN HOMOLOGOUS TO ADENOVIRUS E1A AND SV40 LARGE T ANTIGEN CONTAINS SEPARATE DOMAINS FOR RB BINDING AND CASEIN KINASE II PHOSPHORYLATION. EMBO J. 9(1): 153-60 (1990).

BISSEL, MJ; LABARGE, MA. CONTEXT, TISSUE PLASTICITY, AND CANCER: ARE TUMOR STEM CELLS ALSO REGULATED BY MICROENVIRONMENT? CANCER CELL, V. 7, N. 1, P. 17-23, JAN. 2015.

BOCCARDO E1, NOYA F, BROKER TR, CHOW LT, VILLA LL. HPV-18 CONFERS RESISTANCE TO TNF-ALPHA IN ORGANOTYPIC CULTURES OF HUMAN KERATINOCYTES. VIROLOGY. 2004 OCT 25;328(2):233-43.

BOULET G, HORVATH C, VANDEN BROECK D, SAHEBALI S, BOGERS J. HUMAN PAPILLOMAVIRUS: E6 AND E7 ONCOGENES. INT J BIOCHEM CELL BIOL. 39(11): 2006-11 (2007).

CARDEAL LB, BOCCARDO E, TERMINI L, RABACHINI T, ANDREOLI MA, DI LORETO C, LONGATTO FILHO A, VILLA LL, MARIA-ENGLER SS. HPV16 ONCOPROTEINS INDUCE MMPS/RECK-TIMP-2 IMBALANCE IN PRIMARY KERATINOCYTES: POSSIBLE IMPLICATIONS IN CERVICAL CARCINOGENESIS. PLOS ONE. 7(3): E33585 (2012).

CARDEAL LB, BROHEM CA, CORRÊA TCS, WINNISCHOFER SMB, NAKANO F, BOCCARDO E, VILLA LL, SOGAYAR MC, MARIA-ENGLER SS. HIGHER EXPRESSION AND ACTIVITY OF METALLOPROTEINASES IN HUMAN CERVICAL CARCINOMA CELL LINES IS ASSOCIATED WITH HPV PRESENCE. BIOCHEM CELL BIOL. 84: 713–719 (2006).

CHEN D1, CUI QC, YANG H, DOU QP. DISULFIRAM, A CLINICALLY USED ANTI-ALCOHOLISM DRUG AND COPPER-BINDING AGENT, INDUCES APOPTOTIC CELL DEATH IN BREAST CANCER CULTURES AND XENOGRAFTS VIA INHIBITION OF THE PROTEASOME ACTIVITY. CANCER RES. 2006 NOV 1;66(21):10425-33.

CHEN TINGTING, 1 YANG SHIZHOU, 1 ZHANG SONGFA, 1 XU JUNFEN, 1 LU WEIGUO, 1 CHENG XIAODONG, 1 AND XIE XING 1 .HUMAN PAPILOMAVIRUS 16E6/E7 ACTIVATES AUTOPHAGY VIA ATG9B AND LAMP1 IN CERVICAL CANCER CELLS. CANCER MED. 2019 AUG; 8(9): 4404–4416.

CLARK JC1, THOMAS DM, CHOONG PF, DASS CR. RECK--A NEWLY DISCOVERED INHIBITOR OF METASTASIS WITH PROGNOSTIC SIGNIFICANCE IN MULTIPLE FORMS OF CANCER.CANCER METASTASIS REV. 2007 DEC;26(3-4):675-83.

CONG J1, WANG Y1, ZHANG X1, ZHANG N1, LIU L1, SOUKUP K1, MICHELAKOS T1, HONG T2, DELEO A3, CAI L1, SABBATINO F1, FERRONE S4, LEE H5, LEVINA V6, FUCHS B1, TANABE K1, LILLEMoe K7, FERRONE C1, WANG X8. A NOVEL CHEMORADIATION TARGETING STEM AND NONSTEM PANCREATIC CANCER CELLS BY REPURPOSING DISULFIRAM. CANCER LETT. 2017 NOV 28;409:9-19. DOI: 10.1016/J.CANLET.2017.08.028. EPUB 2017 AUG 30.

DÍAZ-GONZÁLEZ,1 EDUARDO DANIEL RODRÍGUEZ-AGUILAR,2ANGÉLICA MENESES-ACOSTA,3 VIVIANA VALADEZ-GRAHAM,4 JESSICA DEAS,2CLAUDIA GÓMEZ-CERÓN,2 CARLOS ALBERTO TAVIRAMONTALVÁN,3ALITZEL ARIZMENDI-HERAS,2 JULIÁN RAMÍREZ-BELLO,5MARIO ENRIQUE ZURITA-ORTEGA,4 BERENICE ILLADES-AGUIAR,1MARCO ANTONIO LEYVA-VÁZQUEZ,1 GLORIA FERNÁNDEZ-TILAPA,1VÍCTOR HUGO BERMÚDEZ-MORALES,2 VICENTE MADRID-MARINA,2MAURICIO RODRÍGUEZ-DORANTES,6 CARLOS PÉREZ-PLASENCIA,7,8 AND OSCAR PERALTA-ZARAGOZA 2 TRANSREGULATION OF

MICRORNA MIR-21 PROMOTER BY AP-1 TRANSCRIPTION FACTOR IN CERVICAL CANCER CELLS. *CANCER CELL INT.* 2019; 19: 214.

DISCACCIATI MG, GIMENES F, PENNACCHI PC, FAIÃO-FLORES F, ZEFERINO LC, DERCHAIN SM, TEIXEIRA JC, COSTA MC, ZONTA M, TERMINI L, BOCCARDO E, LONGATTO-FILHO A, CONSOLARO ME, VILLA LL, MARIA-ENGLER SS. MMP-9/RECK IMBALANCE: A MECHANISM ASSOCIATED WITH HIGH-GRADE CERVICAL LESIONS AND GENITAL INFECTION BY HUMAN PAPILOMAVIRUS AND CHLAMYDIA TRACHOMATIS. *CANCER EPIDEMIOLOGICAL BIOMARKERS PREV.* 24(10):1539-47 (2015).

DOORBAR J, QUINT W, BANKS L, BRAVO IG, STOLER M, BROKER TR, STANLEY MA. THE BIOLOGY AND LIFE-CYCLE OF HUMAN PAPILOMAVIRUSES. *VACCINE.* (30)5: F55-70 (2012).

DUENSING S, MÜNGER K. HUMAN PAPILOMAVIRUSES AND CENTROSOME DUPLICATION ERRORS: MODELING THE ORIGINS OF GENOMIC INSTABILITY. *ONCOGENE.* 21(40): 6241-8 (2002).

DYSON N, HOWLEY PM, MÜNGER K & HARLOW E. THE HUMAN PAPILOMAVIRUS-16 E7 ONCOPROTEIN IS ABLE TO BIND TO THE RETINOBLASTOMA GENE PRODUCT. *SCIENCE.* 243: 934–937 (1989).

EISENBERG I, HOCHNER H, SADEH M, ARGOV Z, MITRANI-ROSENBAUM S. ESTABLISHMENT OF THE GENOMIC STRUCTURE AND IDENTIFICATION OF THIRTEEN SINGLE-NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS IN THE HUMAN RECK GENE. *CYTOGENETIC AND GENOME RESEARCH.* 97: 58–61 (2002).

ERTOSUN MG, HAPIL FZ, OZES ON. E2F1 TRANSCRIPTION FACTOR AND ITS IMPACT ON GROWTH FACTOR AND CYTOKINE SIGNALING. *CYTOKINE GROWTH FACTOR REV.* 31: 17-25 (2016).

FAN Z1, CUI H2, XU X3, LIN Z1, ZHANG X1, KANG L4, HAN B5, MENG J1, YAN Z1, YAN X1, JIAO MIR-125A SUPPRESSES TUMOR GROWTH, INVASION AND METASTASIS IN CERVICAL CANCER BY TARGETING STAT3. *ONCOTARGET.* 2015 SEP 22;6(28):25266-80. DOI: 10.18632/ONCOTARGET.4457.

FEHRMANN F, LAIMINS L. HUMAN PAPILOMAVIRUSES: TARGETING DIFFERENTIATING EPITHELIAL CELLS FOR MALIGNANT TRANSFORMATION. *ONCOGENE.* 22: 5201–5207 (2003).

FORMAN D, DE MARTEL C, LACEY CJ, SOERJOMATARAM I, LORTET-TIEULENT J, BRUNI L, VIGNAT J, FERLAY J, BRAY F, PLUMMER M, FRANCESCHI S. GLOBAL BURDEN OF HUMAN PAPILOMAVIRUS AND RELATED DISEASES. *VACCINE.* (30)5: F12-23 (2012).

FUNK JO, WAGA S, HARRY JB, ESPLING E, STILLMAN B, GALLOWAY DA. INHIBITION OF CDK ACTIVITY AND PCNA-DEPENDENT DNA REPLICATION BY P21 IS BLOCKED BY INTERACTION WITH THE HPV-16 E7 ONCOPROTEIN. GENES DEV. 11(16): 2090-100 (1997).

FURUMOTO K1, ARII S, MORI A, FURUYAMA H, GORRIN RIVAS MJ, NAKAO T, ISOBE N, MURATA T, TAKAHASHI C, NODA M, IMAMURA M. RECK GENE EXPRESSION IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA: CORRELATION WITH INVASION-RELATED CLINICOPATHOLOGICAL FACTORS AND ITS CLINICAL SIGNIFICANCE. REVERSE-INDUCING--CYSTEINE-RICH PROTEIN WITH KAZAL MOTIFS. HEPATOLOGY. 2001 JAN;33(1):189-95.

GHITTONI R, ACCARDI R, HASAN U, GHEIT T, SYLLA B, TOMMASINO M. THE BIOLOGICAL PROPERTIES OF E6 AND E7 ONCOPROTEINS FROM HUMAN PAPILOMAVIRUSES. VIRUS GENES. 40(1): 1-13 (2010).

GLOBOCAN (2018), CANCER INCIDENCE AND MORTALITY WORLDWIDE. ([HTTP://WWW.DEP.IARC.FR](http://www.dep.iarc.fr)), ÚLTIMO ACESSO EM 20 DE SET. 2019.

HANAHAN D. STUDIES ON TRANSFORMATION OF ESCHERICHIA COLI WITH PLASMIDS. J MOL BIOL. 1983 JUN 5;166(4):557-80.

