

PROGRAMA DE APRIMORAMENTO PROFISSIONAL DA SECRETARIA
DE ESTADO DA SAÚDE DE SÃO PAULO E INSTITUTO BUTANTAN

PAP - SES - IBU

Programa de Microbiologia e Parasitologia

FERNANDA BATISTA DE ANDRADE

**ALVOS CELULARES DAS ONCOPROTEÍNAS VIRAIS E6 E E7 DO
PAPILOMAVÍRUS HUMANO**

Monografia de conclusão do Programa de Aprimoramento Profissional - PAP, Modalidade Microbiologia e Parasitologia, apresentada à Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo - SES/SP, realizada no Laboratório de Genética do Instituto Butantan, sob a orientação da Profa. Dra. Aurora Marques Cianciarullo.

São Paulo
- 2010 -

PROGRAMA DE APRIMORAMENTO PROFISSIONAL DA SECRETARIA
DE ESTADO DA SAÚDE DE SÃO PAULO E INSTITUTO BUTANTAN

PAP - SES - IBU

Programa de Microbiologia e Parasitologia

MONOGRAFIA

**ALVOS CELULARES DAS ONCOPROTEÍNAS VIRAIS E6 E E7 DO
PAPILOMAVÍRUS HUMANO**

Aluna: FERNANDA BATISTA DE ANDRADE

Orientadora: Profa. Dra. Aurora Marques Cianciarullo

Pesquisadora Científica V - Laboratório de Genética – IBU

e-mail: amcianciarullo@butantan.gov.br

Colaboradores

Érica Akemi Kavati, Bióloga, Mestranda, Laboratório de Genética - IBU

Prof. Dr. Edécio Armbruster de Moraes, Médico, HC-FMUSP e

Laboratório de Genética – IBU

Profa. Dra. Nadja Cristhina de Souza Pinto, Bióloga – Laboratório de Genética

Mitocondrial - Instituto de Química - USP

São Paulo

- 2010 -

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SÃO PAULO - INSTITUTO BUTANTAN
PROGRAMA DE APRIMORAMENTO PROFISSIONAL EM
MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA

Título da Monografia: ALVOS CELULARES DAS ONCOPROTEÍNAS VIRAIS E6 E E7
DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO.

Aprimoranda: Fernanda Batista de Andrade

Assinatura:

Orientadora: Profa. Dra. Aurora Marques Cianciarullo

Assinatura:

Coordenadora do Programa: Profa. Dra. Roxane Maria Fontes Piazza

Assinatura:

Data de conclusão da Monografia: 26 de fevereiro de 2010

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Aurora Marques Cianciarullo, pela excelente orientação, tornando possível a realização desse trabalho.

À Profa. Dra. Luisa Lina Villa e ao Prof. Dr. Enrique Boccardo, do Laboratório de Virologia, Instituto Ludwig de Pesquisas em Câncer - São Paulo, pelo fornecimento das linhagens celulares utilizadas no estudo.

À Profa. Dra. Denise A. Galloway, da Division of Human Biology, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle - USA, pelo fornecimento dos vetores de expressão gênica, contendo os genes completos das oncoproteínas E6 e E7 do HPV16.

À Profa. Dra. Nadja Cristhina de Souza Pinto, do Laboratório de Genética Molecular, Instituto de Química – USP, pelo suporte no isolamento mitocondrial.

Ao Prof. Dr. Édecio Armbruster de Moraes, à Vivian Szulczewski, à Érica Akemi Kavati, à Thaís Mariana Valadão e Ana Carolina Maia Palumbo pela colaboração e dedicação.

Ao Alexander Seixas de Souza, do Laboratório de Parasitologia, Instituto Butantan, pelo suporte técnico no uso do microscópio confocal de varredura a laser.

À Simone Gonçalves Silva Jared, do Laboratório de Biologia Celular, Instituto Butantan, pelo suporte técnico no uso do microscópio eletrônico de transmissão.

À FAPESP, Instituto Butantan e Fundação Butantan pelo suporte financeiro e infraestrutura, indispensáveis ao desenvolvimento deste projeto.

À Profa. Dra. Roxane Maria Fontes Piazza, do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan e Coordenadora do Programa de Microbiologia e Parasitologia do PAP-SES-IBU, pelo apoio e estímulo recebidos.

À Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo pela Bolsa de Aprimoramento Profissional que me foi concedida.

À minha família pelo apoio e compreensão.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste estudo e para a minha formação profissional, minha gratidão.

ÍNDICE

Capa	1
Agradecimentos.....	4
Resumo	6
Abstract	7
1. Introdução.....	8
1.1 – Tipos virais e taxonomia	8
1.2 – Organização genômica	9
1.2.1 – Região precoce	10
1.2.2 – Região tardia	13
1.2.3 – Região regulatória	14
1.3 – Formas de infecção viral	16
1.4 – A infecção por papilomavírus humano (HPV)	17
1.5 – Transformação e imortalização celular	19
1.5.1 – Funções das oncoproteínas E6 e E7	20
1.6 – Apoptose versus oncogênese	25
2. Objetivos	32
3. Metodologias	33
3.1 – Cultivo celular	33
3.2 – Transfecção celular	33
3.3 – Ensaio de imunofluorescência	34
3.3.1 - Fixação das células	34
3.3.2 – Preparo das imunofluorescências	34
3.4 – Isolamento da fração mitocondrial	35
3.5 – Ensaio de imunocitoquímica ultraestrutural	36
4. Resultados e Discussão	37
4.1 – Cultivo, transfecção e imunofluorescência	37
4.2 - Isolamento da fração mitocondrial e ensaios de imunocitoquímica ultraestrutural.....	39
5. Conclusão	48
6. Referências bibliográficas	49

RESUMO

ANDRADE, FB. **Alvos celulares das oncoproteínas virais E6 e E7 do Papilomavírus humano**. 2010. 57 f. Monografia (PAP-SES-IBU) – Instituto Butantan, Secretaria de Estado da Saúde, São Paulo, 2010.

Os carcinomas cervicais expressam as oncoproteínas E6 e E7 de Papilomavírus Humano (HPV) de alto-risco, neutralizando a supressão tumoral. A oncoproteína E6 codificada pelo vírus é multifuncional, apresentando inúmeros alvos celulares; entretanto, ainda não está claro se todas essas atividades estão relacionadas à malignidade do tumor. Neste estudo avaliamos a distribuição de oncoproteínas virais E6 e E7, mitocôndrias, receptor de transferrina (TfR), transferrina (Tf), ferritina (Fe) e citocromo c, em células humanas transformadas e não-transformadas por HPV, para um padrão de endocitose de ferro em células humanas e animais, como uma via alternativa de infecção por HPV. Linhagens celulares HPV-negativas foram transfectadas com vetores pLXSN, contendo as seqüências completas dos genes E6 e E7, sendo então usadas como controle positivo. As células foram plaqueadas e aderidas em lamínulas de vidro, para os ensaios de imunofluorescência; ensaios de fracionamento celular e isolamento da fração mitocondrial realizados em células HPV-positivas e HPV-negativas, para imunocitoquímica ultraestrutural. Foram utilizados os anticorpos primários anti-ferritina, anti-transferrina, anti-E6, anti-E7 e anti-citocromo c e os respectivos anticorpos secundários. Os anticorpos reconheceram as oncoproteínas E6 e E7 expressas em células HPV-positivas e HPV-negativas transfectadas pelo pLXSN. O TfR foi detectado em abundância na membrana plasmática das células, assim como a Fe no citoplasma, núcleo e mitocôndrias e a citocromo c preferencialmente localizada nas mitocôndrias. A grande quantidade de ferro sugere sua participação na transformação de células por HPV, mantendo os níveis de citocromo c mitocondrial. A co-localização de E6 e mitocôndrias nas células transformadas por HPV apontam um envolvimento na inibição do processo de apoptose. Nossos resultados estão em concordância com os achados de que a proteína E6 degrada Bak, um fator mitocondrial apoptogênico, cuja função é induzir mudanças conformacionais formadoras de poros na membrana mitocondrial, através dos quais ocorre a liberação de citocromo c para o citoplasma, desencadeando a morte celular. Desta forma, E6 estaria protegendo os queratinócitos da apoptose, mantendo a malignidade tumoral. Os dados indicam que E6 atua como fator anti-apoptogênico e deveria ser explorado como estratégia terapêutica no desenvolvimento de vacinas contra o câncer cervical, considerando que E6 é uma oncoproteína multifuncional.

Palavras-chaves: HPV, oncoproteínas virais, E6, E7, câncer cervical, câncer anogenital, estratégia terapêutica, vacinas, pesquisas para o SUS, saúde pública.

ABSTRACT

ANDRADE, FB. **Cellular targets of E6 e E7 viral oncoproteins of the Human Papillomavirus**. 2010. 57 f. Monographie (PAP-SES-IBU) – Instituto Butantan, Secretaria de Estado da Saúde, São Paulo, 2010.

Cervical carcinomas express E6 and E7 oncoproteins from high-risk Human Papillomaviruses (HPV), neutralizing tumor suppression. The E6 oncoprotein encoded by the virus is multifunctional presenting numerous cellular targets; however, it is not clear if all these activities are related to the tumor malignancy. In this study we evaluate the distribution in HPV-transformed and non-transformed mammalian cells of: E6 and E7 oncoproteins, mitochondria, cytochrome c, transferrin receptors (TfR), transferrin (Tf) and ferritin (Fe) for the iron endocytic pathway in human and animal cells, as alternative pathway for HPV infection. HPV-negative cell lines were transfected with the pLXSN vectors, containing the complete sequence of E6 and E7 genes. Cells transformed by HPV were used as positive controls. The cells were plated over glass slides for adhesion, for immunofluorescence assays; cellular fractionation and mitochondrial fraction isolating assays were performed in HPV-positive and HPV-negative cells, for ultrastructural immunocytochemistry assays. Primary antibodies anti-ferritin, anti-transferrin, anti-E6, anti-E7 and anti-cytochrome c, and the respective secondary antibodies were applied. The antibodies recognized the E6 and E7 oncoproteins in HPV-positive cells and HPV-negative cells transfected with pLXSN vector. TfR were detected in abundance at the plasma membrane of cells, as well as the Fe was labeled in the cytoplasm, nucleus and mitochondria and the cytochrome c preferentially in the mitochondria. The great amount of iron suggests a participation of this element in the HPV cells transformation, keeping the mitochondrial cytochrome c levels. Co-localizations of E6 into mitochondria were detected in HPV-transformed cells, suggesting its involvement in the process of apoptosis inhibition. Our results are in accordance to the findings of that E6 proteins degrade Bak, an apoptogenic mitochondrial factor that undergoes a conformational change, leading to the pore formation in the mitochondrial membrane, through which release of cytochrome c occurs and prevent apoptosis in keratinocytes, maintaining the tumor malignancy. These findings point to that E6 acts as an anti-apoptogenic factor and should be exploited as prophylactic and therapeutic strategies in the development of vaccines against cervical cancer, taking into account that E6 is a multifunctional oncoprotein.

Keywords: HPV, viral oncoproteins, E6, E7, cervical cancer, anogenital cancer, therapeutic strategy, vaccine, researches for SUS, public health.

1. INTRODUÇÃO

1.1 - *Tipos Virais e Taxonomia*

A infecção por certos papilomavírus humanos (HPVs) representa o maior fator de risco para o desenvolvimento do câncer anogenital, sendo atualmente reconhecido como o principal agente etiológico desta doença sexualmente transmissível (DST) (zur Hausen, 1996, 1999, 2002, 2008, 2009). Este fato torna os parceiros sexuais altamente comprometidos com a infecção e transmissão do HPV, à semelhança do que ocorre com o HIV. Trata-se de infecção altamente prevalente, detectada em 10% a 20% da população sexualmente ativa entre 15 e 49 anos de idade, inclusive em mulheres assintomáticas (Nonnenmacher *et al.*, 2002; Dunne *et al.*, 2006).

Os Papilomavírus pertencem ao gênero *Papillomavirus*; família *Papillomaviridae*. Este nome é derivado em parte do latim, *papila*, significando mamilo ou pústula e em parte do grego: o sufixo *oma* que significa tumor, ou seja, tumor que forma mamilos ou papilas.

Os Papilomavirus são isométricos quanto à morfologia, pequenos e similares entre si à microscopia eletrônica, sendo constituídos por fita dupla de DNA, com configuração genômica circular, contendo cerca de 8 mil pares de bases.

Esses vírus possuem regiões do genoma que se expressam tardiamente, apresentam tropismo por epitélio e mucosas, sendo freqüentemente encontrados na mucosa cérvico-vaginal da mulher, onde podem permanecer por longos períodos sem causar sintomatologia ou desaparecer em função da resposta imunológica individual (Salvia, 2004), assim como podem ser oncogênicos nos seres humanos.

Os tipos anogenitais mais freqüentes de HPV (documento de Consenso – La infección por Papilomavirus) de acordo com o risco de malignidade são: alto risco: 16,18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82; potencialmente oncogênicos: 26, 53 e 66, e por último os de baixo risco: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81.

De acordo com a nova proposta do Centro de Referência para Papilomavírus, DKFZ, Heidelberg, Alemanha, o HPV16 e HPV18 pertencem ao gênero Alpha-Papillomavirus, sendo o HPV16 da espécie 9 e espécie-tipo HPV16 (K02718) e o HPV18 da espécie 7 e espécie-tipo HPV18 (X05015), designação dada somente após o isolamento e caracterização do genoma completo, como é o caso destes HPVs de alto risco (Villiers *et al.*, 2004).

1.2 – Organização genômica

Os Papilomavírus são vírus não envelopados, constituídos por uma molécula circular de DNA de dupla fita, como já dito anteriormente, contida em um invólucro protéico ou capsídeo composto por 72 subunidades denominadas capsômeros (Mello, 2005).

Por meio de microscopia eletrônica observa-se que o vírus apresenta morfologia esférica, conferida pela arquitetura do capsídeo. Segundo zur Hausen (1996), os Papilomavírus têm associadas ao genoma proteínas semelhantes a histonas.

O genoma pode ser dividido funcionalmente em 3 regiões, a região precoce (E ou Early), a região tardia (L ou Late) e região regulatória (LCR ou Long Control Region).

Ambas as regiões, precoce e tardia, estão divididas em unidades de tradução, as quais se encontram em uma mesma fita do DNA (Chen *et al.*, 1982), que segundo Howley (1991) foram reconhecidas como genes.

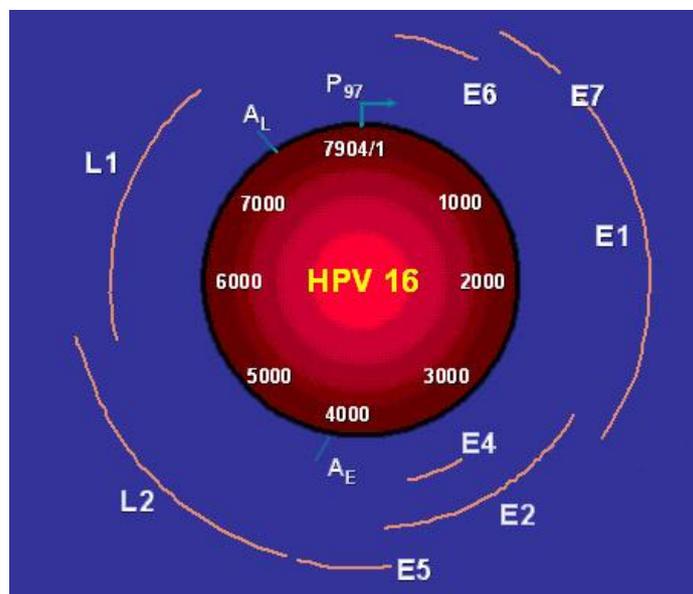


Figura 1 - Representação esquemática do genoma do HPV (zur Hausen, 2002).

1.2.1- Região precoce

A região precoce representa cerca de 50% do genoma viral e contém de seis a oito genes (*E1*, *E2*, *E3*, *E4*, *E5*, *E6*, *E7* e *E8*). Todos esses genes codificam proteínas envolvidas na replicação do DNA viral, no controle de transcrição e na transformação celular (Quadro 1).

Quadro 1 - Genes da região precoce e suas respectivas funções (Mello, 2005).