HANS-ULRICH BERNARD,(1) ROBERT D. BURK,(2)(3) ZIGUI CHEN,(2) KOENRAAD VAN DOORSLAER,(2) HARALD ZUR HAUSEN,(3) AND ETHEL-MICHELE DE VILLIERS(4) CLASSIFICATION OF PAPILOMAVIRUSES (PVS) BASED ON 189 PV TYPES AND PROPOSAL OF TAXONOMIC AMENDMENTS VIROLOGY. 2010 MAY 25; 401(1): 70–79.

HASAN UA, BATES E, TAKESHITA F, BILIATO A, ACCARDI R, BOUVARD V, MANSOUR M, VINCENT I, GISSMANN L, IFTNER T, SIDERI M, STUBENRAUCH F, TOMMASINO M. TLR9 EXPRESSION AND FUNCTION IS ABOLISHED BY THE CERVICAL CANCER-ASSOCIATED HUMAN PAPILOMAVIRUS TYPE 16. J IMMUNOL. 178(5): 3186-97 (2007).

HASAN UA, ZANNETTI C, PARROCHE P, GOUTAGNY N, MALFROY M, ROBLOT G, CARREIRA C, HUSSAIN I, MÜLLER M, TAYLOR-PAPADIMITRIOU J, PICARD D, SYLLA BS, TRINCHIERI G, MEDZHITOV R, TOMMASINO M. THE HUMAN PAPILOMAVIRUS TYPE 16 E7 ONCOPROTEIN INDUCES A TRANSCRIPTIONAL REPRESSOR COMPLEX ON THE TOLL-LIKE RECEPTOR 9 PROMOTER. J EXP MED. 210(7): 1369-87 (2013).

HEBNER CM1, LAIMINS LA. HUMAN PAPILOMAVIRUSES: BASIC MECHANISMS OF PATHOGENESIS AND ONCOGENICITY. REV MED VIROL. 2006 MAR-APR;16(2):83-97.

HENKEN FE1, DE-CASTRO ARCE J, RÖSL F, BOSCH L, MEIJER CJ, SNIJDERS PJ, STEENBERGEN RD. THE FUNCTIONAL ROLE OF NOTCH SIGNALING IN

HPV-MEDIATED TRANSFORMATION IS DOSE-DEPENDENT AND LINKED TO AP-1 ALTERATIONS. *CELL ONCOL (DORDR)*. 2012 APR;35(2):77-84. DOI: 10.1007/S13402-011-0062-4. EPUB 2012 JAN 24.

HERBSTER S1, PALADINO A1, DE FREITAS S1, BOCCARDO E1. ALTERATIONS IN THE EXPRESSION AND ACTIVITY OF EXTRACELLULAR MATRIX COMPONENTS IN HPV-ASSOCIATED INFECTIONS AND DISEASES. *CLINICS (SAO PAULO)*. 2018 SEP 6;73(SUPPL 1):E551S. DOI: 10.6061/CLINICS/2018/E551S.

HUANG SM, MCCANCE DJ. DOWN REGULATION OF THE INTERLEUKIN-8 PROMOTER BY HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 16 E6 AND E7 THROUGH EFFECTS ON CREB BINDING PROTEIN/P300 AND P/CAF. *J VIROL*. 76(17): 8710-21 (2002).

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA): ESTIMATIVAS 2015, INCIDÊNCIA DE CÂNCER NO BRASIL (2015).

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA): ESTIMATIVAS 2018/2019, INCIDÊNCIA DE CÂNCER NO BRASIL (2017).

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC) – WHO. [HTTPS://GCO.IARC.FR/](https://gco.iarc.fr/). ACESSO EM: 15 DE JUN, 2019.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). IARC MONOGRAPHS ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS: HUMAN PAPILLOMAVIRUSES. VOLUME 90 (2007).

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). IARC MONOGRAPHS ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS: HUMAN PAPILLOMAVIRUSES. VOLUME 100F (2012).

JUNG HM1, PHILLIPS BL, PATEL RS, COHEN DM, JAKYMIW A, KONG WW, CHENG JQ, CHAN EK. KERATINIZATION-ASSOCIATED MIR-7 AND MIR-21 REGULATE TUMOR SUPPRESSOR REVERSION-INDUCING CYSTEINE-RICH PROTEIN WITH KAZAL MOTIFS (RECK) IN ORAL CANCER. *J BIOL CHEM*. 2012 AUG 24;287(35):29261-72. DOI: 10.1074/JBC.M112.366518. EPUB 2012 JUL 2.

JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J. TECIDO CONJUNTIVO. IN: HISTOLOGIA BÁSICA. RIO DE JANEIRO: GUANABARA KOOGAN, 2004.P 92.

KALRA R1, BHAGYARAJ E1, TIWARI D1, NANDURI R1, CHACKO AP1, JAIN M1, MAHAJAN S1, KHATRI N1, GUPTA P2. AIRE PROMOTES ANDROGEN-INDEPENDENT PROSTATE CANCER BY DIRECTLY REGULATING IL-6 AND MODULATING TUMOR MICROENVIRONMENT. *ONCOGENESIS*. 2018 MAY 25;7(5):43. DOI: 10.1038/S41389-018-0053-7.

KANAI M1, WEI D, LI Q, JIA Z, AJANI J, LE X, YAO J, XIE K. LOSS OF KRÜPPEL-LIKE FACTOR 4 EXPRESSION CONTRIBUTES TO SP1 OVEREXPRESSION AND

HUMAN GASTRIC CANCER DEVELOPMENT AND PROGRESSION. CLIN CANCER RES. 2006 NOV 1;12(21):6395-402.

KANG H1, KIM C1, LEE H1, RHO JG2, SEO JW3, NAM JW3, SONG WK4, NAM SW5,6, KIM W2, LEE EK1,6. DOWNREGULATION OF MICRORNA-362-3P AND MICRORNA-329 PROMOTES TUMOR PROGRESSION IN HUMAN BREAST CANCER. CELL DEATH DIFFER. 2016 MAR;23(3):484-95. DOI: 10.1038/CDD.2015.116. EPUB 2015 SEP 4.

KANG H1, KIM C1, LEE H1, RHO JG2, SEO JW3, NAM JW3, SONG WK4, NAM SW5,6, KIM W2, LEE EK1,6. DOWNREGULATION OF MICRORNA-362-3P AND MICRORNA-329 PROMOTES TUMOR PROGRESSION IN HUMAN BREAST CANCER. CELL DEATH DIFFER. 2016 MAR;23(3):484-95. DOI: 10.1038/CDD.2015.116. EPUB 2015 SEP 4.

KARL MÜNGER, AMY BALDWIN, KIRSTEN M. EDWARDS, HIROYUKI HAYAKAWA, CHRISTINE L. NGUYEN, MICHAEL OWENS, MIRANDA GRACE, AND KYUNGWON HUH. MECHANISMS OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS-INDUCED ONCOGENESIS. J VIROL. 2004 NOV; 78(21): 11451–11460.

KETOLA K1, KALLIONIEMI O, ILJIN K. CHEMICAL BIOLOGY DRUG SENSITIVITY SCREEN IDENTIFIES SUNITINIB AS SYNERGISTIC AGENT WITH DISULFIRAM IN PROSTATE CANCER CELLS. PLOS ONE. 2012;7(12):E51470. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0051470. EPUB 2012 DEC 12.

KIM SK, RO JY, KEMP BL, LEE JS, KWON TJ, FONG KM, SEKIDO Y, MINNA JD, HONG WK, MAO L. IDENTIFICATION OF THREE DISTINCT TUMOR SUPPRESSOR LOCI ON THE SHORT ARM OF CHROMOSOME 9 IN SMALL CELL LUNG CANCER. CANCER RESEARCH. 57: 400–403 (1997).

KIRSCHBERG M1, HEUSER S1, SYED AS1, STEGER G1, MAJEWSKI S2, HUFBAUER M1, AKGÜL B3. HPV8 ACTIVATES CELLULAR GENE EXPRESSION MAINLY THROUGH SP1/3 BINDING SITES. VIROLOGY. 2019 JUL 1;535:136-143. DOI: 10.1016/J.VIROL.2019.06.019. [EPUB AHEAD OF PRINT]

KLINGELHUTZ AJ, ROMAN A. CELLULAR TRANSFORMATION BY HUMAN PAPILLOMAVIRUSES: LESSONS LEARNED BY COMPARING HIGH- AND LOW-RISK VIRUSES. VIROLOGY. 424(2): 77-98 (2012).

KORZENIEWSKI N, SPARDY N, DUENSING A, DUENSING S. B- GENOMIC INSTABILITY AND CANCER: LESSONS LEARNED FROM HUMAN PAPILLOMAVIRUSES. CANCER LETT. 305(2): 113-22 (2011A).

KORZENIEWSKI N, TREAT B, DUENSING S. A- THE HPV-16 E7 ONCOPROTEIN INDUCES CENTRIOLE MULTIPLICATION THROUGH DEREGLATION OF POLO-LIKE KINASE 4 EXPRESSION. MOL CANCER. 10: 61-65 (2011B).

KOWSHIK J1, MISHRA R2, SOPHIA J1, RAUTRAY S1, ANBARASU K3, REDDY GD4, DIXIT M3, MAHALINGAM S3, NAGINI S5. NIMBOLIDE UPREGULATES RECK BY TARGETING MIR-21 AND HIF-1A IN CELL LINES AND IN A HAMSTER ORAL CARCINOGENESIS MODEL. *SCI REP.* 2017 MAY 17;7(1):2045. DOI: 10.1038/S41598-017-01960-5.

KUMAR,1,2 ARTI YADAV,2 JAMES C. LANG,1,2THEODOROS N. TEKNOS,1,2 AND PAWAN KUMAR1 SUBEROYLANILIDE HYDROXAMIC ACID (SAHA) REVERSES CHEMORESISTANCE IN HEAD AND NECK CANCER CELLS BY TARGETING CANCER STEM CELLS VIA THE DOWNREGULATION OF NANOG GENES CANCER. 2015 MAR; 6(3-4): 169–181.

LEE EY1, CAM H, ZIEBOLD U, RAYMAN JB, LEES JA, DYNLACHT BD. E2F4 LOSS SUPPRESSES TUMORIGENESIS IN RB MUTANT MICE. *CANCER CELL.* 2002 DEC;2(6):463-72.

LI J, CHU ZP, HAN H, ZHANG Y, TIAN F, ZHANG JQ, HUANG XH. SUPPRESSION OF MIR-93-5P INHIBITS HIGH-RISK HPV-POSITIVE CERVICAL CANCER PROGRESSION VIA TARGETING OF BTG3. *HUM CELL.* 2019 APR;32(2):160-171. DOI: 10.1007/S13577-018-00225-1. EPUB 2019 JAN 28.

LIANG F1, KINA S, TAKEMOTO H, MATAYOSHI A, PHONAPHONH T, SUNAGAWA N, ARAKAKI K, ARASAKI A, KUANG H, SUNAKAWA H. HPV16E6-DEPENDENT C-FOS EXPRESSION CONTRIBUTES TO AP-1 COMPLEX FORMATION IN SIHA CELLS. *MEDIATORS INFLAMM.* 2011;2011:263216. DOI: 10.1155/2011/263216. EPUB 2011 JUL 31.

LIU S1, SONG L1, YAO H1, ZHANG L1, XU D1, GAO F1, LI Q1. MIR-375 IS EPIGENETICALLY DOWNREGULATED BY HPV-16 E6 MEDIATED DNMT1 UPREGULATION AND MODULATES EMT OF CERVICAL CANCER CELLS BY SUPPRESSING LNCRNA MALAT1. *PLOS ONE.* 2016 SEP 22;11(9):E0163460. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0163460. ECOLLECTION 2016.

LIU Y, HEILMAN SA, ILLANES D, SLUDER G, CHEN JJ. P53-INDEPENDENT ABROGATION OF A POSTMITOTIC CHECKPOINT CONTRIBUTES TO HUMAN PAPILLOMAVIRUS E6-INDUCED POLYPLOIDY. *CANCER RES.* 67: 2603–2610 (2007).

LOU Z1, MAHER VM, MCCORMICK JJ. IDENTIFICATION OF THE PROMOTER OF HUMAN TRANSCRIPTION FACTOR SP3 AND EVIDENCE OF THE ROLE OF FACTORS SP1 AND SP3 IN THE EXPRESSION OF SP3 PROTEIN. *GENE.* 2005 MAY 23;351:51-9. EPUB 2005 APR 25.

MASUI T1, DOI R, KOSHIBA T, FUJIMOTO K, TSUJI S, NAKAJIMA S, KOIZUMI M, TOYODA E, TULACHAN S, ITO D, KAMI K, MORI T, WADA M, NODA M, IMAMURA M. RECK EXPRESSION IN PANCREATIC CANCER: ITS

CORRELATION WITH LOWER INVASIVENESS AND BETTER PROGNOSIS. *CLIN CANCER RES.* 2003 MAY;9(5):1779-84.

MCLAUGHLIN-DRUBIN ME, MÜNGER K. THE HUMAN PAPILLOMAVIRUS E7 ONCOPROTEIN. *VIROLOGY.* 384(2): 335-44 (2009).

MENG N, LI Y, ZHANG H AND SUN XF. RECK, A NOVEL MATRIX METALLOPROTEINASE REGULATOR. *HISTOL HISTOPATHOL.* 23: 1003-1010 (2008).

MIN W1, WEN-LI M, ZHAO-HUI S, LING L, BAO Z, WEN-LING Z. MICROARRAY ANALYSIS IDENTIFIES DIFFERENTIALLY EXPRESSED GENES INDUCED BY HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 18 E6 SILENCING RNA. *INT J GYNECOL CANCER.* 2009 MAY;19(4):547-63. DOI: 10.1111/IGC.0B013E3181A44C68.

MITTAL S, BANKS L. MOLECULAR MECHANISMS UNDERLYING HUMAN PAPILLOMAVIRUS E6 AND E7 ONCOPROTEIN-INDUCED CELL TRANSFORMATION. *MUTAT RES REV MUTAT RES.* 772:23-35 (2017).

MORALE MG1,2, DA SILVA ABJAUDE W3, SILVA AM3, VILLA LL2,4, BOCCARDO E5. HPV-TRANSFORMED CELLS EXHIBIT ALTERED HMGB1-TLR4/MYD88-SARM1 SIGNALING AXIS. *SCI REP.* 2018 FEB 22;8(1):3476. DOI: 10.1038/S41598-018-21416-8.

MÜNGER K, WERNESS BA, DYSON N, PHELPS WC, HARLOW E, HOWLEY PM. COMPLEX FORMATION OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS E7 PROTEINS WITH THE RETINOBLASTOMA TUMOR SUPPRESSOR GENE PRODUCT. *EMBO J.* 8(13): 4099-105 (1989).

MURAI R1, YOSHIDA Y, MURAGUCHI T, NISHIMOTO E, MORIOKA Y, KITAYAMA H, KONDOH S, KAWAZOE Y, HIRAOKA M, UESUGI M, NODA M. A NOVEL SCREEN USING THE RECK TUMOR SUPPRESSOR GENE PROMOTER DETECTS BOTH CONVENTIONAL AND METASTASIS-SUPPRESSING ANTICANCER DRUGS. *ONCOTARGET.* 2010 AUG;1(4):252-64.

MYSLIWIEC AG, ORNSTEIN DL. MATRIX METALLOPROTEINASES IN COLORECTAL CANCER. *CLIN COLORECTAL CANCER.* 1(4): 208-19 (2002).

NARISAWA-SAITO M1, KIYONO T. BASIC MECHANISMS OF HIGH-RISK HUMAN PAPILLOMAVIRUS-INDUCED CARCINOGENESIS: ROLES OF E6 AND E7 PROTEINS. *CANCER SCI.* 2007 OCT;98(10):1505-11. EPUB 2007 JUL 23.

NAYAR R1, WILBUR DC. THE PAP TEST AND BETHESDA 2014. "THE REPORTS OF MY DEMISE HAVE BEEN GREATLY EXAGGERATED." (AFTER A QUOTATION FROM MARK TWAIN). *ACTA CYTOL.* 2015;59(2):121-32.

NING S1, MA X2. DEPHOSPHORYLATION-INDUCED EZH2 ACTIVATION MEDIATED RECK DOWNREGULATION BY ERK1/2 SIGNALING. *J CELL*

RICHART RM. CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA. *PATHOL ANNU.* 1973;8:301-28.

RONCO LV, KARPOVA AY, VIDAL M, HOWLEY PM. HUMAN PAPILLOMAVIRUS 16 E6 ONCOPROTEIN BINDS TO INTERFERON REGULATORY FACTOR-3 AND INHIBITS ITS TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY. *GENES DEV.* 12(13): 2061-72 (1998).

RUTTKAY-NEDECKY B; JIMENEZ AMJ, NEJDL L, CHUDOBOVA D, GUMULEC J, MASARIK M, ADAM V, KIZEK R. RELEVANCE OF INFECTION WITH HUMAN PAPILLOMAVIRUS: THE ROLE OF THE P53 TUMOR SUPPRESSOR PROTEIN AND E6/E7 ZINC FINGER PROTEINS. *INT. J. ONCOLOGY.* 43(6): 1754-62 (2013).

SAMBROOK J, FRITSCHI EF AND MANIATIS T (1989) *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, NEW YORK.

SASAHARA RM1, TAKAHASHI C, NODA M. INVOLVEMENT OF THE SP1 SITE IN RAS-MEDIATED DOWNREGULATION OF THE RECK METASTASIS SUPPRESSOR GENE. *BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN.* 1999 NOV 2;264(3):668-75.

SCHLECHT NF, KULAGA S, ROBITAILLE J, FERREIRA S, SANTOS M, MIYAMURA RA, DUARTE-FRANCO E, ROHAN TE, FERENCZY A, VILLA LL, FRANCO EL. PERSISTENT HUMAN PAPILLOMAVIRUS INFECTION AS A PREDICTOR OF CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA. *JAMA.* (24): 3106-14 (2001).

SHEU BC, LIEN HC, HO HN, LIN HH, CHOW SN, HUANG SC, HSU SM. INCREASED EXPRESSION AND ACTIVATION OF GELATINOLYTIC MATRIX METALLOPROTEINASES IS ASSOCIATED WITH THE PROGRESSION AND RECURRENCE OF HUMAN CERVICAL CANCER. *CANCER RES.* 63(19): 6537-42 (2003).

SHIN MK, SAGE J, LAMBERT PF. INACTIVATING ALL THREE RB FAMILY POCKET PROTEINS IS INSUFFICIENT TO INITIATE CERVICAL CANCER. *CANCER RES.* 72 (20), 5418–5427 (2012).

SLEDGE GW1, NEUBERG D, BERNARDO P, INGLE JN, MARTINO S, ROWINSKY EK, WOOD WC. PHASE III TRIAL OF DOXORUBICIN, PACLITAXEL, AND THE COMBINATION OF DOXORUBICIN AND PACLITAXEL AS FRONT-LINE CHEMOTHERAPY FOR METASTATIC BREAST CANCER: AN INTERGROUP TRIAL (E1193). *J CLIN ONCOL.* 2003 FEB 15;21(4):588-92.

SOLOMON D1, DAVEY D, KURMAN R, MORIARTY A, O'CONNOR D, PREY M, RAAB S, SHERMAN M, WILBUR D, WRIGHT T JR, YOUNG N; FORUM GROUP MEMBERS; BETHESDA 2001 WORKSHOP. THE 2001 BETHESDA SYSTEM:

TERMINOLOGY FOR REPORTING RESULTS OF CERVICAL CYTOLOGY. JAMA. 2002 APR 24;287(16):2114-9.

SONG L1, LIU S2, YAO H1, ZHANG L1, LI Y1, XU D1, LI Q1. MIR-362-3P IS DOWNREGULATED BY PROMOTER METHYLATION AND INDEPENDENTLY PREDICTS SHORTER OS OF CERVICAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA. ONCOGENE. 1999 MAY 27;18(21):3187-98.

SOTO U1, DAS BC, LENGERT M, FINZER P, ZUR HAUSEN H, RÖSL F. CONVERSION OF HPV 18 POSITIVE NON-TUMORIGENIC HELA-FIBROBLAST HYBRIDS TO INVASIVE GROWTH INVOLVES LOSS OF TNF-ALPHA MEDIATED REPRESSION OF VIRAL TRANSCRIPTION AND MODIFICATION OF THE AP-1 TRANSCRIPTION COMPLEX. CANCER. 2003 JUN 1;97(11):2710-5.

SPARDY N, COVELLA K, CHA E, HOSKINS EE, WELLS SI, DUENSING A, DUENSING S. HUMAN PAPILLOMAVIRUS 16 E7 ONCOPROTEIN ATTENUATES DNA DAMAGE CHECKPOINT CONTROL BY INCREASING THE PROTEOLYTIC TURNOVER OF CLASPIN. CANCER RES. 69(17): 7022-9 (2009).