Gene	Função	Referência
<i>E1</i>	Proteína de maior importância na replicação e transcrição do DNA.	Sonnex, 1998
<i>E2</i>	Função similar a da <i>E1</i> .	Desaintes <i>et al.</i> , 1997
<i>E3</i>	Não existe função estabelecida para esse gene até o momento sendo que os Papilomavírus humanos não possuem esse gene.	Silva, 2002
<i>E4</i>	Sua participação no ciclo de vida do vírus ainda está por ser esclarecida, acreditando-se que a sua fusão com <i>E1</i> é um fator de maturação viral	zur Hausen, 1996
<i>E5</i>	Tanto em animais como em humanos apresenta uma atividade oncogênica com variável grau de eficiência.	Murray <i>et al.</i> , 2001
<i>E6</i>	Proteína que desempenha importante papel nos processos que culminam com transformação celular pela interação com a proteína p53.	zur Hausen, 1996
<i>E7</i>	Da mesma forma que <i>E6</i> , também exerce papel importante nos mecanismos de transformação celular, por interagir com a proteína supressora pRb.	zur Hausen, 1996
<i>E8</i>	Em humanos ainda não apresenta função determinada	Hu <i>et al.</i> , 2004

Dentre todas as proteínas, E1 e E2 são as de maior importância na replicação viral e transcrição do DNA (Tyring, 2000). De acordo com a IARC (1995) e zur Hausen (1996), o gene *E1* é reconhecido como o maior e mais conservado da região precoce do genoma de diferentes Papilomavírus. O produto do gene *E2* regula a transcrição e replicação dos Papilomavírus, sendo este uma fosfoproteína com três domínios funcionais: o N-terminal que contém aproximadamente 220 aminoácidos tem atuação como um fator de transcrição; o C-terminal que apresenta cerca de 90 aminoácidos e, em sua forma dimérica, pode ligar-se ao DNA e o terceiro, corresponde a uma região de ligação entre os dois primeiros domínios (Tyring, 2000).

Estudos moleculares realizados em amostras de câncer cervical revelam freqüentemente a integração do DNA de alguns HPVs no genoma celular. Tal integração cromossômica resulta na interrupção do gene *E2* e, como consequência, a proteína E2 não é expressa (Dell & Gaston, 2001). De acordo com Romanczuk & Howley (1992), as deleções no gene *E2* levam a um aumento da habilidade do HPV16 na imortalização das células. Estas observações sugerem que a perda ou inativação da proteína E2 contribui para a transformação de células humanas e sua transcrição para o fenótipo maligno (Schneider-Maunoury, *et al.*, 1987).

O gene *E3* não está presente no genoma de HPV, porém vale ressaltar que Sonnex (1998) e Silva (2002) dizem não existir função determinada para este gene.

A proteína E4 parece ser incorretamente designada como um produto de gene precoce, sendo que essa proteína é exclusivamente detectada nas camadas mais diferenciadas do epitélio e, por esse motivo, sua participação no ciclo de vida do vírus ainda está por ser determinada (zur Hausen, 1996).

A fusão das proteínas E1 e E4 ($E1^{\wedge}E4$), considerada como um fator de maturação viral, também pode ter envolvimento com a replicação viral. Em humanos, essa fusão interage com a proteína E7, promovendo a inibição da síntese do DNA celular. De acordo com Bosch *et al.* (2001) este evento permite o recrutamento de fatores da célula hospedeira para a síntese do DNA viral. O gene *E5* não é bem conservado no DNA de Papilomavírus (Burkhardt, 1989). Mcurray *et al.* (2001) descreveram que nas infecções pelo vírus, tanto em animais como em humanos, esta proteína apresenta uma atividade oncogênica, com variável grau de eficiência. Segundo Raj *et al.* (2004), as proteínas $E1^{\wedge}E4$ fusionadas são mais abundantemente expressas no epitélio infectado por HPV. Também observaram que essas proteínas

são capazes de prevenir a progressão de células em mitose, induzindo-as à fase G2 do ciclo celular.

O gene *E5* é freqüentemente deletado em tumores anogenitais, entretanto, elevados níveis de RNA mensageiro e proteínas são encontrados em lesões precursoras de baixo grau, sugerindo, conseqüentemente, o seu envolvimento em estágios precoces da infecção por HPV, porém, são dispensáveis na manutenção da transformação maligna (zur Hausen, 1996).

As proteínas E6 e E7 interagem especificamente com as proteínas celulares envolvidas na proliferação celular, causando um maior interesse em serem estudadas.

A expressão dos genes *E6* e *E7*, denominados oncogenes virais, é altamente controlada em queratinócitos indiferenciados, por pelo menos duas cascatas sinalizadoras, uma que opera em nível funcional e outra em nível transcricional (zur Hausen, 1999).

Como já citado anteriormente, o produto do gene *E6* se liga à proteína celular p53, considerada um supressor tumoral, alterando o ciclo celular. Segundo Band *et al.* (1991) a proteína é degradada pela via de proteólise dependente de ubiquitina. Estudos realizados por Klingelutz *et al.* (1996) demonstraram que a proteína E6 do HPV16 ativa a telomerase em queratinócitos e em células epiteliais mamárias, processo esse que é observado durante o estágio precoce do desenvolvimento celular, promovendo uma efetiva imortalização das células.

A proteína E7, similar às funções da proteína E6, liga-se à forma hipofosforilada do gene retinoblastoma, o Rb e como conseqüência, ocorre a liberação do fator de transcrição e o aumento da expressão de certos genes (Mello, 2005). Esse fato resulta na neutralização do controle negativo da proliferação celular, exercido para proteína pRb na transição da fase G0 à G1.

As proteínas E6 e E7 participam efetivamente no controle da proliferação celular, já que interagem suprindo as funções das proteínas associadas ao controle do crescimento celular. Assim, o potencial oncogênico de alguns tipos de Papilomavírus pode ser atribuído a essas interações. Ambas oncoproteínas virais tornaram-se alvos para a produção de vacinas terapêuticas contra o câncer anogenital (Peng *et al.*, 2004; Bibancos M *et al.*, 2006 a, b; Karanam *et al.*, 2009).

A proteína E8 em HPV não possui função definida, porém estudos experimentais realizados recentemente por Hu *et al.* (2004) têm demonstrado um potencial imunogênico desta proteína em Papilomavírus de coelhos (CRPV).

1.2.2 - Região tardia

A região tardia compreende cerca de 40% do DNA viral. Envolve dois genes, *L1* e *L2*, que codificam a proteína principal e a proteína secundária do capsídeo viral, respectivamente.

Dentre todos os Papilomavírus, a proteína *L1* é altamente conservada, diferentemente da *L2* que apresenta menor conservação. De acordo com estudos realizados por Pfister & Fuchs (1994), assim como por Zhou *et al.* (1994) há evidências da participação de *L2* na montagem do genoma dos HPVs, e ainda Kawana *et al.* (2001) acrescentam a importância da *L2* na interação desta proteína, durante a ligação vírus-célula hospedeira.

A partir das proteínas *L1* e *L2* é possível a obtenção de partículas virais vazias, denominadas de VLPs (*virus-like particles*). Porém, Kirnbauer *et al.* (1992) apóiam a idéia de que somente a *L1* é suficiente para a formação dessas partículas, conforme vem sendo demonstrado através de microscopia eletrônica de transmissão, quando produzidas em sistemas distintos de expressão (Aires *et al.*, 2006; Bazan *et al.*, 2009; Cianciarullo *et al.*, 2007). Tais partículas são produzidas a partir dos tipos virais mais prevalentes, destituídas de material genético, sendo capazes de induzir resposta imunológica com até 100% de proteção contra os vírus de origem. A atual vacina profilática aprovada pela OMS e ANVISA no Brasil, produzida pela Merck Sharp & Dohme Co. Inc. contra os HPVs 6, 11, 16 e 18 e GlaxoSmithKline (GSK) contra os HPVs 16 e 18, utilizam partículas virais sintetizadas *in vitro*, a partir da expressão da proteína *L1* do capsídeo viral. As VLPs de *L1* resultam em respostas imunoprotetoras (Chen *et al.*, 2000; Christensen *et al.*, 1994, 1996, 2001; Da Silva *et al.*, 2001; Inglis *et al.*, 2006; Aires *et al.*, 2006). Com o uso de sistemas distintos, outras pesquisas se encontram em fase de testes (Carter *et al.*, 2003; Casini *et al.*, 2004; Bazan *et al.*, 2009; Cianciarullo *et al.*, 2007, 2010).

Essas partículas têm sido utilizadas isoladamente ou associadas à seqüência de aminoácidos de E6 ou E7, no desenvolvimento de vacinas profiláticas e terapêuticas contra HPV (Dell & Gaston, 2001; Wakabayashi, 2002; Karanam *et al.*, 2009; Cianciarullo *et al.*, 2010, em andamento).

1.2.3 - Região Regulatória

A região regulatória representa 10% do genoma viral, não apresenta a capacidade de codificar proteínas, contém apenas alguns elementos de regulação viral responsivos aos hormônios, assim como, aos fatores de transcrição celular (Chang, 1990). É a região mais variável do genoma, com tamanho variado entre os Papilomavírus encontrados em humanos e em animais de outras espécies, de acordo com a IARC (1995).

Em HPVs genitais, o segmento varia de 800 a 900 pares de bases e está dividido em três regiões por quatro sítios de ligação do fator de transcrição viral E2; há um segmento 5' distal; um segmento central e um segmento 3' terminal.

A regulação da expressão gênica nos Papilomavírus é complexa e controlada por diferentes fatores de transcrição celular e viral que se liga a seqüências específicas da região regulatória. A maior parte desses fatores se liga ao segmento central, denominada de região intensificadora, regulando a transcrição do promotor dos genes *E6* e *E7*, situado na extremidade 3' terminal da região controladora do locus (*LCR*) (zur Hausen, 1996).

A região 5' distal é delimitada pelo códon de terminação da transcrição do gene *L1* e de um sítio de ligação *E2*. Há nessa região dois sítios, um para a terminação da transcrição e o outro para a poliadenilação do transcrito policistrônico (Furth & Baker, 1991). Em HPV 11, 16 e 18 a região central que apresenta dois sítios de ligação com *E2*, atua como um intensificador transcricional epitélio-específico, com provável envolvimento no tropismo epitelial destes vírus. O sítio de ligação ao gene *E2*, localizado na extremidade 3' da região intensificadora, está implicado na iniciação da replicação, além de modular a transcrição (Thierry *et al.*, 1992).

O segmento 3' representa a região promotora que está delimitada por um sítio de ligação ao gene *E2* e o códon de iniciação do gene *E6*. A transcrição é iniciada a partir do promotor p57, observado principalmente em HPV16, o que determinará um único transcrito policistrônico iniciado em *E6* (Howley, 1996). A localização dos sítios de ligação ao gene *E2* são conservados entre todos os HPVs de alto risco à progressão maligna (Dell & Gaston, 2001).

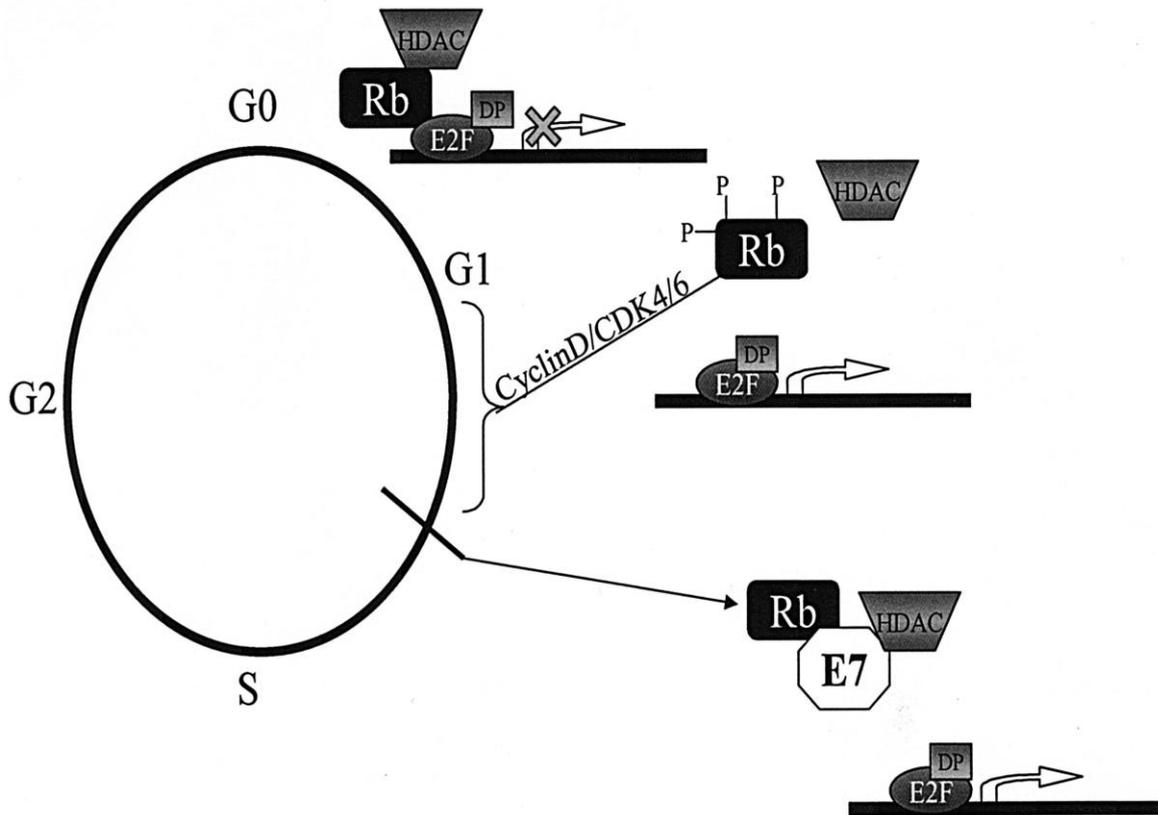


Figura 2 - Representação esquemática das atividades regulatórias do ciclo celular, mediadas pelas proteínas Rb, HDAC e E2F/DP-1. São indicados os efeitos de E7 sobre as ligações Rb e HDAC. Os complexos Rb-HDAC reprimem a atividade dos complexos de transcrição E2F/DP-1 ligados ao DNA em G1. As células movem para a fase S, Rb torna-se fosforilada pela ciclina D/cdk4/6 cinase, levando à liberação de proteínas Rb-HDAC. E7 liga-se a Rb e HDACs independentemente, resultando na ativação constitutiva de genes induzidos por E2F (Longworth & Laimins, 2004).

1.3 - Formas de infecção viral

Após a penetração do vírus na célula, podem ocorrer três possíveis formas de infecção. A infecção latente, onde o DNA viral é mantido no interior do núcleo sob a forma episomal, replicando sincronicamente com a célula hospedeira. As células são morfológicamente normais, pois o DNA viral não interfere na divisão celular. Somente os genes da região precoce são expressos (Cheah & Looi, 1998).

Outra forma é a infecção produtiva, onde a replicação do DNA viral não é sincronizada à divisão celular. O número de DNA episomal aumenta progressivamente com o avanço da diferenciação celular, devido à atividade dos genes tardios somente nas camadas mais superficiais do epitélio. Assim, as proteínas virais do capsídeo são expressas apenas nestas camadas e as partículas virais maduras são encontradas, unicamente, nas camadas mais diferenciadas do epitélio (Howley, 1996).

Durante o curso da infecção produtiva pode-se observar modificações morfológicas no epitélio escamoso; essas modificações resultam justamente no desenvolvimento dos papilomas ou de uma lesão intraepitelial escamosa de baixo grau em humanos.

E, por último, podem ocorrer as transformações malignas na qual ocorre a integração do DNA viral com o genoma da célula hospedeira. O DNA viral passa da forma episomal, através de uma quebra no genoma, para a forma linear que possibilitará, posteriormente, a sua incorporação ao genoma celular.

A quebra do DNA viral ocorre consistentemente nos genes *E1* e *E2*, comprometendo a expressão da proteína *E2*, que tem ação repressora junto aos promotores de transcrição de *E6* e *E7*. Então, os genes passam a ser constitutivamente expressos e se mantêm nos tumores e em suas metástases.