SPERLING T1, OŁDAK M, WALCH-RÜCKHEIM B, WICKENHAUSER C, DOORBAR J, PFISTER H, MALEJCZYK M, MAJEWSKI S, KEATES AC, SMOLA S. HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 8 INTERFERES WITH A NOVEL C/EBPβ-MEDIATED MECHANISM OF KERATINOCYTE CCL20 CHEMOKINE EXPRESSION AND LANGERHANS CELL MIGRATION. PLOS PATHOG. 2012;8(7):E1002833. DOI: 10.1371/JOURNAL.PPAT.1002833. EPUB 2012 JUL 26.

TAKAHASHI C, SHENG Z, HORAN TP, KITAYAMA H, MAKI M, HITOMI K, KITaura Y, TAKAI S, SASAHARA RM, HORIMOTO A, IKAWA Y, RATZKIN BJ, ARAKAWA T, NODA M. REGULATION OF MATRIX METALLOPROTEINASE-9 AND INHIBITION OF TUMOR INVASION BY THE MEMBRANE-ANCHORED GLYCOPROTEIN RECK. PROC NATL ACAD SCI U S A. 95(22): 13221-6 (1998A).

TAKAHASHI C1, SHENG Z, HORAN TP, KITAYAMA H, MAKI M, HITOMI K, KITaura Y, TAKAI S, SASAHARA RM, HORIMOTO A, IKAWA Y, RATZKIN BJ, ARAKAWA T, NODA M. REGULATION OF MATRIX METALLOPROTEINASE-9 AND INHIBITION OF TUMOR INVASION BY THE MEMBRANE-ANCHORED GLYCOPROTEIN RECK. PROC NATL ACAD SCI U S A. 1998 OCT 27;95(22):13221-6.

THOMAS JT, LAIMINS LA. HUMAN PAPILLOMAVIRUS ONCOPROTEINS E6 AND E7 INDEPENDENTLY ABROGATE THE MITOTIC SPINDLE CHECKPOINT. J VIROL. 72(2): 1131-7 (1998).

THOMAS M, PIM D, BANKS L. THE ROLE OF THE E6-P53 INTERACTION IN THE MOLECULAR PATHOGENESIS OF HPV. ONCOGENE. 18(53): 7690-700 (1999).

TOMMASINO M. THE HUMAN PAPILLOMAVIRUS FAMILY AND ITS ROLE IN CARCINOGENESIS. SEMINARS IN CANCER BIOLOGY. 26: 13-21 (2014).

TONG X, HOWLEY PM. THE BOVINE PAPILLOMAVIRUS E6 ONCOPROTEIN INTERACTS WITH PAXILLIN AND DISRUPTS THE ACTIN CYTOSKELETON. PROC NATL ACAD SCI U S A. 94(9): 4412-7 (1997).

TROMBETTA-LIMA, M.; MARIA, S.; WINNISCHOFER, B.; ANGELO, M.; DEMASI, A.; FILHO, R. A.; OLIVEIRA CARREIRA, A. C.; WEI, B.; DE ASSIS RIBAS, T.; KONIG, M. S.; BOWMAN-COLIN, C.; OBA-SHINJO, S. M.; KAZUE, S.; MARIE, N.; STETLER-STEVENSON, W.; SOGAYAR, M. C. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF NOVEL RECK TUMOR SUPPRESSOR GENE SPLICE VARIANTS. ONCOTARGET, V. 6, N. 32 (2015).

TROTTIER H1, FRANCO EL. THE EPIDEMIOLOGY OF GENITAL HUMAN PAPILLOMAVIRUS INFECTION. VACCINE. 2006 MAR 30;24 SUPPL 1:S1-15.

WALBOOMERS JM1, JACOBS MV, MANOS MM, BOSCH FX, KUMMER JA, SHAH KV, SNIJDERS PJ, PETO J, MEIJER CJ, MUÑOZ N. HUMAN PAPILLOMAVIRUS IS A NECESSARY CAUSE OF INVASIVE CERVICAL CANCER WORLDWIDE. J PATHOL. 1999 SEP;189(1):12-9.

WANG H1, MO P, REN S, YAN C. ACTIVATING TRANSCRIPTION FACTOR 3 ACTIVATES P53 BY PREVENTING E6-ASSOCIATED PROTEIN FROM BINDING TO E6. J BIOL CHEM. 2010 APR 23;285(17):13201-10. DOI: 10.1074/JBC.M109.058669. EPUB 2010 FEB 18.

WANG X1, GAO P2, WANG M3, LIU J4, LIN J1, ZHANG S1, ZHAO Y1, ZHANG J1, PAN W1, SUN Z5, SUN F1, ZHAO W5, GUO C1, WANG Q3. FEEDBACK BETWEEN E2F1 AND CIP2A REGULATED BY HUMAN PAPILLOMAVIRUS E7 IN CERVICAL CANCER: IMPLICATIONS FOR PROGNOSIS. AM J TRANSL RES. 2017 MAY 15;9(5):2327-2339. ECOLLECTION 2017.

WEN SW1, ZHANG YF1, LI Y1, LIU ZX2, LV HL1, LI ZH1, XU YZ1, ZHU YG1, TIAN ZQ1. CHARACTERIZATION AND EFFECTS OF MIR-21 EXPRESSION IN ESOPHAGEAL CANCER. GENET MOL RES. 2015 AUG 3;14(3):8810-8. DOI: 10.4238/2015.AUGUST.3.4.

WERNES BA, LEVINE AJ & HOWLEY PM. ASSOCIATION OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPES 16 AND 18 E6 PROTEINS WITH P53. SCIENCE. 248: 76-79 (1990).

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION - [HTTP://WWW.WHO.INT](http://www.who.int), 2012/2018. ACESSO EM: 01 DE SET. 2019.

WILDE, 1 JOHANNA DE-CASTRO ARCE, 2 PETER J. F. SNIJDERS, 1CHRIS J. L. M. MEIJER, 1 FRANK RÖSL, 2 AND RENSKÉ D. M. STEENBERGEN 1

ALTERATIONS IN AP-1 AND AP-1 REGULATORY GENES DURING HPV-INDUCED CARCINOGENESIS. *CELL ONCOL*. 2008; 30(1): 77–87.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. NATIONAL CANCER CONTROL PROGRAMMES: POLICIES AND MANAGERIAL GUIDELINES. 2.ED. GENEVA: WHO, 2002. [HTTPS://WWW.WHO.INT/HEALTH-TOPICS/CANCER#TAB=OVERVIEW](https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=overview)

XIAO W1, BAO ZX, ZHANG CY, ZHANG XY, SHI LJ, ZHOU ZT, JIANG WW. UPREGULATION OF MIR-31* IS NEGATIVELY ASSOCIATED WITH RECURRENT/NEWLY FORMED ORAL LEUKOPLAKIA. *PLOS ONE*. 2012;7(6):E38648. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0038648. EPUB 2012 JUN 18.

YAN C1, BOYD DD. ATF3 REGULATES THE STABILITY OF P53: A LINK TO CANCER. *CELL CYCLE*. 2006 MAY;5(9):926-9. EPUB 2006 MAY 1.

YAN C1, BOYD DD. ATF3 REGULATES THE STABILITY OF P53: A LINK TO CANCER. *CELL CYCLE*. 2006 MAY;5(9):926-9. EPUB 2006 MAY 1.

YAN LX1, HUANG XF, SHAO Q, HUANG MY, DENG L, WU QL, ZENG YX, SHAO JY. MICRORNA MIR-21 OVEREXPRESSION IN HUMAN BREAST CANCER IS ASSOCIATED WITH ADVANCED CLINICAL STAGE, LYMPH NODE METASTASIS AND PATIENT POOR PROGNOSIS. *RNA*. 2008 NOV;14(11):2348-60. DOI: 10.1261/RNA.1034808. EPUB 2008 SEP 23.

YAN PY1, ZHANG XA2. KNOCKDOWN OF E2F8 SUPPRESSES CELL PROLIFERATION IN COLON CANCER CELLS BY MODULATING THE NF-KB PATHWAY. *ANN CLIN LAB SCI*. 2019 SEP;49(4):474-480.

YANG X1, LU L2. EXPRESSION OF HPV-16 E6 PROTEIN AND P53 INACTIVATION INCREASES THE UTERINE CERVICAL CANCER INVASION. *DRUG RES (STUTTG)*. 2015 FEB;65(2):70-3. DOI: 10.1055/S-0034-1372614. EPUB 2014 MAY 15.

YEH HH, TSENG YF, HSU YC, LAN SH, WU SY, RAGHAVARAJU G, CHENG DE, LEE YR, CHANG TY, CHOW NH, HUNG WC AND LIU HS. RAS INDUCES EXPERIMENTAL LUNG METASTASIS THROUGH UP-REGULATION OF RBAP46 TO SUPPRESS RECK PROMOTER ACTIVITY. *BMC CANCER*. 15: 172 (2015).

YUAN Y1, MIN SJ, XU DQ, SHEN Y, YAN HY, WANG Y, WANG W, TAN YJ. EXPRESSIONS OF VEGF AND MIR-21 IN TUMOR TISSUES OF CERVICAL CANCER PATIENTS WITH HPV INFECTION AND THEIR RELATIONSHIPS WITH PROGNOSIS. *EUR REV MED PHARMACOL SCI*. 2018 OCT;22(19):6274-6279. DOI: 10.26355/EURREV_201810_16035.

ZAMANI S1, SOHRABI A2,3, HOSSEINI SM1, RAHNAMEY-FARZAMI M4, AKBARI A5. DEREGLATION OF MIR-21 AND MIR-29A IN CERVICAL CANCER RELATED TO HPV INFECTION. MICRORNA. 2019;8(2):110-115. DOI: 10.2174/2211536607666181017124349.

ZHANG W1, CHEN H1, CHEN Y1, LIU J1, WANG X2, YU X1, CHEN JJ3,4, ZHAO W1. CANCEROUS INHIBITOR OF PROTEIN PHOSPHATASE 2A CONTRIBUTES TO HUMAN PAPILOMAVIRUS ONCOPROTEIN E7-INDUCED CELL PROLIFERATION VIA E2F1. ONCOTARGET. 2015 MAR 10;6(7):5253-62.

ZHANG Y, JIA LG, WANG P, LI J, TIAN F, CHU ZP, KANG S. THE EXPRESSION AND SIGNIFICANCE OF LNCRNA HOST2 AND MICRORNA LET-7B IN HPV-POSITIVE CERVICAL CANCER TISSUES AND CELL LINES. EUR REV MED PHARMACOL SCI. 2019 MAR;23(6):2380-2390. DOI: 10.26355/EURREV_201903_17384.

ZHU S, WU H, WU F, NIE D, SHENG S, MO YY. MICRORNA-21 TARGETS TUMOR SUPPRESSOR GENES IN INVASION AND METASTASIS. CELL RES. 2008 MAR;18(3):350-9. DOI: 10.1038/CR.2008.24.

ZUR HAUSEN H. PAPILOMAVIRUSES AND CANCER: FROM BASIC STUDIES TO CLINICAL APPLICATION. NAT REV CANCER. 2(5): 342-50 (2002).

APÊNDICE 1

Promotor de RECK e seus iniciadores

TACAGGCATGAGCCACCGCGCCAGCCCCTGTCAAGAGTTTTAATGCTTTCCAGCAGCCACA
 CATCAAATGATTGCCATCAGGATTAGACAACCTTGAAGAACTTACCCCAACTGCCAAAGCCT
 ACATGTGATTCTACATCCCAATGTAACACTTATTTTTTTTTTTCTTTTAATTGAGATGGGGGT
 CTGACAACGTTGCCTGGGCTGGCCTCAAACCTCTGGGCTGAAGTTATCCTCCCACCTTGGCCT
 CCCAAAGTGCTGGAATTACAGGCATGAGCAACTGCGCCAGCCGCAACTGTTAATAATGAT
 AGCATCATGACTCTTTGGCCAGTGACTGTGTCAATAGTGGTACTATTACTCTCAGAGGGG
 AATTGTTAAAATAAATTA AAAATGAAGACCAGGTCTGCAGAATTCCTGAGCAGATAGTCAAT
 TTAGTCCTCATAAGTGACCTTAAACTTACTTGAGTTAATCTGAGCTATTTCTTGTAATGCAT
 ATATTAAGAAAAACAGAACAAGCTCAACCAATCAGAAGTAGTCCACAAACTTGTATAACT
 AGAGGCTTTTTAGTGGGATAGACCAATAAAGGCAACTTTATAACTGTAACCAATCAAATATT
 TTCTTTTTATTACTTTCCATTCACTCTGTAAAAATCTGCTTCTTCGACAGAGCTGAGCCCA
 GAACCACTTCTGGTTTGCAGCTTCTCAATTCATGAATCACCGCGTGCTGAAGTAAACTTTAA
 AATTTTATTGTGCCTCAGTTTACCTTGTACACAGAAGCAACAGAGTCATCAGAGGAGATGT
 TTTAGATATTTTAACTTATTCATGTTTTCTTTTTGTAAACTCGAAAGAGAGGATAAATGTAAG
 AGCCCAAAAACATAAAAACCAACTTTAATATATGGATTTTGTTTAGAAGTTGAAAAATTGTA
 AAAAGAAATCATGAGACAATAAGAAAAATGTAAATAATGACTGGATATTTAATAATATTA
 GGAATTTTAAAAATGTTTTAAGTAATTTAGCCCCAGGTGTCTTCATGAGAATTTAAACCG
 TGGTCATGCTTTTTCAAAAAGGAGGAAAAAGGGTTTAAATTCAGGAACACACAGAGAAAA
 AAGAGACAATGAATTAGCTTTGCTAGCCAGTGGCTTAAACATTCTCCACGTAGCTGCTGGGC
 TGATGGGTGGGGTGGGACCACTTCCAACCTTGTCTCTTGGACAAAGTCTATACTTCTCAGCC
 GGATATTCAAGGCTTTCCACATCTAGGTATAACAAGCGTTCTCCTATCCTTTTTCTATCAGG
 AATAGGTGCTTAATAGTAACATCAAGGCCAGGCACAGTGGCTCACGCCTGCAATCCCCGTAC
 TTTGGGAGGAGGAGGCTGGGGGATGCTTGAGGCGAGGAGTTCGAGACCAGCTTGAGAA
 ATATGGTGAAACCCCTTCTCTGCAAAAAAATATAAAAATTAGCCAGGCGTGGTCACCTGCG
 CCCGTGGTCCCAGCTATTCAGGAGGCTGAGGTGGGAGGATCGCTTGAGCCCGGAGGCGGA
 GGTTGCAGTGAGCCGAGATCGCGCCACTGCACCCAGCTTGGGCGACAGAGCGACTCTTGCC
 TAAATAAATAAATAAATAATTTTTAAAGTACAACAAGACACATTGAGGCTATAGTGCCAA
 AGAGCTCTAGTGATGAACCCTTGTGAGGGGGCCGTGTCTGCGGGAGGCCGAAGGATCCCCG
 GTGACATGCTTTCTTTGGGTGCGAGGCAGCGTCTCGGCAGAAAGAATATTGCGAGTATTACT
 GAGGGTACATGAAGGAGAGAAGCCCCCTTTGGTTCGCGCTTGACTAAGCCCTTGTTCAG
 GTGAACCTTGACAGTGTGATCTTGAGTAAGGTGAGTCTCCTCTCTCACCTCAGTGGCCGAAAC
 CTCAGGAGGTGGCAGAGGTTTTCTAATGACTCTCCAGCTCTGACATCCTCTGACTTCACTCT
 GGGAGAACGTGGGCTGGTGGACTCCTGGCAGAAGCCGACACACAGTTGGGCCATAACAAAG
 AGCCCTGGTACGGGGCACGTTCCCCGCCCCGGGAGGTTTTGGAAACACTGTGAGGCAGGGG
 GCGGGGCTTGAGCGGGCCGAGCCAATGACCAAAGGGCCGGGCGCTGGGGCGGGGCCT
 CGCGCAGCGGCGCGGTAGCGGCGGCAGCGGCTGCGGCCAAGCTGGGTCCGAGCATCCC
 CGGCTCTGGAGCCGCCCCGCCCCGACATGCGACCGACCGTCCGGGCCTCTCTGCGAGGTGCG
 CTGCTCCTTCTGCT

Apêndice 2

Utilizamos duas estratégias iniciais, uma com vetor pGL4-Luc e pCR® 2.1-TOPO, porém como tivemos sucesso com a ligação direta no vetor da luciferase, esta estratégia com o vetor pCR® 2.1-TOPO foi interrompida na etapa de sequenciamento.

Clonagem dos produtos de PCR

Com as amostras amplificadas, os produtos de interesse foram ligados ao vetor pCR® 2.1-TOPO e analisados em gel de agarose (1%). As clonagens com o vetor contendo à região 3 do promotor não geraram fragmentos que correspondiam ao tamanho esperado, 1126pb, como podemos visualizar os poços 2 e 3 (figura 1A), e os poços 3 a 13 (figura 1B). Porém, as regiões 4 e 5 (figura 1A) do promotor geraram fragmentos que continham os tamanhos esperados (758pb e 339pb, respectivamente).

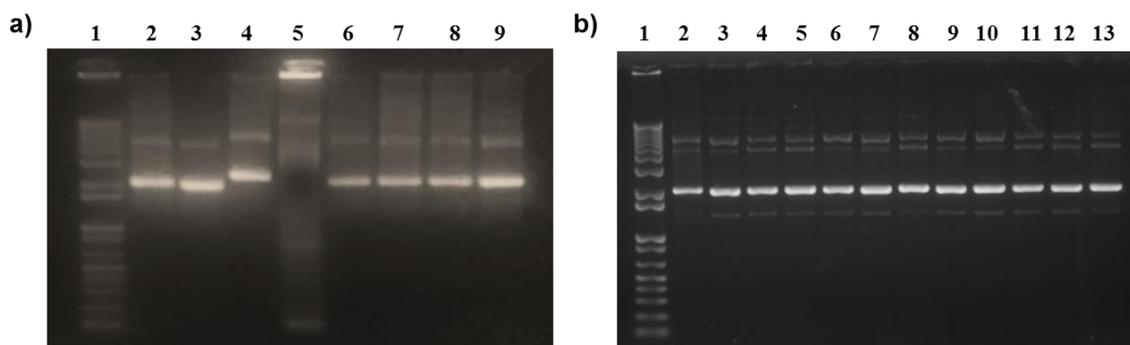


Figura 1. Análise da clonagem nos produtos de PCR dos fragmentos do promotor de RECK. A clonagem foi realizada utilizando vetor pCR® 2.1-TOPO e a análise foi realizada em gel de agarose. A) Regiões 3, 4 e 5 correspondentes aos fragmentos de 1126pb, 758 pb e 339pb, respectivamente; Poço 1- Marcador de massa molecular 1Kb; poço 2 e 3 – pCR® 2.1-TOPO contendo o fragmento de 1126pb; poço 4 - pCR® 2.1-TOPO contendo o fragmento de 758pb; poço 5 – marcador de massa molecular 100pb; poço 6 a 9 - pCR® 2.1-TOPO contendo o fragmento de 339pb. B) Região 3 corresponde ao fragmento 1126pb. Poço 1 – Marcador de massa molecular 1Kb; poço 2 – produto da miniprep do plasmídeo pCR® 2.1-TOPO vazio; poço 3 a 13 - pCR® 2.1-TOPO contendo o fragmento de 1126pb.

Os produtos da clonagem dos fragmentos no vetor TOPO foram crescidos em meio líquido LB com ampicilina para seleção e, posteriormente, a extração dos plasmídeos foi realizada utilizando o kit de mini preparação GenElut™ (Sigma-Aldrich), conforme instruções do fabricante. Em seguida, os plasmídeos foram digeridos utilizando as enzimas de restrição *Acc65I* e *BgIII*, durante 4h30. As digestões dos clones

referentes às regiões 4 (758pb) e 5 (339pb) geraram fragmentos que correspondiam aos tamanhos esperados (figura 2), todavia, ao analisarmos um total de 13 clones referentes à região 3 (1126pb), não obtivemos sucesso.