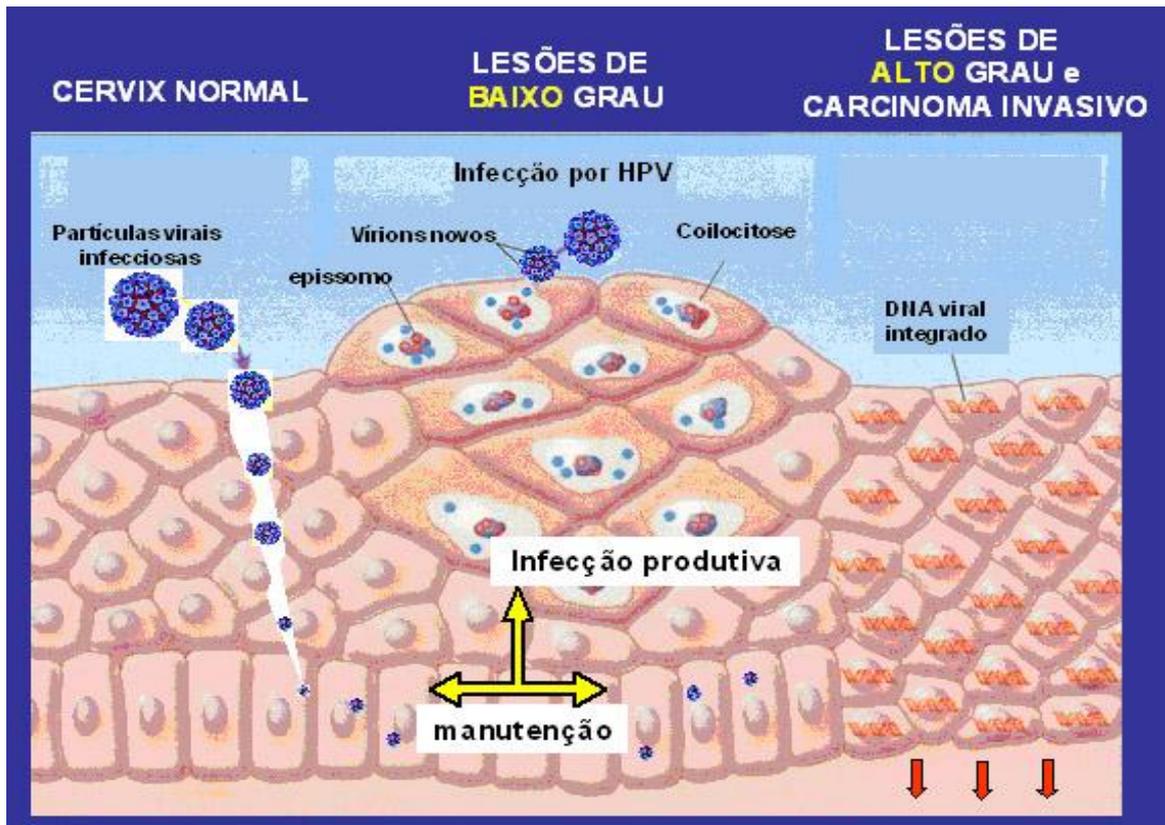


Figura 3 - Representação esquemática da infecção por HPV (Doorbar, 2005).

1.4 - A Infecção por Papilomavírus Humano (HPV)

O HPV é altamente prevalente, ocorrendo em 10% a 20% da população sexualmente ativa entre 15 a 49 anos, inclusive entre mulheres assintomáticas (Nonnenmacher *et al.*, 2002). Por outro lado, estudos recentes descrevem mulheres virgens, que nunca mantiveram relacionamentos sexuais, como portadoras de lesões genitais produzidas pelo HPV. A transmissão vertical, fômites e contato da pele são vias consideradas prováveis (Frega *et al.*, 2003). Responsável por até 91% dos casos de câncer cervical no Brasil (Rabelo-Santos *et al.*, 2003), o câncer cervical atinge cerca de 450 mil mulheres por ano em todo o mundo, levando à morte a metade delas. Trata-se da principal causa de morte em mulheres nos países em desenvolvimento, sendo a doença um problema sério de saúde pública (Szulcowski *et al.*, 2008a, 2009, 2010). Elevados níveis viróticos cervicais pode permitir a propagação do vírus a outras regiões do aparelho reprodutor, como a cavidade amniótica, contribuindo para a transmissão materno-fetal do HPV (Armbruster-Moraes *et al.*, 1994, 1998).

Estudos recentes correlacionam o câncer de pênis e ânus com o HPV, com predominância do HPV16 e HPV18. (Bezerra *et al.*, 2001). Os cânceres de pênis, cervical e anal são considerados uma DST, havendo uma forte correlação positiva entre o número de parceiros na vida. Porém há casos de homens e mulheres com câncer anal mesmo sem nunca terem praticado relação sexual anal, assim há suspeita da existência de outras vias de infecção por HPV (Kavati *et al.*, 2009; Palumbo *et al.*, 2010; Szulczewski *et. al.*, 2008a, 2009, 2010).

Estudos epidemiológicos revelaram que o HPV16 é responsável por 50% dos casos de câncer cervical e que em 99,7% dos casos totais foi detectado o DNA viral de HPVs (Unger & Franco, 2001). Entretanto, ainda faltam dados sobre o processo de infecção dos Papilomavírus, do momento de sua interação com a superfície da célula hospedeira, sobre o transporte para o núcleo, as reações de montagem da partícula viral e as interações com o sistema imunológico (Villa *et al.*, 2002; Beglin *et al.*, 2009).

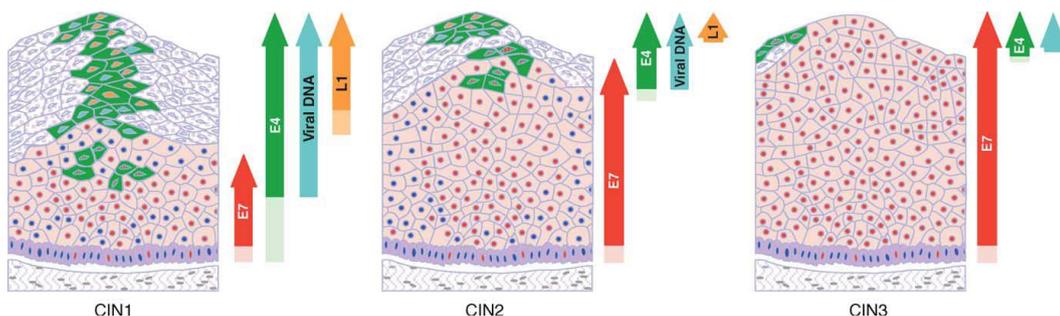


Figura 4 – Mudanças no ciclo de vida do HPV16 durante o desenvolvimento do câncer cervical. Durante a progressão do grau de neoplasia intra-epitelial cervical grau 1 (CIN1) para CIN3, a regulação normal do ciclo de vida do papilomavírus é perdida. CIN1s geralmente se parecem com lesões produtivas causadas por outro super-grupo de tipos de HPV A, e expressam proteínas do capsídeo viral (L1) na superfície epitelial. Em lesões CIN2 e CIN3, a ordem de eventos do ciclo de vida é inalterada, mas a extensão da expressão de E7 é aumentada (Doorbar, 2005).

Algumas famílias virais utilizam a endocitose para infectar as células hospedeiras, facilitando a internalização das partículas virais e o transporte até o sítio de replicação. Foi observado em alguns estudos que os vírus utilizam todas as vias endocíticas das células, ampliando a suas chances de sucesso na infecção dos organismos hospedeiros. Entre as vias endocíticas utilizadas estão a endocitose mediada por clatrina, cavolina, macropinocitose e novas vias alternativas independentes de clatrina ou caveolina (Sieczkarski & Whittaker, 2002). Uma via

conveniente para os vírus alcançarem o núcleo da célula hospedeira seria a transcitose que é uma estratégia utilizada pelos organismos multicelulares para mobilizar material entre dois compartimentos, sem alterar as composições únicas dos mesmos (Tuma & Hubbard, 2003).

Recentemente descobriu-se que o HPV infecta células numa via endocítica mediada por receptor e dependente de clatrina (Day *et al.*, 2003). É provável que o HPV possa utilizar a via endocítica do ferro e a transcitose para infectar as células hospedeiras do sangue periférico, através do receptor de transferrina (Szulczewski *et al.*, 2008a, 2009, 2010).

1.5 – Transformação e Imortalização Celular

O HPV é o principal agente causador do câncer cervical, onde 99% dos tumores são positivos para o DNA do HPV (Walboomers *et al.*, 1999) e aproximadamente 20% dos cânceres orofaríngeos contêm o DNA do HPV (Herrero *et al.*, 2003).

As seqüências de HPV conhecidas atualmente são classificadas de acordo com o risco de malignidade, havendo os de alto risco e os de baixo risco. A diferença entre esses dois tipos está associada ao papel transformante dos produtos dos genes *E6* e *E7*. As proteínas codificadas pelo gene *E6* se ligam à p53 e de *E7* à pRb, ambas proteínas reguladoras do ciclo celular, consideradas supressoras do câncer, acarretando o desbloqueio do ciclo celular e instabilidade genética, logo, provocam alterações genéticas adicionais que impedem a apoptose, causando o fenômeno de imortalização celular. Este processo é encontrado somente nos vírus de alto risco, não sendo observado nos de baixo risco (Helt, 2002).

Além disto, o gene *E6* do HPV16 apresenta quatro mutações que não estimulam a degradação da proteína p53, que impede a replicação viral estável. Sugere-se que esta atividade possa ser necessária para a manutenção do vírus na forma episomal.

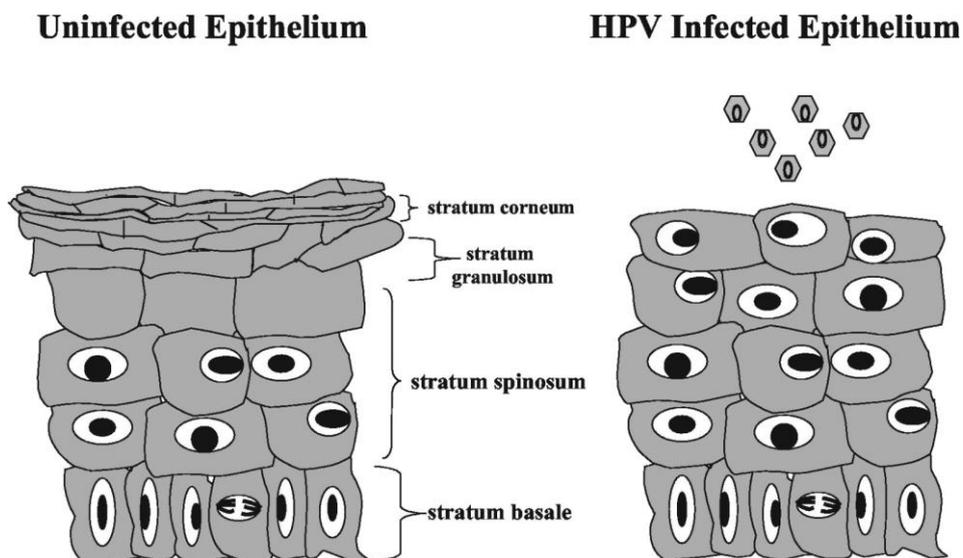


Figura 5 - Representação esquemática do epitélio não infectado (esquerda) e infectado por HPV (direita) apresentando várias camadas diferenciadas e a produção viral (Longworth & Laimins, 2004).

Em HPV 31 também foi observado que o gene *E6* tem papel essencial na manutenção do vírus na forma epissomal em queratinócitos humanos. Uma mutação de ponto no gene *E7*, a qual impede que seu produto se ligue à proteína Rb, tem sido reportada como causadora da incapacidade do HPV31 realizar a replicação estável (Salvia, 2004). Porém, alguns estudos mostram que o genoma do HPV31, que possui duas de três mutações do gene *E6*, as quais tornam seu produto incapaz de induzir a degradação da proteína p53, combinada com a mutação de ponto do gene *E7*, foi mantido como epissomal replicante, sugerindo que o equilíbrio entre as funções dos genes *E6* e *E7* é crítico para a manutenção epissomal do genoma do HPV de alto risco (Park & Androphy, 2002).

1.5.1 - Funções das Oncoproteínas E6 e E7

As oncoproteínas E6 e E7 são expressas continuamente em tumores e são essenciais para a manutenção do ciclo viral. Além de controlar o ciclo celular das células infectadas, as oncoproteínas E6 e E7 modulam o sistema imune de forma que as células tumorais tornam-se pouco imunogênicas. Tal processo pode acarretar até na tolerância imunológica ao tumor. A expressão de E6 e E7 está associada ainda com a progressão de lesões benignas para carcinomas invasivos (Tindle, 2002).

Os Papilomavírus são pequenos vírus DNA contendo aproximadamente 8 genes, e requerem a maquinaria de replicação do DNA da célula hospedeira para replicar seu DNA viral. Então, os Papilomavírus têm desenvolvido estratégias para induzir a síntese de DNA balanceada na célula hospedeira, com estratégias para proteger a célula da replicação não programada. Enquanto que os genes E1 e E2 estão diretamente envolvidos na replicação viral na origem da replicação, as proteínas E6 e E7 têm funções auxiliares que promovem a proliferação. Com a consequência de desativar os pontos de verificação normal que regulam o início e a progressão do ciclo celular, as proteínas E6 e E7 desempenham um papel chave nas propriedades oncogênicas dos Papilomavírus humanos, com um alto risco de causar cânceres anogenitais. Portanto, E6 e E7 de HPVs de alto risco são expressas invariavelmente em cânceres cervicais (Howie *et al.*, 2009).

A oncoproteína E6 e suas numerosas atividades incluem a inativação da p53, bloqueio da apoptose, ativação da telomerase, interrupção da adesão celular, da polaridade e diferenciação epitelial, alteração da transcrição e redução do reconhecimento imunológico (Howie *et al.*, 2009).

A oncoproteína E6 dos HPVs de alto risco é formada por aproximadamente 150 aminoácidos e dois motivos de zinco, cuja integridade é essencial para a função de E6. É localizada no núcleo e citoplasma de queratinócitos infectados por HPVs (Hebner & Laimins, 2006). Essa oncoproteína desempenha papel importante nos processos que culminam com transformação celular, pela interação com a proteína p53, proteína pró-apoptótica (zur Hausen, 1996).

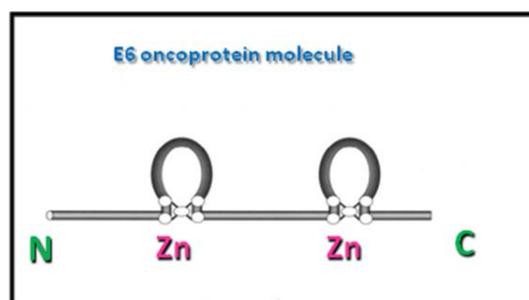


Figura 6 – Esquema representativo da molécula da oncoproteína E6 (Mantovani & Banks, 2001)

A estimulação mediada por ubiquitina de p53, pela via de interação celular E6 AP ubiquitin-protein ligase, tem sido a primeira atividade descrita para o alto risco da proteína E6, associado com a carcinogênese (Sheffner *et al.*, 1990). Porém, em alguns

estudos foi observado que E6 induz a transformação celular em culturas ou *in vivo*, independente da degradação de p53, indicando que há interação com outros componentes, como a que ocorre com proteínas do domínio PDZ, que são supressoras de tumor (Zhang *et al.*, 2006). Os detalhes das interações de E6 com as proteínas de PDZ ainda não são claros. É sabido que o domínio PDZ geralmente é identificado por um peptídeo de 4 aminoácidos, X-T/S-X-V que é usualmente encontrado na extremidade C – terminal das proteínas (Doyle *et al.*, 1996).

E6 dos HPVs de alto risco apresentam 6 resíduos peptídicos conservados no C-terminal (R-R/T/N/Q-E-T-Q-E-V/L), na qual T está na posição 3 e V/L na posição 1, que é uma característica de organização dos peptídeos de PDZ (Flores *et al.*, 2006). A proteína E6 dos diferentes tipos de HPVs de alto risco aparenta ter várias especificidades e afinidades por diferentes PDZs. Por exemplo, em HPV16, E6 liga-se a SAP97/Dlg em PDZ 2 (Kiyono *et al.*, 1997), enquanto que em HPV18, E6 liga-se com os 3 domínios PDZ (Gardioli *et al.*, 1999). Esta diferença de ligação aos PDZs talvez esteja associada com a patogenicidade e prevalência, em particular, de cada tipo de vírus (Zhang *et al.*, 2007).

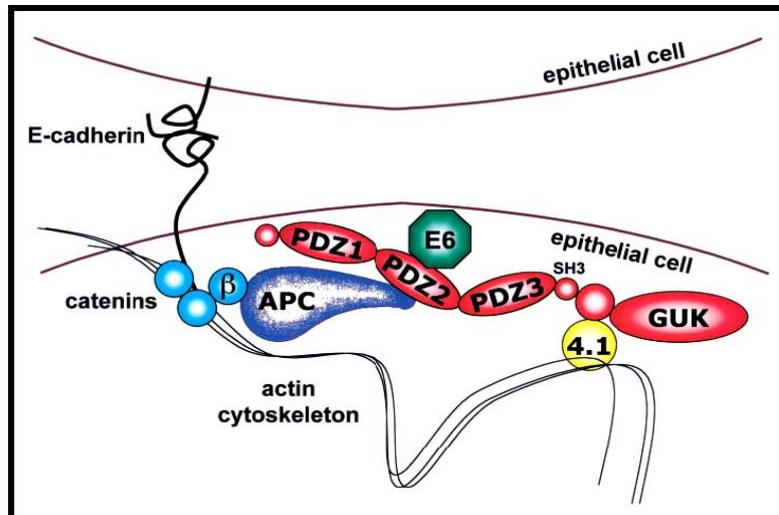


Figura 7 – Esquema representativo da interação de E6 com o domínio PDZ. As proteínas E6 possuem um motivo de ligação C-terminal PDZ conservado, para interação com algumas proteínas do domínio PDZ celular, as quais correlacionam com o potencial oncogênico (Mantovani & Banks, 2001).