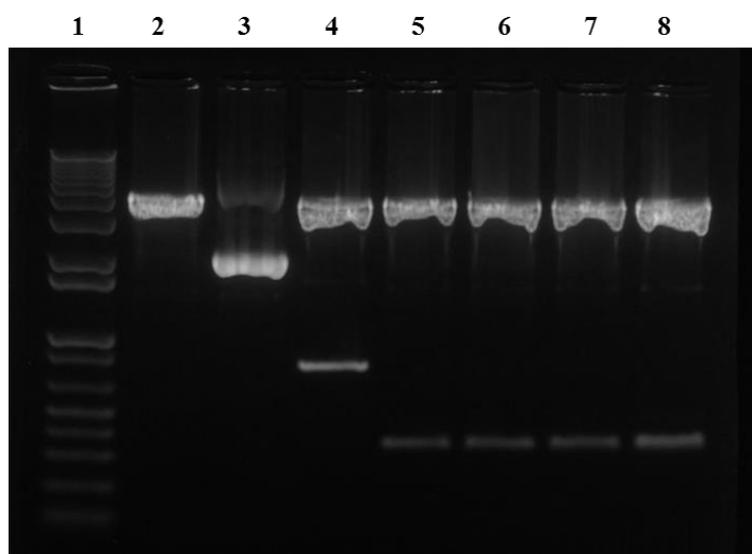


Figura 2. Análise do produto da digestão do plasmídeo e fragmentos do promotor de RECK. As digestões duplas dos clones pCR[®] 2.1-TOPO contendo os fragmentos contendo às regiões 3 (1126pb), 4 (758pb) e 5 (339pb) foram realizadas com as enzimas *Acc65I* e *BglII* mantidas a 37 °C, 4h30. Poço 1- Marcador de massa molecular 1Kb; poço 2 e 3 – pCR[®] 2.1-TOPO contendo o fragmento de 1126pb; poço 4 - pCR[®] 2.1-TOPO contendo o fragmento de 758pb; poço 5 a 8 - pCR[®] 2.1-TOPO contendo o fragmento de 339pb.

Reação de sequenciamento

A partir dos resultados descritos na seção anterior, sequenciamos os clones correspondentes às regiões 4 e 5 para confirmar se estavam com 100% de identidade quando comparadas com a sequência do cromossomo 9 humano, onde fica localizado nosso gene.

Para analisarmos o produto da etapa de sequenciamento utilizamos como ferramenta a plataforma BLAST. Através dessa plataforma foi confirmada a identidade com a região de interesse do gene *RECK* humano, tanto para o fragmento de 758pb (figura 11) quanto para o fragmento de 339pb (figura 12).

BioEdit Sequence Alignment Editor - (F:\Andressa lab\Análise sequenciamento Agosto 2018\Primers m13 topo 339pb todos.txt)

File Edit Sequence Alignment View Accessory Application RNA World Wide Web Options Window Help

9 total sequences

Mode: Select / Slide Selection: null Position: Sequence Mask: None Numbering Mask: None Start ruler at: 1

339pb FOW (12) TCTCAGGTGAACCTGCAGTGTGATCTTGGTAAAGTTCAGTCTCTCTCTCCTCAGTGGCCGAAACCTCAGGAGGTGGCAGAGGTTTCTAATGACTCTCCAGCTCTGACATCCTCTGACTTCACCTCTGGGA
 339pb REV (13) TCTCAGGTGAACCTGCAGTGTGATCTTGGTAAAGTTCAGTCTCTCTCTCCTCAGTGGCCGAAACCTCAGGAGGTGGCAGAGGTTTCTAATGACTCTCCAGCTCTGACATCCTCTGACTTCACCTCTGGGA
 339pb FOW (14) TCTCAGGTGAACCTGCAGTGTGATCTTGGTAAAGTTCAGTCTCTCTCTCCTCAGTGGCCGAAACCTCAGGAGGTGGCAGAGGTTTCTAATGACTCTCCAGCTCTGACATCCTCTGACTTCACCTCTGGGA
 339pb REV (15) TCTCAGGTGAACCTGCAGTGTGATCTTGGTAAAGTTCAGTCTCTCTCTCCTCAGTGGCCGAAACCTCAGGAGGTGGCAGAGGTTTCTAATGACTCTCCAGCTCTGACATCCTCTGACTTCACCTCTGGGA
 339pb FOW (16) TCTCAGGTGAACCTGCAGTGTGATCTTGGTAAAGTTCAGTCTCTCTCTCCTCAGTGGCCGAAACCTCAGGAGGTGGCAGAGGTTTCTAATGACTCTCCAGCTCTGACATCCTCTGACTTCACCTCTGGGA
 339pb REV (17) TCTCAGGTGAACCTGCAGTGTGATCTTGGTAAAGTTCAGTCTCTCTCTCCTCAGTGGCCGAAACCTCAGGAGGTGGCAGAGGTTTCTAATGACTCTCCAGCTCTGACATCCTCTGACTTCACCTCTGGGA
 339pb FOW (18) TCTCAGGTGAACCTGCAGTGTGATCTTGGTAAAGTTCAGTCTCTCTCTCCTCAGTGGCCGAAACCTCAGGAGGTGGCAGAGGTTTCTAATGACTCTCCAGCTCTGACATCCTCTGACTTCACCTCTGGGA
 339pb REV (19) TCTCAGGTGAACCTGCAGTGTGATCTTGGTAAAGTTCAGTCTCTCTCTCCTCAGTGGCCGAAACCTCAGGAGGTGGCAGAGGTTTCTAATGACTCTCCAGCTCTGACATCCTCTGACTTCACCTCTGGGA
 Consensus TCTCAGGTGAACCTGCAGTGTGATCTTGGTAAAGTTCAGTCTCTCTCTCCTCAGTGGCCGAAACCTCAGGAGGTGGCAGAGGTTTCTAATGACTCTCCAGCTCTGACATCCTCTGACTTCACCTCTGGGA

Graphic Summary: Distribution of the top 2 Blast Hits on 2 subject sequences. Color key for alignment scores: 0-100 (red), 100-200 (orange), 200-300 (yellow), 300-400 (green), 400-500 (blue).

Download - GenBank Graphics: Human DNA sequence from clone RP11-113A10 on chromosome 9, complete sequence. Range: 61229 to 61714. Score: 623 bits (3377). Expect: 1e-376. Identities: 338/339(99%). Gaps: 0/339(0%). Strand: Plus/Plus.

Query	Subject	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
Query 1	44343	623	1e-376	338/339(99%)	0/339(0%)	Plus/Plus
Query 63	41376	623	1e-376	338/339(99%)	0/339(0%)	Plus/Plus
Query 121	41376	623	1e-376	338/339(99%)	0/339(0%)	Plus/Plus
Query 181	41376	623	1e-376	338/339(99%)	0/339(0%)	Plus/Plus
Query 243	41376	623	1e-376	338/339(99%)	0/339(0%)	Plus/Plus
Query 303	41376	623	1e-376	338/339(99%)	0/339(0%)	Plus/Plus
Query 41474	41376	623	1e-376	338/339(99%)	0/339(0%)	Plus/Plus

Range 1: 11 to 740 [Graphics](#)

Next Match Previo

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1312 bits(710)	0.0	727/734(99%)	6/734(0%)	Plus/Plus
Query 27	GCTTGAGAAATATGGTGAACCCCTTCTCTGCAAAAAAAAAATAAAAAATTAGCCAGGCGT	86		
Sbjct 11	GCTTGAG--ATATGGTGAACCCCTTCTCTGCAAAAAAAAAATAAAAAATTAGCCAGGCGT	67		
Query 87	GGTCACTGCGCCCGTGGTCCAGCTATTAGGAGGCTGAGGTGGGAGGATCGCTTGAGC	146		
Sbjct 68	GGTCACTGCGCCCGTGGTCCAGCTATTAGGAGGCTGAGGTGGGAGGATCGCTTGAGC	127		
Query 147	CCGGGAGGCGGAGGTTGCAGTGAAGCCAGATCGGCCACTGCACCCAGCTTGGGCGACA	206		
Sbjct 128	CCGGGAGGCGGAGGTTGCAGTGAAGCCAGATCGGCCACTGCACCCAGCTTGGGCGACA	187		
Query 207	GAGCGACTCTGCCTAAATAAATAAATAAATAAATTTTAAAGTACAACAAAGACACATTG	266		
Sbjct 188	GAGCGACTCTGCCTAAATAAATAAATAAATAAATTTTAAAGTACATCAAAGACACATTG	247		
Query 267	AGGCTATA-GTGCCAAAGAGCTCTAGTGAACCCCTGTGAGGGGGCGTGTCTGCGGG	325		
Sbjct 248	AGGCTATATGTCCAAAGAGCTCTAGTGAACCCCTGTGAGGGGGCGTGTCTGCGGG	307		
Query 326	AGGCCGAAGGATCCGGGTGACATGCTTTCTTTGGGTGCGAGGCAGCGCTCTGGCAGAAA	385		
Sbjct 308	AGGCCGAAGGATCCGGGTGACATGCTTTCTTTGGGTGCGAGGCAGCGCTCTGGCAGAAA	367		
Query 386	GAATATTGCGAGTATTACTGAGGGTACATGAAGGAGAGAAGCCCCCTTGGTTCGGCCTTG	445		
Sbjct 368	GAATATTGCGAGTATTACTGAGGGTACATGAAGGAGAGAAGCCCCCTTGGTTCGGCCTTG	427		
Query 446	GACTAAGCCCTTGTCTCAGGTGAACCTTGCAGTGTGATCTTGAAGGTGAGTCTCCTC	505		
Sbjct 428	GACTAAGCCCTTGTCTCAGGTGAACCTTGCAGTGTGATCTTGAAGGTGAGTCTCCTC	487		
Query 506	TCTCACCTCAGTGGCCGAAACCTCAGGAGGTGGCAGAGGTTTCTAATGACTCTCCAG	565		
Sbjct 488	TCTCACCTCAGTGGCCGAAACCTCAGGAGGTGGCAGAGGTTTCTAATGACTCTCCAG	547		
Query 566	CTCTGACATCCTCTGACTTCACTCTGGGAGAACGTGGGCTGGTGGACTCTGGCAGAAGC	625		
Sbjct 548	CTCTGACATCCTCTGACTTCACTCTGGGAGAACGTGGGCTGGTGGACTCTGGCAGAAGC	607		
Query 626	CGACACACAGTTGGGCCATAACAAAGAGCCCTGGTACGGGGCACGTTCCCGCCCCGGGA	685		
Sbjct 608	CGACACACAGTTGGGCCATAACAAAGAGCCCTGGTACGGGGCACGTTCCCGCCCCGGGA	667		
Query 686	GGTTTTGAAACACTGTGAGGCAGGGGGCGGGGCTTGAAGCGGGCCGACCCAGTCACC-A	744		
Sbjct 668	GGTTTTGAAACACTGTGAGGCA-GGGGCGGGGCTTGAAGCGGGCCGACCCAGTCACC-A	726		
Query 745	AAGGGCCGGGCGCT	758		
Sbjct 727	AAGGGCCGGGCGCT	740		

Figura 3. Alinhamento confirmando a identidade dos fragmentos do promotor de RECK.

Alinhamento do resultado do produto de clonagem referente ao vetor Topo contendo os fragmentos de 758pb e de 339pb. Os resultados foram obtidos por meio da plataforma Blast e pelo BioEdit.