A oncoproteína E6 pode ainda ativar a telomerase em células infectadas, o que permite manter o comprimento dos telômeros em células epiteliais. Age também sobre outros fatores apoptóticos, como CD95 ou FADD (fatores extrínsecos - receptores de

morte), Bak ou Bcl-2 (fatores intrínsecos – via mitocondrial) (Hebner & Laimins, 2006). A inativação da via apoptótica de Bax por E6 é crucial para a proteção das células cancerosas HPV positivas contra a ação da apoptose, facilitando o desenvolvimento do tumor (Vogt M. *et al.*, 2006; Leverrier *et al.*, 2007). A expressão do oncogene E6 impede a ação dos Fatores de Indução da Apoptose (AIF) assim como a de citocromo c.

Assim, o gene E6 é considerado a chave para manter a viabilidade de células cancerosas HPV positivas, definindo essa oncoproteína como alvo de intervenções terapêuticas (Vogh, 2006). Sendo assim, está envolvida diretamente nos processos de imortalização das células infectadas por HPV. A diminuição da atividade de E6, observada nas células infectadas com HPV, leva a inibição da proliferação celular (Alvarez-Salas *et al.*, 1999; Hamada *et al.*, 1996), podendo ocorrer a apoptose (Cho *et al.*, 2002; Butz *et al.*, 2003; Yamato *et al.*, 2005; Griffin *et al.*, 2006). Tal fato confirma a conveniência da proteína E6 ser um possível alvo para introdução terapêutica de carcinoma cervical.

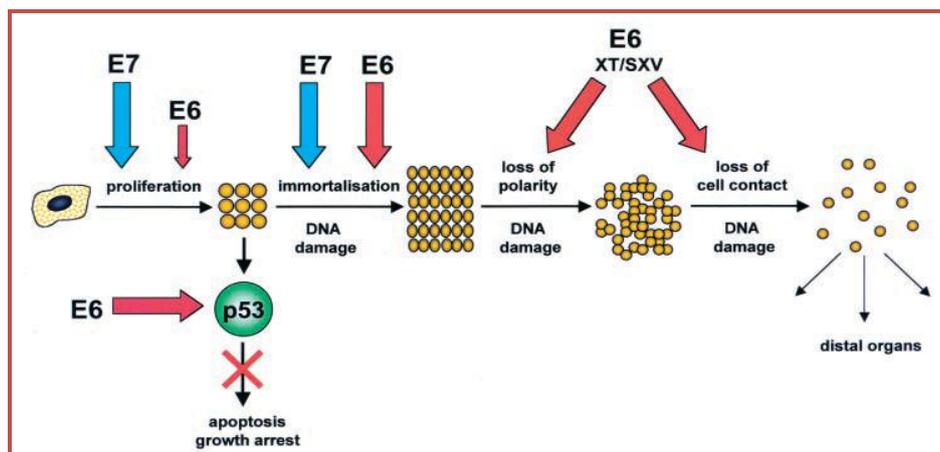


Figura 8 - Contribuição da proteína E6 do HPV nos diferentes estágios da progressão tumoral. O papel de E6 na promoção tumoral é fraca, comparada com aquela de E7, a qual estimula ativamente a proliferação celular. Em contraste, E6 promove a progressão da malignidade tumoral: a degradação da p53 domina a detenção do crescimento e/ou apoptose, permitindo o acúmulo de DNA danificado e a indução da telomerase contribui para a imortalização celular. Finalmente, direcionada para as proteínas contendo PDZ através das seqüências C-terminal XT/SXV de E6 causa a perda da polaridade celular e contacto, contribuindo fortemente para o fenótipo maligno (Mantovani & Banks, 2001).

Em estudo recente foi demonstrado que o gene *E6* codifica para duas diferentes isoformas, E6(large) e E6*. Ambas afetam a estabilidade da pró-caspase 8, um

mediador chave da via apoptótica, atuando de maneiras opostas (Fillipova et al., 2007; Tunngteakkhun et al., 2010).

A oncoproteína E7 contém em torno de 98 aminoácidos, com três regiões bem conservadas CR1, CR2 e CR3. O domínio CR1 compreende a região amino-terminal, CR2 contém um motivo LXCXE, que faz a ligação entre E7 e membros da família da proteína supressora tumoral retinoblastoma (pRB), e CR3 consiste de dois motivos de zinco (Hebner & Laimins, 2006).

Da mesma forma que E6 também exerce papel importante nos mecanismos de transformação celular, por interagir com a proteína supressora pRb, resultando na ativação de genes da fase S do ciclo celular (zur Hausen, 1996; Cid-Arregui *et al*, 2003; Mclaughlin-Drublin *et al*, 2005; Wilson *et al*, 2005; Subramanyam & Krisna, 2006; Gnanamony *et al*, 2007), a proteína pRB participa da regulação do ciclo celular, onde controla a progressão da fase G1 para fase S (Hebner & Laimins, 2006), através da atividade de E2F, o fator responsável pela transcrição de genes que atuam na replicação dos cromossomos.

A oncoproteína E7 dos HPVs de alto risco induz anormalidades nos centrômeros de células em cultura e em animais transgênicos (Duensing *et al.*, 2002; Schaeffer *et al.*, 2004), isto sugere que E7 pode atuar como um mutante mitótico, propiciando que ocorram erros durante a divisão celular (Duensing *et al.*, 2004). A base molecular da ação de E7 na desestabilização do genoma ainda não é totalmente conhecida. Em parte parece ser independente da associação característica com as proteínas pRb, p107 e p130. A associação de E7 com essas proteínas, contudo, tem contribuição para a habilidade da oncoproteína estimular a proliferação celular, sendo que a associação com a pRb é mais eficiente nos HPVs de alto-risco do que nos de baixo-risco (Berezutskaya *et al.*, 1997; Boyer *et al.*, 1996).

Estudos recentes demonstraram o mecanismo pelo qual a proteína E7 perturba o ciclo celular (Yugawa & Kiyono, 2009). Primeiramente a oncoproteína E7 recruta uma protease dependente de cálcio, a calpaina, promovendo a clivagem da porção C-terminal de pRB, resultando na liberação de E2F, esse processo parece ser pré-requisito para a degradação de pRB via proteossomo. Os dois acontecimentos, degradação de pRB e liberação de E2F, causam uma perturbação no ciclo celular, através de um estímulo excessivo para a proliferação dos queratinócitos infectados por HPV. Alguns estudos revelam que E7 é capaz de induzir atividade enzimática de α -

glucosidase no citoplasma, que degrada glicose e promove energia para o crescimento e divisão celular (Zwerschke *et al.*, 2006).

A oncoproteína E7 apresenta três diferentes isoformas, com peso molecular e localização celular diferentes. A localização em compartimentos celulares distintos, talvez seja importante para a interação de E7 com as proteínas alvo e a transformação celular (Valdovinos-Torres *et al.*, 2008).

O tratamento das lesões genitais causadas por HPV, utilizando Interferon, tem produzido resultados variados. Enquanto que as proteínas do HPV regulam a redução da expressão de genes indutores de Interferon, o tratamento com Interferon induz no final elevação nos níveis de transcrição, após um atraso. As células contendo os genomas completos do HPV, capazes de desencadear a replicação produtiva até a diferenciação, são sensíveis à detenção do crescimento induzida por Interferon, enquanto que células de cânceres de alto-grau que expressam apenas E6 e E7 são resistentes. Estudos recentes indicam que esta sensibilidade é dependente da ligação do fator indutor de Interferon, p56, à proteína de replicação viral E1. A resposta ao Interferon por proteínas do HPV é complexa e resulta da ação de múltiplas proteínas virais (Beglin *et al.*, 2009).

Assim como E6, a oncoproteína E7 está diretamente envolvida no processo de imortalização de células infectadas por HPV, e por manter o fenótipo cancerígeno dessas células, torna-se também alvo das estratégias terapêuticas.

1.6 - Oncogênese versus Apoptose

Apoptose, ou morte celular programada, inicia uma série de eventos que realizam uma eficiente regulação no número de células, evitando uma “superpopulação” durante o desenvolvimento das mesmas, ou selecionando à morte células defeituosas e de potencial tumorigênico (Leverrier *et al.*, 2007).

Há duas vias para o início da apoptose: os receptores de membrana ou mecanismos intrínsecos que envolvem as mitocôndrias, o último é mais comum em células de vertebrados em resposta a variação genotóxica (Danial & Korsmeyer, 2004). O evento essencial nesse processo é a perda do potencial de membrana externa da mitocôndria (MOMP), um complexo evento que depende de duas chaves pró-apoptóticas, membros da família de proteínas Bcl-2, Bax e Bak, e é considerado como crítico no processo de morte celular (Kuwana & Newmeyer, 2003; Green, 2005).

Quando ocorre a ativação de Bax e Bak, há a formação de múltiplos complexos contendo lipídeos, que são capazes de formar supra-moléculas que abrem poros nas membranas da mitocôndria, resultando na perda do potencial de membrana da mesma e a liberação da seletividade de proteínas locais do espaço inter-membranas mitocondrial (Wei *et al.*, 2001; Green, 2005).

A liberação das proteínas da membrana interna da mitocôndria promove a apoptose, em geral por dois mecanismos, um deles envolvendo eventos celulares, levando a ativação da caspase. O segundo separa a via que depende da ativação da nuclease (Saelens *et al.*, 2004).

A cadeia respiratória mitocondrial parece atuar como moduladora da apoptose, numa maneira dependente do contexto, mas independente da produção de ATP, e as respostas apoptóticas são o resultado da interação entre o estado da função mitocondrial e as condições do ambiente celular (Kwong *et al.*, 2007).

A oncoproteína E6 apresenta potencial anti-apoptótico, demonstrado em diversos experimentos e orienta a inibição de fatores endógenos que levam à apoptose, nas células cancerosas HPV positivas. Como já citado anteriormente, a oncoproteína E6 age sobre Bax e Bak, que têm papel essencial no processo de apoptose, sendo assim, o produto deste oncogene viral *E6* aparentemente impede que ocorra o processo de morte celular, ao interagir com as mitocôndrias de células HPV positivas (Szulczewski *et al.*, 2008b; Andrade *et al.*, 2009, 2010).

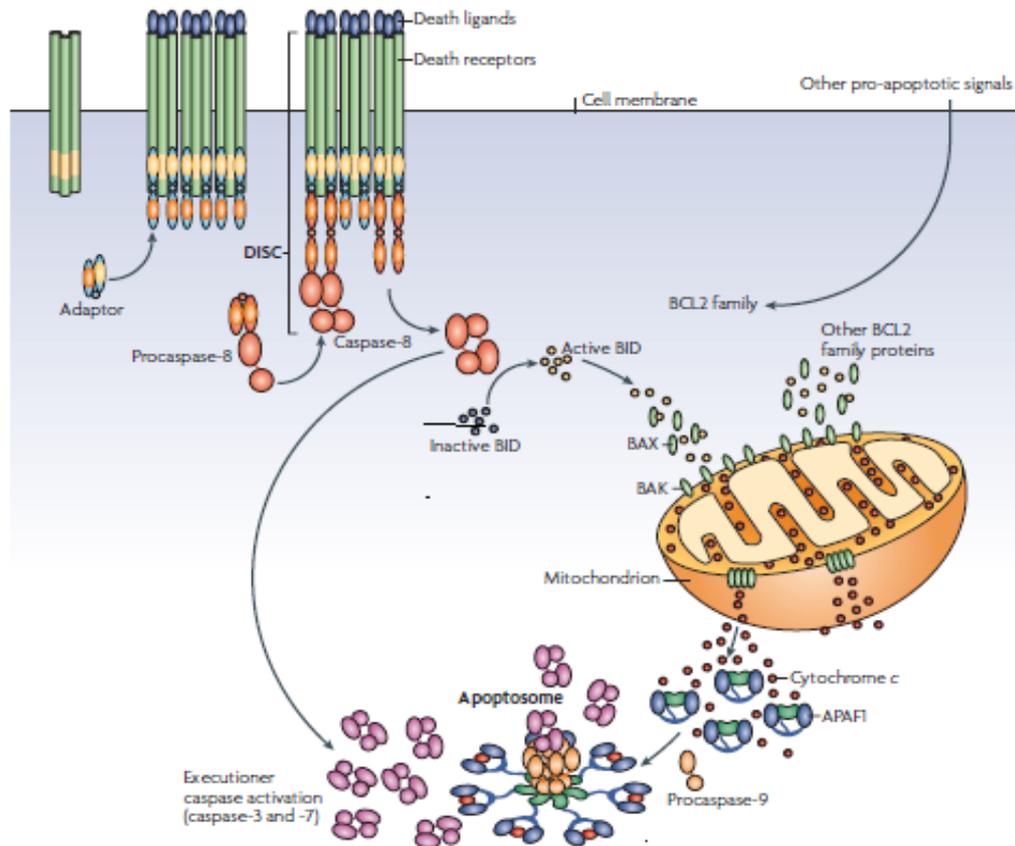


Figura 9 – Representação esquemática da via intrínseca versus a extrínseca da apoptose. A via extrínseca é iniciada pelo engajamento do receptor de morte transmembrana (FAS por exemplo) em um ligante de morte extracelular (por exemplo FASL) que leva a um complexo sinalizador de morte (*DISC*). O *DISC* cria uma plataforma que reúne moléculas de caspase-8 (ou caspase-10), o iniciador de caspase da via extrínseca que permite sua auto-ativação. A via intrínseca é ativada pela permeabilização da membrana mitocondrial externa (*MOMP*) e pela liberação das proteínas localizadas no espaço intramembranas da mitocôndria. Há diversas proteínas iniciadoras ou de regulação da ativação da caspase, incluindo a citocromo *c*. No citoplasma a citocromo *c* engaja a APAF1, na presença de dATP (Ow *et al.*, 2008).

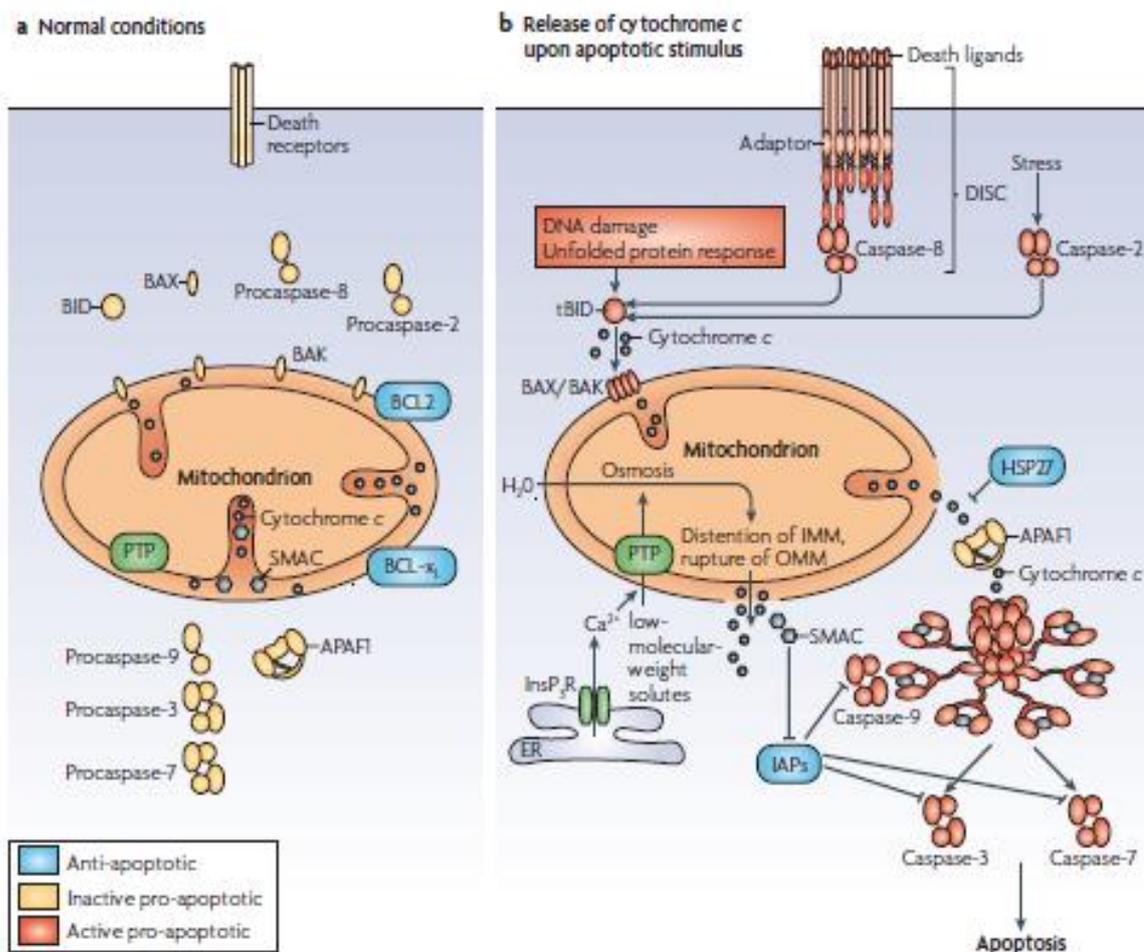


Figura 10 – A liberação de citocromo *c* e seus efeitos. Em condições normais pró-apoptóticas as proteínas da membrana mitocondrial como a citocromo *c* (pontos cinzas) e a SMAC (também conhecida como Diablo - hexágonos cinzas) ficam dentro da membrana mitocondrial. (a) O poro de transição de permeabilidade (PTP) está presente e fechado. Na pró-apoptose BCL-2 assim como BAX, BAK e BID estão impedidas de exercer suas funções pelas moléculas anti-apoptóticas da família BCL-2 como a BCL-2 e BCL-x_L. No citoplasma a caspase permanece intacta, pró-caspase inativa, APAF-1 em sua forma monomérica autoinibida. (b) Seguindo os estímulos anti-apoptóticos (como danos no DNA) BID é clivado a (t)BID. tBID ativa BAX e BAK induzindo a oligomerização e formação de poros na membrana mitocondrial externa (OMM). A citocromo *c* sai da mitocôndria pelos poros, mediado por PTP ou outros canais. Uma vez no citoplasma a citocromo *c* liga-se a APAF1 possibilitando heptamerização e ligação com a pró-caspase-9. A ativação da caspase-9 então ativa o executor de caspase-3 e 7. *Feedbacks* celulares também podem promover a liberação de citocromo *c* como a abertura de PTP por Ca²⁺ que é liberado do retículo endoplasmático. A abertura de PTP pode promover a liberação de partículas de baixo peso molecular presentes nas mitocôndrias. Para combater as manifestações pró-apoptóticas, a liberação de citocromo *c* pode ser inibida por proteínas *heat-shock* como HSP27, enquanto as caspases podem ser inibidas por proteínas inibidoras de apoptose (IAP) (Ow *et al.*, 2008).

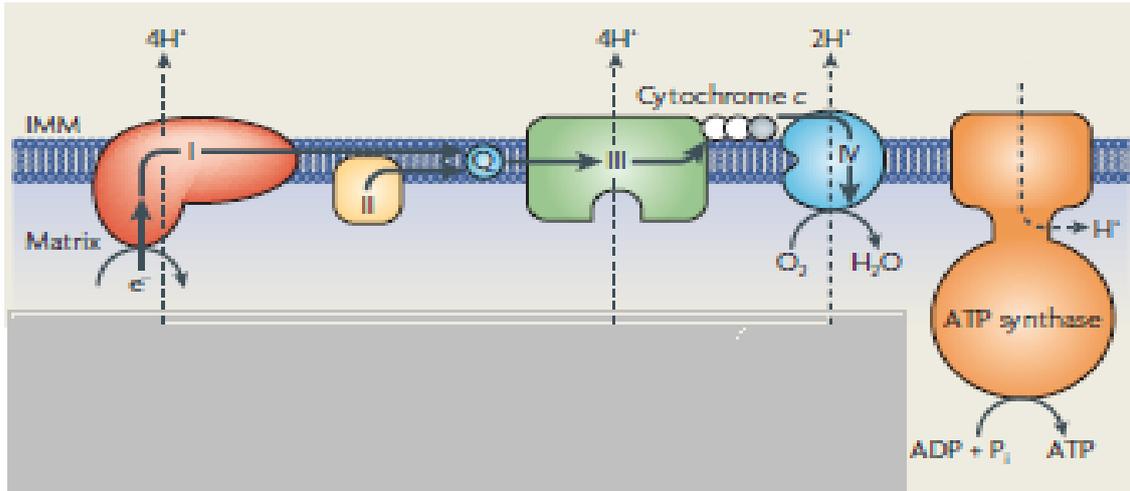


Figura 11 – A citocromo c é essencial na cadeia de transporte de elétrons (círculo cinza). A citocromo c recebe elétrons do Complexo III transferindo-os para o Complexo IV da cadeia de transporte de elétrons (citocromo oxidase), quando os elétrons chegam ao O₂ ocorre a sua conversão em H₂O (Ow *et al.*, 2008).

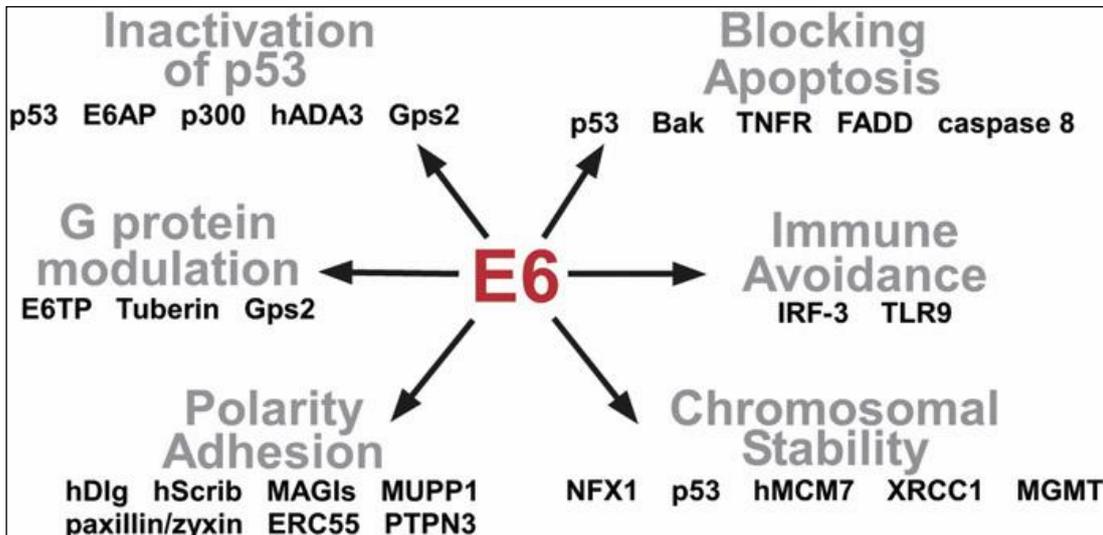


Figura 12 – Parceiros de ligação de E6. E6 altera numerosas vias celulares através da ligação de outras proteínas (Howie *et al.*, 2009).

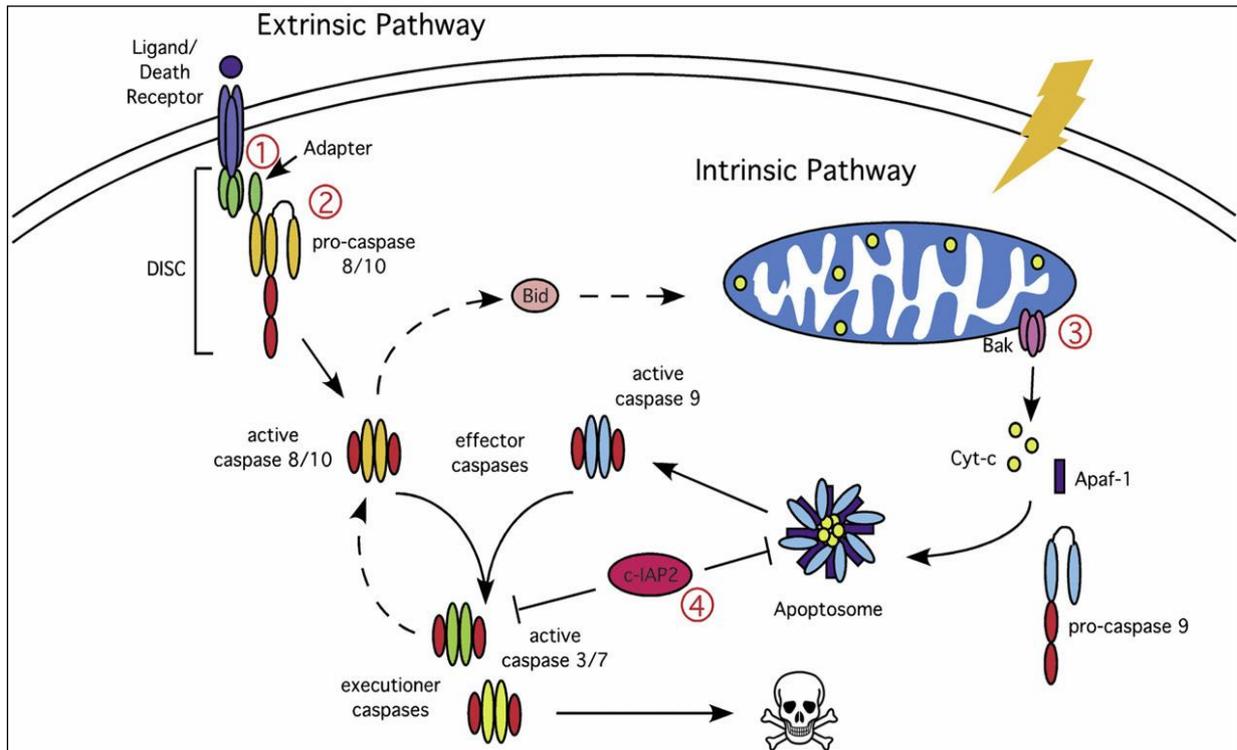


Figura 13 – Vias apoptóticas extrínsecas e intrínsecas. A via extrínseca é ativada através da trimerização de receptores de morte, seguida pelo recrutamento de moléculas adaptadoras e da pró-caspase 8, para formar o DISC (*death inducing signaling complex*), ou complexo sinalizador da indução de morte. Subseqüente clivagem da caspase 8 leva à clivagem de caspase executoras downstream, caspase 3 e caspase 7, e subseqüente morte celular. E6 pode bloquear a associação do receptor de morte com moléculas adaptadoras (1) e pode induzir a degradação de certas moléculas adaptadoras assim como a caspase 8 (2). A ativação da via intrínseca por estresses celulares “intrínsecos” levam à formação de poros na membrana mitocondrial, e subseqüente liberação de proteínas da membrana interna para o citosol. Essas proteínas, associadas com a pró-caspase 9 formam o apoptossomo, que cliva a caspase 9. Ativada a caspase 9 então vai clivar as caspases 3 e 7 executoras downstream, levando à morte celular. E6 degrada Bak, e então, bloqueia a liberação de proteínas da membrana interna mitocondrial para o citosol (3). E6 também é capaz de inibir IAPs e então bloquear o apoptossomo e a clivagem das caspases executoras (4) (Howie *et al.*, 2009).

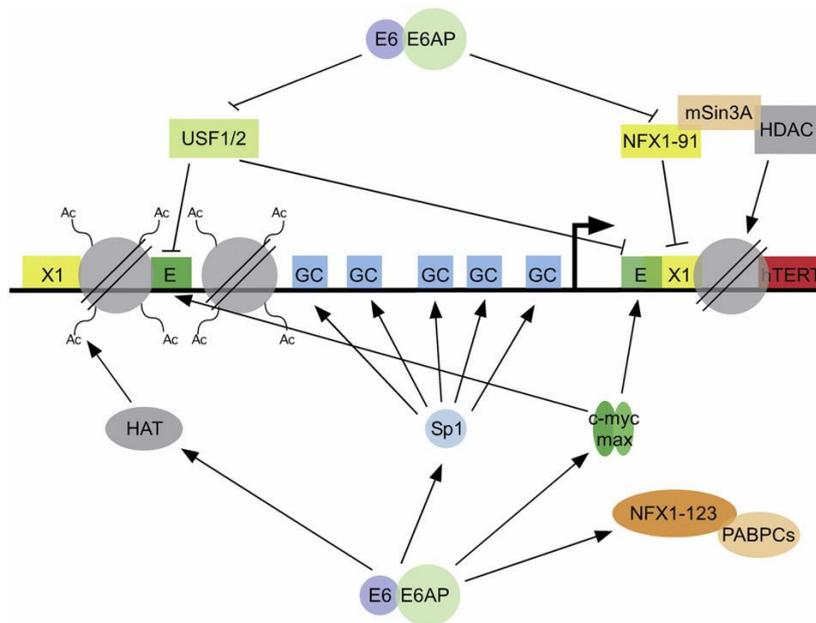


Figura 14 – Modelo do promotor hTERT. A subunidade catalítica de telomerase, hTERT, é regulada em seu núcleo promotor por elementos *cis* que incluem X1 boxes, E boxes, e seqüências ricas em GC. Repressores (mostrados acima do promotor como retângulos) inclui USF1 e 2, que se liga ao E-boxes, e NFX1–91, que se liga à seqüência downstream X1 box e recruta a atividade da histona deacetilase através de mSin3A. Ativadores (mostrados abaixo do promotor como ovais) incluem os heterodímeros c-Myc/Max, que se ligam às seqüências E box ativam a expressão de hTERT; Sp1, que se liga às seqüências ricas em GC, e histona acetiltransferases, que aumentam as histonas acetiladas no promotor hTERT. E6/E6AP afetam todos esses repressores e ativadores. NFX1–123 com proteínas ligadas a poly(A) citoplasmáticas (PABPCs) trabalham em conjunto com E6/E6AP para aumentar a ativação de hTERT (Howie *et al.*, 2009).

2. OBJETIVOS

- Cultivar células HPV-positivas em condições ideais, dentro das normas da CTNBio, em laboratório de risco biológico classe 2 (NB-2).
- Realizar transfecção celular em células HPV-negativas, com vetores de expressão contendo os oncogenes virais E6 e E7.
- Realizar fracionamento celular para obtenção da fração mitocondrial de células HPV-positivas e HPV-negativas, como controle.
- Realizar ensaios de imunofluorescência, analisados em microscopia confocal a laser.
- Realizar ensaios de imunocitoquímica ultraestrutural, analisados em microscopia eletrônica de transmissão.
- Estudar a expressão das oncoproteínas virais E6 e E7 em células HPV-positivas e HPV-negativas, devido à relevância de ambas no desenvolvimento de câncer cervical e anogenital, nos indivíduos infectados por HPVs de alto risco.

3. METODOLOGIA

3.1 – Cultivo celular

Foram utilizadas as seguintes linhagens celulares: HeLa, originada de um adenocarcinoma cervical humano; SiHa, originada de um carcinoma cervical de células escamosas humanas; CaSki, originada de um carcinoma epidermóide cervical e 293T, originada de células epiteliais normais de rim humano.

As linhagens celulares foram cultivadas a 37°C em garrafas plásticas descartáveis estéreis (*TPP*®) contendo meio DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco, Cultilab) suplementado com soro fetal bovino 10% (SFB, Cultilab), mantidas em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ até atingirem de 50%-80% de confluência. Logo após, as células foram lavadas com PBS (tampão fosfato), tripsinizadas (Tripsina/EDTA, Cultilab) e ressuspensas em DMEM com SFB 10%. A seguir, as células são homogeneizadas, com o cuidado para evitar formação de bolhas, e contadas para diluições, repiques celulares e armazenamento. Os estoques celulares foram mantidos no meio de cultivo contendo SFB 10% e DMSO 10% (dimetilsulfóxido), em tanque de nitrogênio líquido a -192°C (Szulczewski *et al.*, 2008b).

3.2 - Transfecção celular

As transfecções transientes das células 293T foram realizadas por lipofecção (Cianciarullo *et al.*, 2007, 2010; Szulczewski *et al.*, 2008b). As células foram preparadas como descrito a seguir: um dia antes da transfecção, $1,1 \times 10^4$ células por cm² foram plaqueadas em placa previamente tratada com polisina, na presença de DMEM mais 10% SFB sem antibióticos, para adquirir a confluência adequada no momento da transfecção. Conforme as instruções do fabricante, em um tubo estéril foram adicionados meio DMEM sem soro e sem antibióticos, o reagente de transfecção *GeneJuice*® *Transfection Reagents* (EMD Biosciences/Merck) e misturados por vórtex, sendo incubado por 5 minutos a temperatura ambiente. À mistura foi adicionado o DNA plasmideal de interesse, os vetores de expressão pLXSN contendo os genes E6 e E7 completos (Demers *et al.*, 1996), homogeneizados gentilmente com a pipeta e a mistura foi incubada por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, a mistura Meio/GeneJuice/DNA foi adicionada às células com meio de cultura completo, e

incubado em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após 18 horas foi realizada a troca do meio de cultura, a incubação seguiu até aproximadamente 48 horas.

3.3 – Ensaios de Imunofluorescência

3.3.1 – Fixação das células

Primeiramente foram plaqueadas 2×10^4 células das linhagens celulares analisadas para cada poço, em placas descartáveis de 12 poços já contendo lamínulas. Estas foram mantidas sob condições de crescimento conforme descrito anteriormente no item 3.1. Após terem atingido a confluência necessária as células foram fixadas com paraformaldeído (PFA) 2%, mantidas a 4° C por 1 hora, passado esse tempo o PFA foi retirado dos poços que foram lavados com PBS (tampão fosfato) duas vezes 5 minutos cada. Depois as células foram mantidas em PBS e armazenadas a 4° C por 24 horas (Cianciarullo *et al.*, 2007).