Apêndice 3**Potenciais fatores de transcrição do promotor de RECK**

Fator de transcrição	Posição Inicial	Posição Final	Dissimilaridade	Sequência
Adf-1	311	318	2	GCAGCCAG
AIRE	12	21	10	TTGGTTCGGC
ALF1B	212	219	8	ACAGTTGG
Alfin1	179	185	10	GTGGGCT
Alfin1	116	122	8	GTGGCAG
Alfin1	96	102	9	GTGGCCC
Alfin1	187	193	10	GTGGACT
AP-1	134	141	7	TGACTCTC
AP-1	134	141	9	TGACTCTC
AP-3	28	34	5	CTAAGCC
AP-3	269	277	3	TTTGAAAC
AR	37	44	0	TGTTCTCA
AR	36	42	0	TTGTTCT
AR	174	180	3	AGAACGT
AREB6	43	50	0	CAGGTGAA
ARP-1	69	77	5	GTAAGGTCA
AT-BP1	315	324	10	CCAGTCACCA
AT-BP2	315	324	10	CCAGTCACCA
ATF3	159	166	4	TGACTTCA
ATF3	70	77	9	TAAGGTCA
ATF3	149	156	9	TGACATCC
ATF3	134	141	10	TGACTCTC
BTEB3	79	87	9	TCTCCTCTC
BTEB4	290	298	0	GGGGCGGGG
BTEB4	252	260	1	TCCCGCCCC
BTEB4	2	10	10	AGAAGCCCC

BTEB4	295	303	10	GGGGCTTGA
C/EBPbeta	52	58	4	TTGCAGT
CAC-binding protein	115	122	5	GGTGGCAG
CAC-binding protein	186	193	5	GGTGGACT
CAR:RXR-alpha	47	56	2	TGAACTTGCA
CBF1	199	213	10	CAGAAGCCGACACAC
c-Ets-1	270	276	8	TTGGAAA
c-Ets-1	250	256	10	GTTCCCG
c-Fos	134	141	3	TGACTCTC
c-Fos	314	321	5	GCCAGTCA
c-Fos	159	166	8	TGACTTCA
c-Fos	133	140	4	ATGACTCT
c-Fos	158	165	7	CTGACTTC
c-Fos	159	165	4	TGACTTC
c-Fos	134	140	5	TGACTCT
c-Fos	149	155	6	TGACATC
c-Fos	71	77	8	AAGGTCA
c-Fos	315	321	9	CCAGTCA
c-Jun	134	140	3	TGACTCT
c-Jun	159	165	4	TGACTTC
c-Jun	149	155	5	TGACATC
c-Jun	71	77	6	AAGGTCA
c-Jun	315	321	9	CCAGTCA
c-Jun	134	140	4	TGACTCT
c-Jun	159	165	5	TGACTTC
c-Jun	149	155	7	TGACATC
c-Jun	71	77	8	AAGGTCA
c-Jun	315	321	8	CCAGTCA
c-Myb	48	55	5	GAAGTTGC
c-Myb	211	218	6	CACAGTTG
c-Myb	213	221	3	CAGTTGGGC
c-Myc	42	48	4	TCAGGTG
COE1	259	265	3	CCCGGGA
COE1	168	174	3	TCTGGGA
COE1	140	146	7	TCCCAGC
COE1	252	258	8	TCCCGCC
COUP-TF1	69	77	0	GTAAGGTCA
CP2	236	243	7	CTGGTACG
CREMalpha	70	81	10	TAAGGTCAGTCT
CREMtau	183	189	0	GCTGGTG
CREMtau	309	315	2	CCGCAGC
CREMtau	140	146	10	TCCCAGC

CREMtau1	183	189	0	GCTGGTG
CREMtau1	309	315	2	CCGCAGC
CREMtau1	140	146	10	TCCAGC
CREMtau2	183	189	0	GCTGGTG
CREMtau2	309	315	2	CCGCAGC
CREMtau2	140	146	10	TCCAGC
DEAF-1	96	104	8	GTGGCCCGA
DEF:GLO	268	275	9	TTTTGGAA
DEF:GLO	126	133	1	TTTTCTAA
DEF:GLO:SQUA	7	13	3	CCCCTTT
Dl	122	130	5	GAGGTTTTTC
DP-1	249	258	7	CGTTCCCGCC
DRF1,1	249	258	8	CGTTCCCGCC
DRF1,3	249	258	8	CGTTCCCGCC
E12	141	149	2	CCCAGCTCT
E12	180	188	3	TGGGCTGGT
E2F	250	257	0	GTTCCCGC
E2F-1	289	297	6	GGGGGCGGG
E2F1	248	260	9	ACGTTCCCGCCCC
E2F-1	252	258	0	TCCCGCC
E2F-1	292	298	3	GGCGGGG
E2F-1	303	309	8	AGCGGGC
E2F-1	307	313	10	GGCCGCA
E2F-1	300	308	4	TTGAGCGGG
E2F-1	253	261	6	CCCGCCCCC
E2F-1:DP-1	251	259	4	TTCCCGCCC
E47	167	173	3	CTCTGGG
E47	314	320	4	GCCAGTC
E47	182	188	5	GGCTGGT
E47	141	147	5	CCCAGCT
E47	193	199	5	TCCTGGC
E47	234	240	7	CCCTGGT
E47	42	51	6	TCAGGTGAAC
Egr-1	250	262	5	GTTCCCGCCCCCG
EIIaE-A	31	37	9	AGCCCTT
EIIaE-A	255	261	9	CGCCCCC
EIIaE-A	289	295	9	GGGGGCG
EIIaE-A	232	238	10	AGCCCTG
EIIaE-A	260	266	10	CCGGGAG
EIIaE-A	287	293	10	CAGGGGG
Elf-1	262	271	8	GGGAGGTTTT
Elf-1	120	129	10	CAGAGGTTTT
ENKTF-1	117	124	7	TGGCAGAG

ENKTF-1	310	317	8	CGCAGCCA
ER-alpha	71	78	1	AAGGTCAG
ER-alpha	68	77	5	AGTAAGGTCA
ER-beta	69	77	4	GTAAGGTCA
ERR1	71	81	2	AAGGTCAGTCT
ETF	290	298	0	GGGGCGGGG
ETF	252	260	1	TCCCGCCCC
ETF	295	303	6	GGGGCTTGA
ETF	2	10	7	AGAAGCCCC
ETF	243	251	8	GGGGCACGT
FOXD3	274	281	4	AAACACTG
FOXM1	130	140	10	CTAATGACTCT
FOXO3a	66	73	7	TGAGTAAG
GA-BF	36	42	2	TTGTTCT
GA-BF	75	81	4	TCAGTCT
GA-BF	134	140	8	TGACTCT
GA-BF	164	170	8	TCACTCT
GCF	301	311	6	TGAGCGGGCCG
GCF	290	300	10	GGGGCGGGGCT
GR	37	43	0	TGTTCTC
GR-alpha	36	43	2	TTGTTCTC
GR-alpha	222	229	10	CATAACAA
GR-beta	37	44	1	TGTTCTCA
HBP-1a	244	251	1	GGGCACGT
HBP-1a	177	184	5	ACGTGGGC
HBP-1a	248	255	9	ACGTTCCC
HBP-1a	244	251	1	GGGCACGT
HBP-1a	177	184	5	ACGTGGGC
HBP-1a	248	255	9	ACGTTCCC
HES-1	175	181	9	GAACGTG
HES-1	247	253	9	CACGTTC
HIF-1	243	251	2	GGGGCACGT
Hlf	65	73	7	TTGAGTAAG
HMG I	272	278	6	GGAAACA
HMG I	248	254	8	ACGTTCC
HNF-1B	131	138	4	TAATGACT
HNF-1C	130	138	7	CTAATGACT
HNF-3	226	234	7	ACAAAGAGC
HNF-3alpha	272	279	5	GGAAACAC
HNF-3beta	271	278	3	TGGAAACA
HNF-3beta	222	228	7	CATAACA
HNF-3beta	272	278	5	GGAAACA
HNF-3beta	37	43	9	TGTTCTC

HOXD8	223	229	9	ATAACAA
HOXD8	223	229	9	ATAACAA
HTF	173	181	9	GAGAACGTG
HTF	247	255	9	CACGTTCCC
IA-1	284	296	4	AGGCAGGGGGCGG
IPF1	131	138	2	TAATGACT
IRF-1	268	276	8	TTTTGGAAA
IRF-3	272	278	2	GGAAACA
Isl-1	126	134	6	TTTTCTAAT
JunD	159	165	2	TGACTTC
JunD	149	155	2	TGACATC
JunD	134	140	7	TGACTCT
JunD	71	77	7	AAGGTCA
JunD	315	321	9	CCAGTCA
LEF-1	5	16	10	AGCCCCTTTGGT
LEF-1	224	231	1	TAACAAAG
LEF-1	10	17	2	CTTTGGTT
LEF-1	320	327	2	CACCAAAG
LF-A1	242	248	1	CGGGGCA
LF-A1	282	288	6	TGAGGCA
LF-A1	194	200	9	CCTGGCA
LF-A1	115	121	10	GGTGGCA
Lmo2	42	49	2	TCAGGTGA
LyF-1	167	175	4	CTCTGGGAG
LyF-1	139	147	6	CTCCCAGCT
mat1-Mc	225	237	1	AACAAAGAGCCCT
MCB1	151	159	7	ACATCCTCT
MCB2	151	159	7	ACATCCTCT
Myf-3	42	49	1	TCAGGTGA
Myf-3	212	219	1	ACAGTTGG
MyoD	42	49	1	TCAGGTGA
MyoD	212	219	1	ACAGTTGG
MyoD	42	49	1	TCAGGTGA
MyoD	212	219	2	ACAGTTGG
myogenin	143	149	5	CAGCTCT
myogenin	180	186	9	TGGGCTG
myogenin	312	318	10	CAGCCAG
NF-1	12	19	7	TTGGTTCG
NF-1	23	30	3	TTGGACTA
NF-1	270	277	6	TTGGAAAC
NF-1 (-like proteins)	312	319	1	CAGCCAGT
NF-1 (-like proteins)	179	186	0	GTGGGCTG
NF-AT1	272	280	3	GGAAACACT