3.3.2 – Preparo das imunofluorescências

Para todas as linhagens celulares foi utilizado o protocolo descrito por Cianciarullo *et al.* (2007). Brevemente, depois de fixadas, as células foram incubadas em 50µL de PBS contendo 1% de albumina bovina (BSA), durante 5 minutos, em câmara úmida. A seguir, as células foram incubadas com os anticorpos primários (anti-E6 e anti-E7, Oncogene; anti-citocromo c, Molecular Probes; anti-transferrina, anti-receptor de transferrina e anti- ferritina, Dako), diluídos 50 a 100 vezes, conforme as instruções dos fornecedores, em PBS contendo 0,01% de Tween 20 e 0,5% BSA, durante 2 horas, em câmara úmida, a temperatura ambiente. As células aderidas em lamínulas foram lavadas três vezes em PBS, durante 10 minutos. cada, seguida da incubação com os respectivos anticorpos secundários, complexados com fluorocromos (AlexaFluor 488, 546, 633, Molecular Probes; FITC, BD), diluídos 75 a 1000 vezes, conforme as instruções dos fornecedores, em PBS contendo 0,01% de Tween 20 e 1,5% BSA, durante 1 hora, em câmara úmida, a temperatura ambiente. Após três lavagens em PBS, 10 minutos. cada, as lamínulas foram montadas em lâmina com 5µL de Mowiol. As lâminas foram mantidas a 4°C até o momento da análise em microscópio confocal de varredura a laser Zeiss LSM 510 Meta.

3.4 – Isolamento da Fração Mitocondrial

O isolamento mitocondrial nas células HeLa foi realizado de acordo com o protocolo adaptado de Kowaltowski *et al.* (1996) e descrito a seguir. Todas as etapas do protocolo foram realizadas em câmara fria ou no gelo, sendo as centrifugações a 4°C. Depois de atingirem confluência de aproximadamente 80% as células foram coletadas por tripsinização e em seguida centrifugadas de 800 a 1000 rpm por 5 minutos. Após a centrifugação o pellet foi lavado com tampão MSHE (0,21 M mannitol, 70 mM sacarose, 10mM Hepes, 1mM EGTA, 2mM EDTA, 0,15 mM espermina, 0,75 mM espermidina – pH 7,4) foi adicionado ao tampão no momento do uso 5mM de DTT e 1x coquetel inibidor de protease.

Depois o pellet foi ressuscitado em um volume suficiente dependendo do tamanho do pellet, e então pequenas alíquotas (cerca de 10µL) de uma solução de 5% de digitonina em DMSO foram acrescentadas. Após cada adição foi realizada a verificação da permeabilização celular com azul de Trypan, a solução de digitonina foi adicionada até que cerca de 90-95% das células estejam permeabilizadas.

A suspensão celular foi transferida para um homogeneizador tipo Potter. Essa suspensão foi transferida para um tubo e em seguida houve a centrifugação a 700 xg por 12 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi transferido cuidadosamente para outro tubo. Para aumentar o rendimento este último passo foi repetido. O sobrenadante do passo anterior foi combinado com o obtido na última etapa, a “mistura” foi submetida a centrifugação a 9.000 xg por 10 minutos. O pellet foi ressuscitado em 0,5 mL de uma solução num volume de 1:1 de Percoll e 2xMSHE. Essa suspensão foi adicionada ao topo do Percoll: 2xMSHE em um tubo de ultracentrifugação. As amostras foram então submetidas a centrifugação de 50.000 xg por 10 minutos. A banda mitocondrial localizada na metade do tubo foi retirada e transferida para outro tubo no qual foi acrescentado cerca de 10mL de MSHE seguido de centrifugação a 5.000 xg para a remoção do Percoll. Por último o sobrenadante foi removido e as mitocôndrias foram utilizadas para os devidos fins do presente estudo.

3.5 – Ensaios de Imunocitoquímica ultraestrutural

Inicialmente foi feito o isolamento das mitocôndrias de acordo com a metodologia descrita anteriormente, das células da linhagem celular HeLa. Em seguida, foi adotado o protocolo de Cianciarullo *et al.* (2007), no qual as mitocôndrias foram fixadas em Paraformaldeído (PFA) a 2% diluído em PBS pH 7,2, contendo 5% de sacarose, por uma hora a temperatura ambiente. Depois foram feitas duas lavagens de 10 minutos cada em PBS com 5% de sacarose, para a remoção do fixador. Na próxima etapa, as mitocôndrias foram aderidas sobre grades metálicas de níquel revestidas com filme plástico de parlódio a 2% em acetato de amila e carbono. Foram adicionadas às grades aproximadamente 10 μ L da suspensão mitocondrial e mantidas por 10 minutos, com remoção do excesso com papel filtro.

Em seguida foi realizada a incubação com os anticorpos primários anti-E6 na concentração de 5 μ g/mL, anti-E7 na concentração de 2,5 μ g/mL e anti-citocromo c na concentração de 1:100 diluídos em PBS+BSA a 1,5% + Tween 20 a 0,05%, durante 2 horas em câmara úmida a temperatura ambiente. Passado o tempo de incubação foram feitas as lavagens com PBS+BSA 1%, por quatro vezes, 10 minutos cada.

Após as lavagens, foi realizada a incubação com o anticorpo secundário anti-mouse IgG complexado com partículas de ouro coloidal de 5 nm e anti-goat IgG complexado com partículas de ouro coloidal de 10nm, na concentração de 1:100 diluído em PBS+BSA a 0,5%+Tween 20 a 0,05%, durante 30 minutos em câmara úmida, a temperatura ambiente. Passado o tempo de incubação foi realizada uma lavagem de 10 minutos com PBS+BSA 1%, posteriormente três lavagens em NaCl 0,85%, 10 minutos cada, seguida de uma última lavagem com jato de água bidestilada.

Após a remoção do excesso de água das grades com papel de filtro, as preparações foram mantidas até o dia seguinte a temperatura ambiente para secar, para exame em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109, operado a 80 kV.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os HPVs são pequenos vírus de DNA que infectam os queratinócitos estratificados para replicação viral, induzindo a transformação e imortalização celular. Um sub-conjunto de tipos de HPVs infectam o epitélio no trato genital e são os agentes causadores dos cânceres cervical e anogenital (Beglin *et al.*, 2009).

Os parceiros sexuais estão altamente comprometidos com a infecção e transmissão do HPV, à semelhança do que ocorre com o HIV. Sendo assim, a doença deve ser considerada um grave problema de saúde pública. Por tal motivo, essa infecção foi o objeto de estudo do presente trabalho.

4.1 – *Cultivo, transfecção celular e ensaios de imunofluorescência*

As células cultivadas nesse estudo, de acordo com o descrito no item 3.1, atingiram a confluência de 80% em torno de 15 dias de cultivo, sendo que a linhagem 293-T em alguns momentos demorou um período um pouco maior para atingir a confluência necessária para a realização dos demais ensaios.

Os anticorpos utilizados nesse estudo reconheceram as oncoproteínas virais E6 e E7 expressas em células transformadas por HPV, ou HPV-positivas, pertencentes às seguintes linhagens: HeLa (Figuras 16, 18 e 19) transformada por HPV tipo 18 e SiHa (Figura 17) e CaSki (Figuras 21 e 22) transformadas por HPV do tipo 16, sendo ambos os tipos de HPVs classificados como de alto risco. As células HPV-negativas transfectadas com os vetores de expressão pLXSN, contendo os genes E6 e E7 completos, pertencentes à linhagem 293-T (Figuras 15 e 20), expressaram as proteínas E6 e E7 no núcleo celular e no citoplasma, sendo que apenas a E6 aparentemente co-localizou com as mitocôndrias. Este fato nos levou a investigar outras proteínas mitocondriais e a literatura científica em busca de confirmação.

Observamos a transferrina (Tf) em abundância na membrana plasmática das células e também no citoplasma em menor quantidade (Figura 16). De acordo com Viac *et al.* (1987), isso ocorre pois o DNA viral pode desempenhar um papel de estimulação nas células basais, aumentando o número de receptor de transferrina, sugerindo a sua utilização na infecção por HPV. Szulczewski *et al.* (2009, 2010) demonstraram que ocorre co-localização entre VLPs (*virus like particles*) e receptores de transferrina e de ferritina em aproximadamente 50% das células que foram analisadas no estudo. Isso sugere que VLPs de HPV16 podem penetrar nas células

pela via endocítica do ferro, dependente de clatrina. O ferro foi demonstrado com abundância no citoplasma das células transformadas e transfectadas pelo HPV (Figuras 15,17, 19 e 20), o que confirma que o HPV pode utilizar a via endocítica do ferro para entrar na célula hospedeira. O citocromo c foi observado preferencialmente localizado nas mitocôndrias (Figura 15), apresentando co-localização com a oncoproteína E6 (Figura 18). A grande quantidade de ferro sugere também sua participação na transformação de células por HPV, mantendo os níveis de citocromo c mitocondrial.

Verificamos na literatura científica que as proteínas E1^E4 também são detectadas em associação com mitocôndrias em queratinócitos epiteliais infectados por HPV16 (Raj *et al.*, 2004), após a ligação com a rede de citoqueratina e o colapso da mesma. De acordo com diversos autores, as proteínas E6 e E7 possuem reconhecidamente o potencial oncogênico, embora faltem detalhes explicativos sobre os mecanismos de ação. Elas alteram a atividade dos supressores tumorais p53 e pRb respectivamente. Para Wang *et al.* (2010), E6 está associada com a proteína ubiquitina-ligase, formando o complexo E6AP que suprime a atividade de p53 e, conseqüentemente, se inicia o desenvolvimento do tumor. No entanto, a expressão de E6 e E7 isoladas do genoma viral não é suficiente para a carcinogênese. É necessária também a ocorrência de diversos eventos moleculares (Minaguchi & Yoshikawa, 2010). Além disso, as oncoproteínas também se associam com algumas proteínas do domínio PDZ, fato que correlaciona com o potencial oncogênico (Mantovani *et al.*, 2001; Töpffer *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2006). De acordo com Yugawa *et al.* (2009), a oncoproteína E6 ativa a telomerase e em cooperação com E7 faz a efetivação da imortalização das células do epitélio primário, impedindo que ocorra a apoptose. A ativação da telomerase tem sido comumente observada em células carcinogênicas humanas, junto com a inativação das vias de p53 e pRB (Kiyono *et al.* 1998; Haga *et al.* 2007; Artandi & DePinho, 2010). Para que ocorra a imortalização celular por HPV, E7 tem que inativar a via de pRB e E6 induzir a expressão de hTERT, ativando a telomerase (Xu *et al.*, 2008).

E6 também apresenta diferenças nos HPVs de alto e de baixo risco, nos primeiros, a oncoproteína apresenta grande afinidade com AP formando o complexo E6AP, tendo assim alta habilidade para degradar o supressor tumoral p53; além disso, apresenta ligação com o domínio PDZ, o que não ocorre com a proteína E6 dos HPVs de baixo risco (Doobar, 2006). Estas informações, juntamente com a constatação de que E6 degrada Bak, um fator apoptogênico mitocondrial desencadeador de mudanças

conformacionais, que induzem a formação de poros na membrana mitocondrial, fazendo com que E6 proteja os queratinócitos da apoptose (Simmonds *et al.*, 2008; Underbrink *et al.*, 2008), nos levaram a aprofundar as pesquisas focalizadas nas mitocôndrias.

4.2 – Isolamento das mitocôndrias e ensaios de imunocitoquímica ultraestrutural

Para responder nossas dúvidas com relação à localização mais precisa de E6 nas mitocôndrias, optamos por realizar o fracionamento celular e isolar a fração mitocondrial das células das linhagens HeLa e 293-T, para análises em microscopia eletrônica de transmissão.

Amostras destas linhagens celulares foram processadas de acordo com protocolo convencional de processamento de células para microscopia eletrônica de transmissão. Assim foi possível visualizar as diferenças mais marcantes entre uma célula epitelial tumoral transformada por HPV e uma célula epitelial normal. Em HeLa observamos que no núcleo a cromatina é menos densa, a eucromatina, com pouca heterocromatina (Figura 23a), demonstrando sua alta atividade de transcrição, o que é comum em células cancerígenas. Em 293-T, há mais regiões heterocromáticas de DNA nuclear, embora a eucromatina abundante demonstre a atividade celular (Figura 23b). Visualizamos também grande quantidade de mitocôndrias, bastante abundantes na Figura 23b.

Os ensaios de isolamento mitocondrial foram feitos somente com as células da linhagem celular HeLa devido a falta de tempo hábil para a realização do protocolo com as demais linhagens celulares utilizadas nesse estudo, pois para a execução da metodologia é necessário uma imensa quantidade de células, em torno de 10^{10} para que haja um bom rendimento de fração mitocondrial. Nós realizamos ensaios de imunocitoquímica ultraestrutural de acordo com o protocolo descrito no item 3.5, na fração mitocondrial obtida a partir da metodologia descrita no item 3.4, na intenção de visualizar a localização das oncoproteínas E6 e E7 em células transformadas por HPVs de alto risco. Como controle positivo, utilizamos a proteína mitocondrial citocromo *c*, abundante em mitocôndrias, e também um ensaio controle negativo, com a omissão do anticorpo anti-E6, no qual não ocorreu imunomarcação (Figura 24). Nessas mitocôndrias encontramos uma grande quantidade de proteína E6 associada com o anticorpo primário anti-E6, visualizado através das partículas de ouro coloidal de 10

nm. Quando estas partículas se encontram na superfície, apresentam elevada eletrondensidade, sendo visualizadas em preto intenso. Podemos observar que a oncoproteína E6 está localizada no interior das mitocôndrias, na face externa da membrana interna e das cristas mitocondriais, não sendo observadas marcações na matriz da organela (Figura 25). O ouro aparece sem a intensidade esperada, por estar encoberto pela membrana mitocondrial externa. Este dado sobre a localização precisa de E6 ainda não havia sido demonstrado em nenhum outro estudo, até o presente momento. O citocromo *c* associado com o anticorpo primário anti-citocromo *c*, visualizado com ouro coloidal 10 nm, também foi observado em uma quantidade considerável localizada dentro das mitocôndrias, confirmando que realmente o que estávamos visualizando ao microscópio eletrônico era a organela esperada. E a oncoproteína E7 associada com o anticorpo primário anti-E7, marcado com ouro coloidal 10 nm, também pode ser visualizada em pequenas quantidades, mas nunca no interior das mitocôndrias, ela foi observada externamente, ao redor das mesmas (dados não mostrados).

Realizamos também duplas marcações com anti-E6, dessa vez marcado com ouro coloidal 5 nm e anti-citocromo *c* marcado com ouro coloidal 10nm. Nesse ensaio observamos as duas proteínas localizadas dentro das mitocôndrias (dados não mostrados).

Um primeiro estágio na carcinogênese inclui a formação do complexo entre a proteína viral E6 e uma E3 ubiquitina ligase humana. Este complexo é competente para causar a degradação e inativação de diversas proteínas alvo, incluindo as supressoras de tumor, que contribui para a hiperproliferação de células infectadas (Liu & Baleja, 2009). O gene *E6* é considerado a chave para manter a viabilidade de células cancerosas HPV-positivas, definindo essa oncoproteína como alvo de intervenções terapêuticas (Vogh,2006; Griffin *et al.*, 2006). Conforme mencionado anteriormente, a proteína E6 degrada Bak, um fator apoptogênico mitocondrial desencadeador de mudanças conformacionais, que induzem a formação de poros na membrana mitocondrial. Assim, E6 estaria protegendo os queratinócitos da apoptose (Simmonds *et al.*, 2008; Underbrink *et al.*, 2008).

A oncoproteína E7 apresenta três diferentes isoformas, com pesos moleculares e localização celular distintas. A localização em compartimentos celulares distintos, talvez seja importante para a interação de E7 com as proteínas alvo e a transformação celular (Valdovinos-Torres *et al.*, 2008). Portanto, com base nas observações dos

autores citados e nos resultados obtidos no presente estudo, entendemos que a oncoproteína E6 pode representar um alvo terapêutico mais promissor do que a oncoproteína E7, sendo que esta apresenta isoformas distintas, que atuam em compartimentos celulares distintos, enquanto que E6 é uma oncoproteína multifuncional na carcinogênese, com isoforma E6 (large) e E*, ambas modulando o nível e a atividade da pró-caspase 8, em direções opostas. Sendo a pró-caspase 8 o mediador chave da via apoptótica, a localização de E6 em mitocôndrias, conforme apresentado neste estudo (Figuras 15, 18 e 25), confirma as evidências de que a morte celular programada tem seu início com a permeabilização da membrana mitocondrial e a liberação de citocromo c para o citoplasma, fato que não ocorre em células tumorais, devido à ação anti-apoptótica de E6, que bloqueia a permeabilidade da membrana mitocondrial, similar a uma barreira de proteção que circunda toda a extensão da membrana interna e cristas mitocondriais, sem interferir com o metabolismo energético e a produção de ATP, imortalizando as células do epitélio estratificado, fato que induz à carcinogênese e aos cânceres cervical e anogenital.

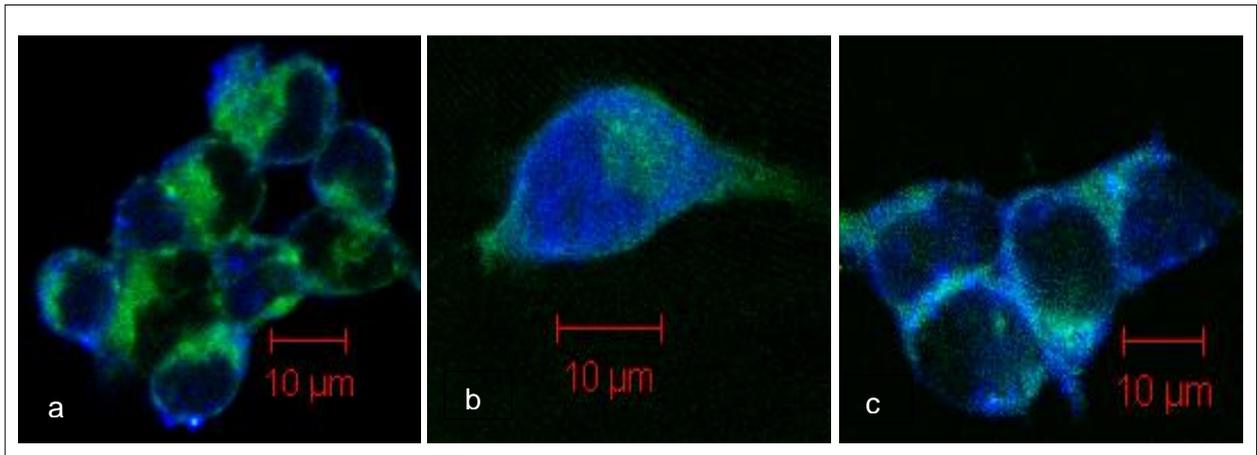


Figura 15 - Linhagem celular 293-T transfectadas com o vetor pLXSN E6 e E7 – (a) Anti-E7 azul e anti-citocromo c verde; (b) anti-E6 azul e mitocôndrias detectadas por *Mitotracker Orange* verde e (c) anti-ferritina azul e anti-E7 verde.

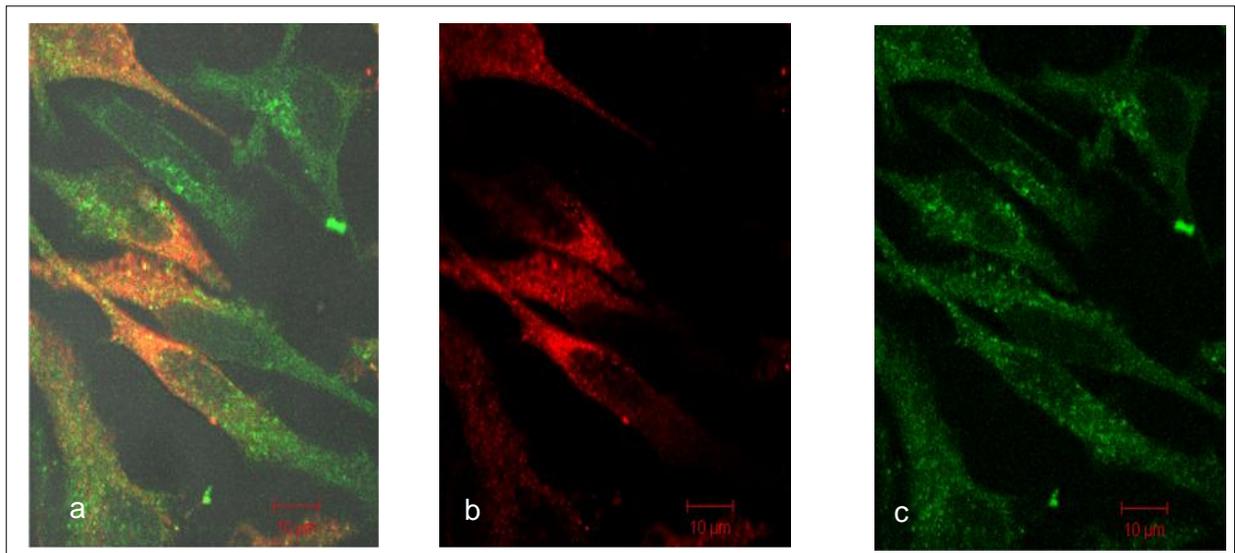


Figura 16 - Linhagem celular HeLa (a) sobreposição das imagens verde anti-E6 revelado por FITC 488 e vermelho anti-transferrina revelado por AlexaFluor 555; (b) anti-transferrina e (c) anti-E6. Barra = 10µm

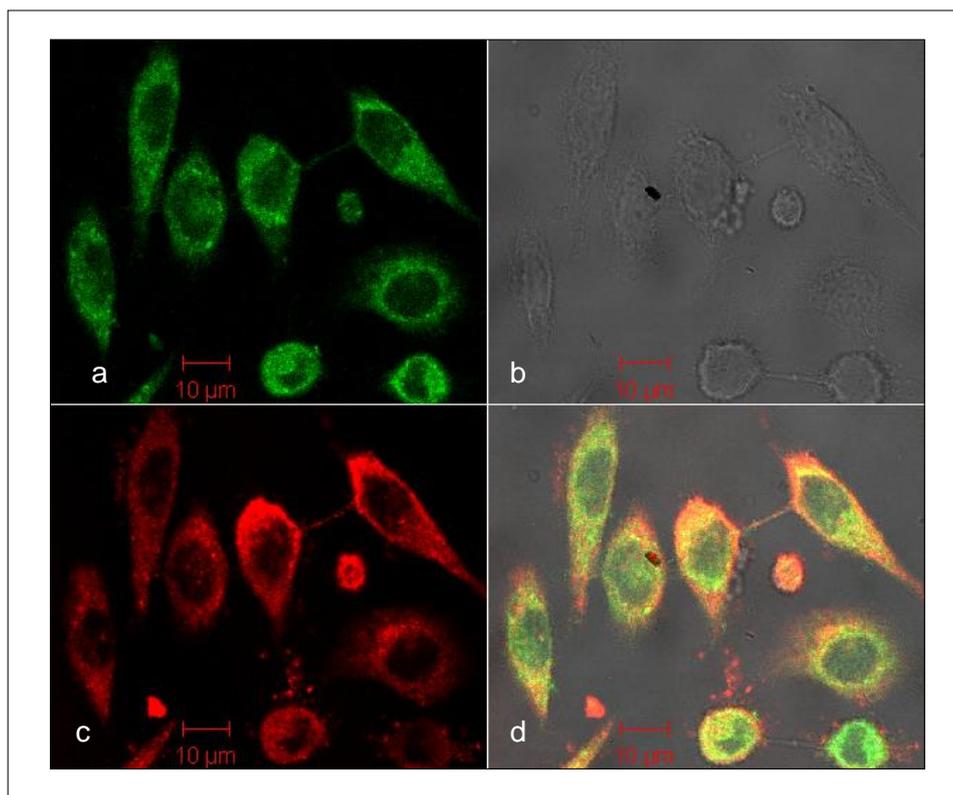


Figura 17 - Linhagem celular SiHa – (a) Anti-E7 ; (b) luz transmitida; (c) anti-ferritina (d) sobreposição das imagens verde anti-E7 revelado pelo fluorocromo FITC 488 e vermelho anti-ferritina revelada pelo fluorocromo AlexaFlour 555. Barra = 10µm

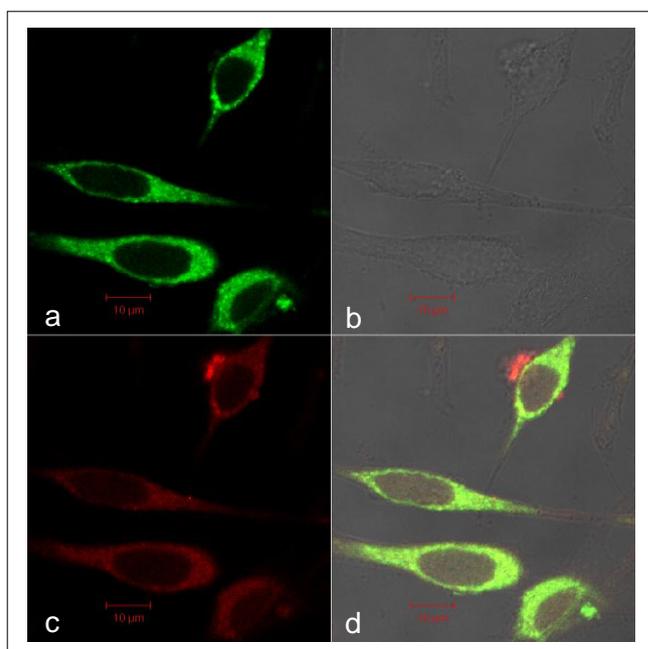


Figura 18 - Linhagem celular HeLa – (a) Anti- E6; (b) luz transmitida; (c) anti-citocromo c e (d) sobreposição das imagens verde anti-E6 revelado pelo flourocromo FITC 488 e vermelho anti-citocromo c revelado pelo flourocromo AlexaFlour 568. Barra = 10µm

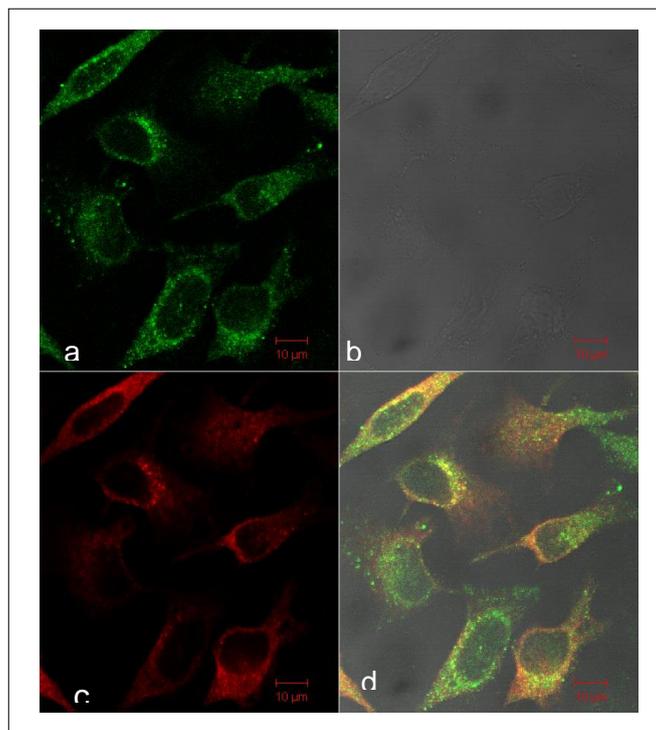


Figura 19 - Linhagem celular HeLa – (a) anti- E6; (b) luz transmitida; (c) anti-ferritina e (d) sobreposição das imagens verde anti-E6 revelado pelo flourocromo FITC 488 e vermelho anti-ferritina revelada pelo fluorocromo AlexaFlour 555. Barra = 10 μ m

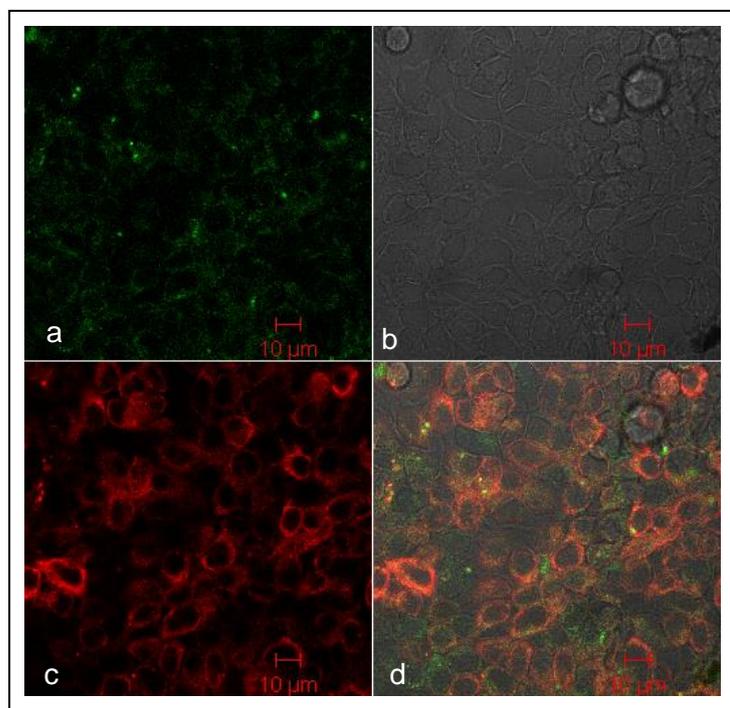


Figura 20 - Linhagem celular 293-T transfectadas com o vetor pLXSN E6 – (a) Anti-E6; (b) luz transmitida (c) anti-ferritina e (d) sobreposição das imagens verde anti-E6 revelado pelo flourocromo FITC 488 e vermelho anti-ferritina revelado pelo flourocromo 555. Barra = 10 μ m

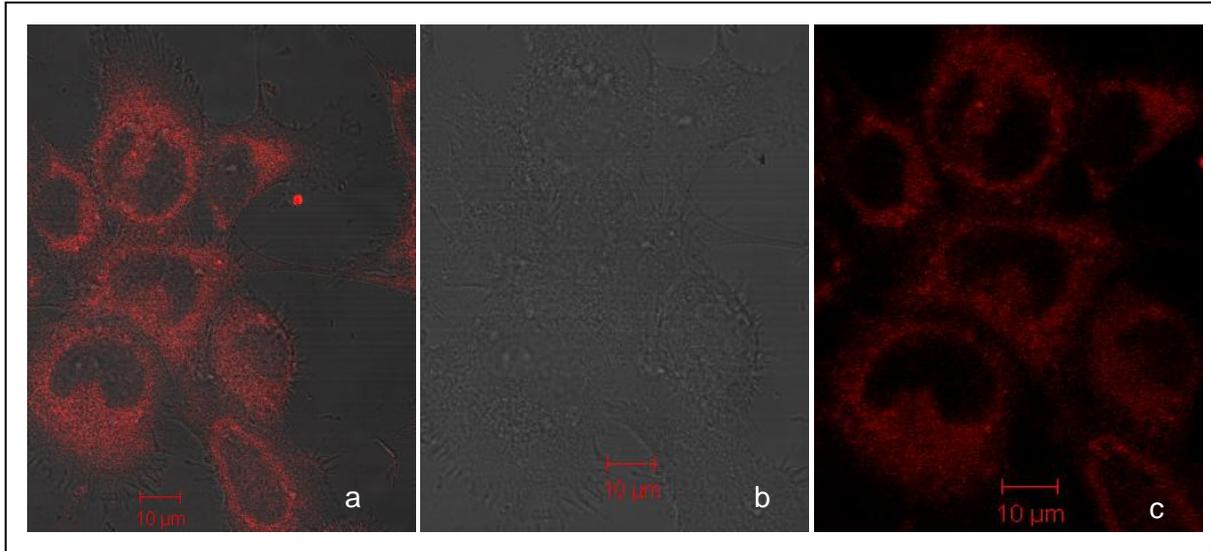


Figura 21 - Linhagem celular CaSki – (a) sobreposição das imagens (b) luz transmitida; (c) anti-citocromo c revelado pelo fluorocromo ALEXAFlour 568. Barra = 10µm

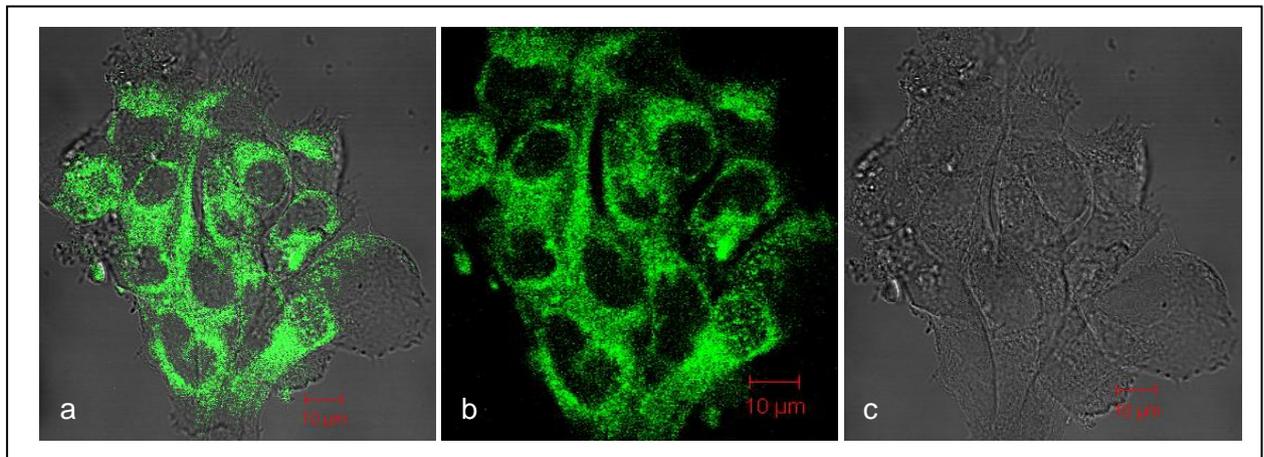


Figura 22 - Linhagem celular CaSki – (a) sobreposição das imagens (b) anti-E6 revelado pelo fluorocromo FITC 488; (c) luz transmitida. Barra = 10µm