NF-AT1	272	278	1	GGAAACA
NF-AT1	272	279	2	GGAAACAC
NF-AT2	272	280	3	GGAAACACT
NF-E4	110	119	4	CAGGAGGTGG
NF-E4	287	296	9	CAGGGGGCGG
NFI/CTF	8	15	5	CCCTTTGG
NFI/CTF	212	219	9	ACAGTTGG
NFI/CTF	19	26	9	GGCCTTGG
NF-X3	199	206	4	CAGAAGCC
NHP-1	71	77	1	AAGGTCA
NHP-1	149	155	5	TGACATC
NHP-1	159	165	10	TGACTTC
Nkx2-1	110	116	1	CAGGAGG
Nkx2-1	261	267	1	CGGGAGG
Nkx2-1	107	113	3	CCTCAGG
Nkx2-1	82	88	5	CCTCTCT
Nkx2-1	91	97	5	CCTCAGT
Nkx2-1	155	161	5	CCTCTGA
Nkx2-1	280	286	5	TGTGAGG
Nkx2-1	119	125	6	GCAGAGG
Nrf2:MafK	109	115	3	TCAGGAG
Nrf2:MafK	198	204	9	GCAGAAG
Opaque-2	176	184	5	AACGTGGGC
Opaque-2	244	252	8	GGGCACGTT
p53	218	224	10	GGGCCAT
p53	244	250	2	GGGCACG
p53	296	302	3	GGGCTTG
p53	181	187	4	GGGCTGG
p53	253	259	4	CCCGCCC
p53	291	297	4	GGGCGGG
p53	29	35	7	TAAGCCC
p53	3	9	8	GAAGCCC
p53	306	312	9	GGGCCGC
p53	96	102	9	GTGGCCC
Pax-2	74	80	3	GTCAGTC
Pax-2	146	152	4	CTCTGAC
Pax-2	156	162	4	CTCTGAC
Pax-2	131	137	4	TAATGAC
Pax-2	318	324	5	GTCACCA
Pax-2a	278	284	6	ACTGTGA
Pax-2a	54	60	8	GCAGTGT
Pax-2a	93	99	8	TCAGTGG
Pax-2a	276	282	8	ACACTGT

Pax-2a	210	216	10	ACACAGT
Pax-5	300	306	4	TTGAGCG
Pax-6	163	173	10	TTCACCTCTGGG
PBF	34	41	7	CCTTGTTTC
Pbx1b	84	93	10	TCTCTCACCT
PEA3	149	156	0	TGACATCC
PEBP2alphaA1	305	314	7	CGGGCCGCAG
PPAR-alpha	71	77	1	AAGGTCA
PR A	274	280	4	AAACACT
PR A	35	41	6	CTTGTTTC
PR A	224	230	10	TAACAAA
PR B	274	280	4	AAACACT
PR B	35	41	6	CTTGTTTC
PR B	224	230	10	TAACAAA
PR B	37	43	0	TGTTCTC
PR-alpha	34	42	2	CCTTGTTCT
PR-beta	34	42	2	CCTTGTTCT
PXR-1:RXR-alpha	46	56	3	GTGAACCTGCA
RAR-alpha1	69	78	1	GTAAGGTCAG
RAR-beta	70	77	1	TAAGGTCA
RAR-gamma	45	52	1	GGTGAAC
RAR-gamma	85	92	2	CTCTCACC
RAR-gamma	316	323	5	CAGTCACC
RITA-1	176	183	6	AACGTGGG
RITA-1	245	252	10	GGCACGTT
RORalpha1	68	77	4	AGTAAGGTCA
RXR-alpha	69	77	1	GTAAGGTCA
RXR-beta	72	81	7	AGGTCAGTCT
SF-1	68	78	10	AGTAAGGTCAG
SF-1	68	77	5	AGTAAGGTCA
Sox2	224	230	2	TAACAAA
Sox2	35	41	5	CTTGTTTC
Sp1	290	299	0	GGGGCGGGGC
Sp1	251	260	2	TTCCCGCCCC
Sp1	290	299	0	GGGGCGGGGC
Sp1	251	260	1	TTCCCGCCCC
Sp1	290	298	0	GGGGCGGGG
Sp1	252	260	1	TCCCGCCCC
Sp1	253	261	0	CCCGCCCC
Sp1	289	297	0	GGGGCGGGG
Sp1	289	299	3	GGGGCGGGGC
Sp1	251	261	9	TTCCCGCCCC
Sp3	290	298	0	GGGGCGGGG

Sp3	252	260	1	TCCCGCCCC
Sp3	243	251	6	GGGGCACGT
Sp3	295	303	7	GGGGCTTGA
Sp3	287	297	10	CAGGGGGCGGG
Sp3	251	263	7	TTCCCGCCCCCGG
SRY	224	230	0	TAACAAA
SRY	35	41	2	CTTGTC
SXR:RXR-alpha	45	53	1	GGTGAACTT
SXR:RXR-alpha	186	194	10	GGTGGACTC
T3R-alpha	69	77	3	GTAAGGTCA
T3R-alpha	69	77	2	GTAAGGTCA
T3R-beta1	68	77	5	AGTAAGGTCA
T3R-beta2	70	78	3	TAAGGTCA
TAF-1	173	182	6	GAGAACGTGG
T-Ag	283	291	6	GAGGCAGGG
Tal-1	213	223	10	CAGTTGGGCCA
Tal-1	43	51	3	CAGGTGAAC
Tal-1	213	223	10	CAGTTGGGCCA
TCF-1	226	235	10	ACAAAGAGCC
TCF-1A	223	231	1	ATAACAAAG
TCF-1A	10	18	7	CTTTGGTTC
TCF-1A	319	327	7	TCACCAAAG
TCF-4E	10	16	6	CTTTGGT
TCF-4E	225	231	6	AACAAAG
TCF-4E	321	327	6	ACCAAAG
TFIIB	39	46	4	TTCTCAGG
TFIIB	106	113	8	ACCTCAGG
TFIIB	168	175	8	TCTGGGAG
TGGCA-binding protein	270	276	0	TTGGAAA
TGGCA-binding protein	23	29	3	TTGGACT
TGGCA-binding protein	319	325	6	TCACCAA
TGGCA-binding protein	216	222	7	TTGGGCC
TGGCA-binding protein	12	18	9	TTGGTTC
TGIF	149	156	2	TGACATCC
USF	43	51	10	CAGGTGAAC
USF-1	113	119	5	GAGGTGG
USF-1	176	182	6	AACGTGG
USF-1	184	190	6	CTGGTGG
USF-1	93	99	10	TCAGTGG

USF2b	155	162	7	CCTCTGAC
USF2b	130	137	8	CTAATGAC
Vpr	113	120	8	GAGGTGGC
WT1 I	207	213	4	GACACAC
WT1 I	85	91	5	CTCTCAC
WT1 I	57	63	7	GTGTGAT
WT1 I	179	185	7	GTGGGCT
WT1 I	281	287	7	GTGAGGC
WT1 I -KTS	254	263	10	CCGCCCCCGG
WT1 -KTS	254	263	10	CCGCCCCCGG
XPF-1	283	291	1	GAGGCAGGG
Xvent-1	227	234	3	CAAAGAGC
Xvent-1	7	14	6	CCCCTTTG
Yi	288	297	6	AGGGGGCGGG
YY1	221	227	9	CCATAAC
YY1	221	227	6	CCATAAC
YY1	145	153	7	GCTCTGACA
Zeste	165	171	5	CACTCTG
Zeste	165	171	5	CACTCTG

Apêndice 4

Clinics (Sao Paulo), 2018 Oct 11;73(suppl 1):e558s. doi: 10.6061/clinics/2018/e558s.

Human polyomaviruses and cancer: an overview.

Prado JCM¹, Monezi TA¹, Amorim AT¹, Lino V¹, Paladino A¹, Boccardo E¹.

Author information

¹ Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciencias Biomedicas, Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo, SP, BR.

Abstract

The name of the family Polyomaviridae, derives from the early observation that cells infected with murine polyomavirus induced multiple (poly) tumors (omas) in immunocompromised mice. Subsequent studies showed that many members of this family exhibit the capacity of mediating cell transformation and tumorigenesis in different experimental models. The transformation process mediated by these viruses is driven by viral pleiotropic regulatory proteins called T (tumor) antigens. Similar to other viral oncoproteins T antigens target cellular regulatory factors to favor cell proliferation, immune evasion and downregulation of apoptosis. The first two human polyomaviruses were isolated over 45 years ago. However, recent advances in the DNA sequencing technologies led to the rapid identification of additional twelve new polyomaviruses in different human samples. Many of these viruses establish chronic infections and have been associated with conditions in immunosuppressed individuals, particularly in organ transplant recipients. This has been associated to viral reactivation due to the immunosuppressant therapy applied to these patients. Four polyomaviruses namely, Merkel cell polyomavirus (MCPyV), Trichodysplasia spinulosa polyomavirus (TSPyV), John Cunningham Polyomavirus (JCPyV) and BK polyomavirus (BKPyV) have been associated with the development of specific malignant tumors. However, present evidence only supports the role of MCPyV as a carcinogen to humans. In the present review we present a summarized discussion on the current knowledge concerning the role of MCPyV, TSPyV, JCPyV and BKPyV in human cancers.

PMID: 30328951 PMCID: [PMC6157077](#) DOI: [10.6061/clinics/2018/e558s](#)

Clinics (Sao Paulo), 2018 Sep 6;73(suppl 1):e551s. doi: 10.6061/clinics/2018/e551s.

Alterations in the expression and activity of extracellular matrix components in HPV-associated infections and diseases.

Herbster S¹, Paladino A¹, de Freitas S¹, Boccardo E¹.

Author information

¹ Laboratory of Oncovirology, Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

Abstract

Infection with human papillomaviruses is associated with a series of benign and malignant hyperproliferative diseases that impose a heavy burden on human populations. A subgroup of mucosal human papillomavirus types are associated with the majority of cervical cancers and a relevant fraction of vulvar, vaginal, anal, penile and head and neck carcinomas. Human papillomaviruses mediate cell transformation by the expression of two pleiotropic oncoproteins that alter major cellular regulatory pathways. However, these viruses are not complete carcinogens, and further alterations within the infected cells and in their microenvironment are necessary for tumor establishment and progression. Alterations in components of the extracellular matrix for instance, matrix metalloproteinases and some of their regulators such as tissue inhibitors of metalloproteinases, have been consistently reported in human papillomaviruses-associated diseases. Matrix metalloproteinases function by remodeling the extracellular matrix and alterations in their expression levels and/or activity are associated with pathological processes and clinical variables including local tumor invasion, metastasis, tumor relapse and overall patient prognosis and survival. In this review we present a summarized discussion on the current data concerning the impact of human papillomavirus infection on the activity and expression of extracellular matrix components. We further comment on the possibility of targeting extracellular matrix molecules in experimental treatment protocols.

PMID: 30208169 PMCID: [PMC6113921](#) DOI: [10.6061/clinics/2018/e551s](#)