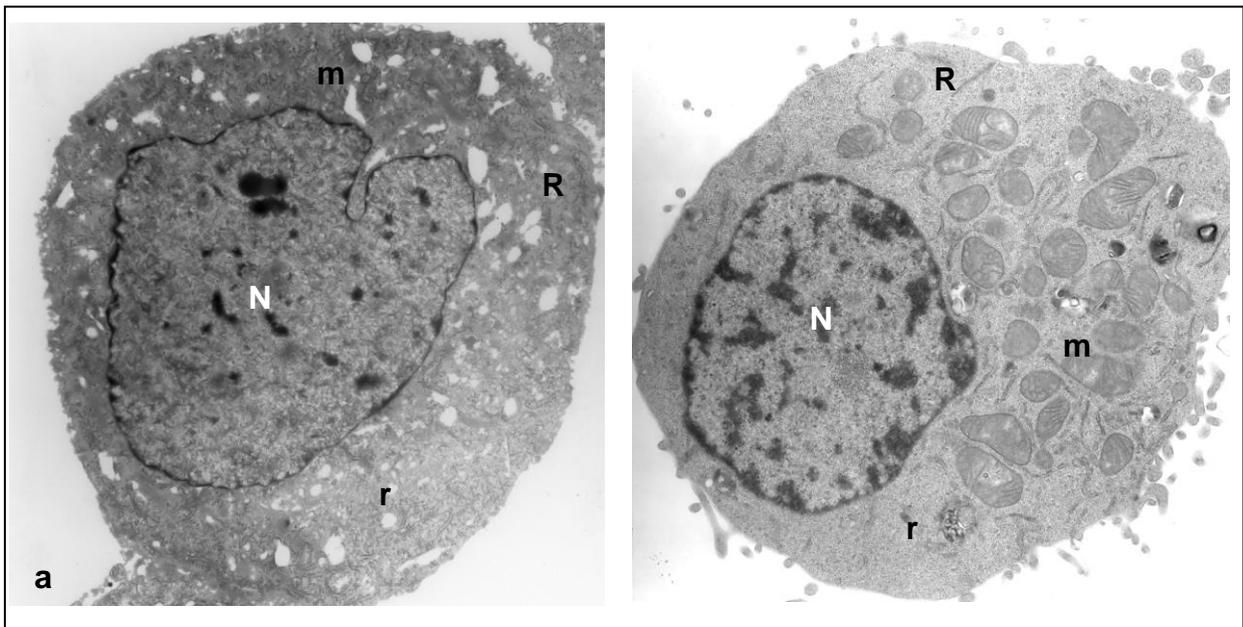


Figura 23 – Cortes ultrafinos de células HeLa (a) e 283-T (b), processadas de acordo com protocolo convencional para microscopia eletrônica de transmissão. N – núcleo; R – retículo endoplasmático; m – mitocôndria; r - ribossomos. Aumento original = 4.000x

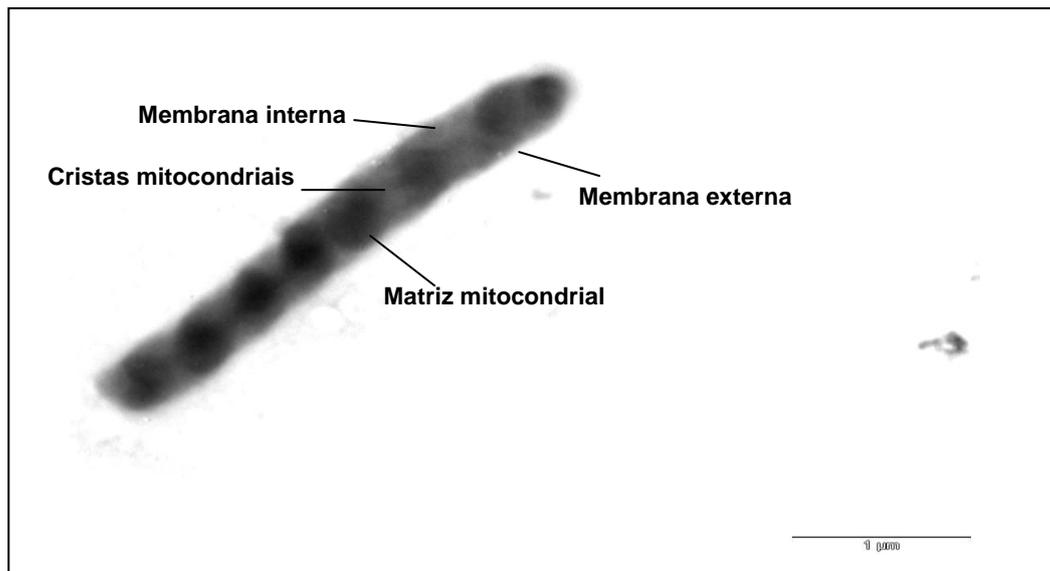


Figura 24 – Mitocôndria isolada de células HeLa, linhagem HPV positiva. Ensaio controle da imunomarcagem, com omissão do anticorpo primário. Não são visualizadas as partículas de ouro coloidal na mitocôndria. As regiões eletrondensas correspondem à matriz mitocondrial e as mais eletronucentes correspondem às membranas externa, interna e cristas mitocondriais. Barra = 1μm

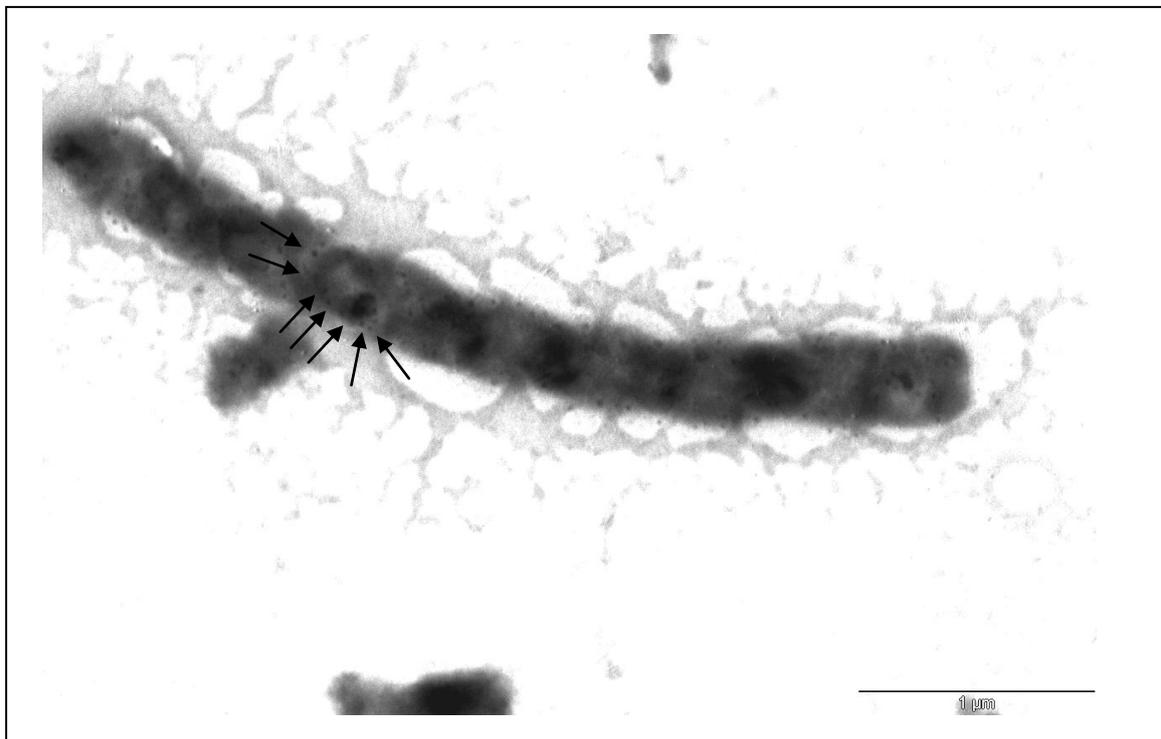


Figura 25 – Imunomarcção de mitocôndria isolada de células HeLa, linhagem HPV positiva. A oncoproteína E6 foi marcada com o anticorpo primário monoclonal anti-E6 e anticorpo secundário anti-mouse IgG complexado com ouro coloidal de 10 nm. É possível visualizar as partículas de ouro (setas) circundando a membrana mitocondrial interna e as cristas, formando uma barreira de proteção contra a permeabilização da mesma, sem interferir com as demais funções mitocondriais – metabolismo energético e síntese de ATP. Não são visualizadas marcações na matriz mitocondrial. Barra = 1μm

5- CONCLUSÃO

A cadeia respiratória mitocondrial parece atuar como moduladora da apoptose, numa maneira dependente do contexto, mas independente da produção de ATP, e as respostas apoptóticas são o resultado da interação entre o estado da função mitocondrial e as condições do ambiente celular.

Concluimos na primeira fase deste estudo que a elevada concentração de ferro intracelular pode estar relacionada com a transformação celular por HPV, mantendo os níveis de citocromo *c* mitocondrial.

A co-localização entre E6 e mitocôndrias nas células transformadas por HPV apontam um envolvimento na inibição do processo de apoptose, tornando a proteína E6 um promissor alvo terapêutico.

Nossos resultados estão em concordância com os dados de que a proteína E6 degrada Bak, um fator mitocondrial apoptogênico, cuja função é induzir mudanças conformacionais formadoras de poros na membrana mitocondrial, através dos quais ocorre a liberação de citocromo *c* para o citoplasma, desencadeando a morte celular.

Desta forma, E6 estaria protegendo os queratinócitos da apoptose, mantendo a malignidade tumoral. Os dados indicam que E6 atua como fator anti-apoptogênico e deveria ser explorado como estratégia terapêutica no desenvolvimento de vacinas contra o câncer cervical e anogenital, considerando que E6 é uma oncoproteína multifuncional na carcinogênese, com apenas uma isoforma e ambas de ação moduladora do nível e da atividade da pró-caspase 8, a molécula mediadora chave para a apoptose.

Este estudo mostra pela primeira vez a presença de E6 no interior da mitocôndria, envolvendo a membrana interna e cristas mitocondriais, através de imunomarcações por fluorescência e ultraestruturais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aires KA, Cianciarullo AM, Carneiro SM, Villa LL, Boccardo E, Pérez-Martinez G, Pérez-Arellano I, Oliveira MLS, Ho PL (2006) Production of HPV-16 L1 Virus-Like Particles by recombinant *Lactobacillus casei* **Appl Environ Microbiol** 72: 745-752.
- Alvarez-Salas LM, Arpawong TE, DiPaolo JA (1999) Growth inhibition of cervical tumor cells by antisense oligodeoxynucleotides directed to the human papillomavirus type 16 E6 gene. **Antisense Nucleic Acid Drug** 9(5):441-450.
- Andrade FB, Kavati EA, Valadão TM, Armbruster-Moraes E, Cianciarullo AM (2010) Cellular targets of HPV16 E6 and E7 oncoproteins in cervical cancer. **Acta Microsc** 19 (Supp A), on-line: <http://actamicroscopica.ivic.ve>
- Andrade FB, Kavati EA, Armbruster-Moraes E, Cianciarullo AM (2009) Cellular targets of HPV16 E6 and E7 oncoproteins in cervical cancer. **Mem Inst Butantan** 66, on-line: <http://www.butantan.gov.br>
- Armbruster-Moraes E, Ioshimoto LM, Leao E, Zugaib M. (2000) Prevalence of 'high risk' human papillomavirus in the lower genital tract of Brazilian gravidas. **Int J Gynaecol Obstet.** 69(3):223-227.
- Armbruster-Moraes E, Ioshimoto LM, Leão E, Zugaib M (1994) Presence of Human Papillomavirus in Amniotic Fluids of Pregnant Women with Cervical Lesions. **Gynecol Oncol** 54: 152-158.
- Artandi SE, DePinho RA (2010) Telomeres and telomerase in cancer. **Carcinogenesis** 31:9-18.
- Band V, De Caprio JA, Delmolono L, Kulesa V, Sager R (1991) Loss of p53 protein in human papillomavirus type 16 E6 immortalized human mammary epithelial cells. **J Virol**, 65(12):6671-6676.
- Bazan SB, Aires KA, Chaves AAM, Cianciarullo AM, Garcea RL, Ho PL (2009) Expression and characterization of HPV16 L1 capsid protein in *Pichia pastoris*. **Arch Virol** 154:1609-1617.
- Beglin M, Melar-New M, Laimins L (2009) Human Papillomaviruses and the interferon response. **J Interf Cytok Res** 29(9):629-635.
- Bezerra ALR, Lopes A, Santiago GH, Ribeiro KCB, Latorre MRDO, Villa LL (2001) Human papillomavirus as a prognostic factor in carcinoma of the penis: analysis of 82 patients with amputation and bilateral lymphadenectomy. **Am Cancer Soc** 91:2315-2321.
- Bosch FX, Rohan T, Schneider A, Frazer I, Pfister H, Castellsagué X, de Sanjosé S, Moreno V, Puig-Tintore LM, Smith PG, Muñoz N, zur Hausen H. (2001) Papillomavirus research update: highlights of the Barcelona HPV 2000 international papillomavirus conference. **J Clin Pathol** 54(3):163-75.
- Burkhardt A, Willingham M, Gay C, Jeang KT, Schlegel R (1989) The E5 oncoprotein of bovine papillomavirus is oriented asymmetrically in Golgi and plasma membranes. **Virology** 170:334-339.

Butz K, Ristriani T, Hengstermann A, Denk C, Scheffner M, Hoppe-Seyler F (2003) siRNA targeting of the viral E6 oncogene efficiently kills human papillomavirus-positive cancer cells. **Oncogene** 22 (38):5938-5945.

Carter JJ, Wipf GC, Benki SF, Christensen ND, Galloway DA (2003) Identification of a human papillomavirus type 16-specific epitope on the C-terminal arm of the major capsid protein L1. **J Virol** 77(21):11625-11632.

Casini GL, Graham D, Heine D, Garcea RL, Wu DT (2004) In vitro papillomavirus capsid assembly analyzed by light scattering **Virology**. 325(2):320-327.

Chang F (1990) Role of papillomaviruses. **J Clin Pathol** 43:269-276.

Chen EY, Howley PM, Levinson AD, Seeburg PH (1982) The primary structure and genetic organization of bovine papillomavirus type 1 genome. **Nature** 299(5883):529-534.

Christensen ND, Cladel NM, Reed CA, Budgeon LR, Embers ME, Skulsky DM, McClements WL, Ludmerer SW, Jansen KU (2001) Hybrid papillomavirus L1 molecules assemble into virus-like particles that reconstitute conformational epitopes and induce neutralizing antibodies to distinct HPV types. **Virology** 291:324-334.

Christensen ND, Reed CA, Cladel NM, Han R, Kreider JW (1996) Immunization with viruslike particles induces long-term protection of rabbits against challenge with cottontail rabbit Papillomavirus **J Virol** 70(2):960-965.

Christensen ND, Kirnbauer R, Schiller JT, Ghim SJ, Schlegel R, Jenson AB, Kreider JW (1994) Human papillomavirus types 6 and 11 have antigenically distinct strongly immunogenic conformationally dependent neutralizing epitopes **Virology** 205(1):329-35.

Cianciarullo AM, Szulczewski V, Chaves AAM, Ho PL, Müller M, Armbruster-Moraes E (2010) HPV 16 L1L2 gene expressions, protein synthesis and interaction in human cell culture. **Acta Microsc** 19 Supp A, on-line: <http://actamicroscopica.ivic.ve>

Cianciarullo AM, Szulczewski V, Aires KA, Bazan SB, Ho PL, Boccardo E, Villa LL, Müller M, Armbruster-Moraes E (2007) Production of HPV 16 L1 VLP in human cell culture for basic studies anogenital cancer. **Appl Cancer Res** 27:81-82.

Cianciarullo AM, Bertho AL, Soares MJ, Hosoda TM, Nogueira-Silva S, Beçak W (2003a) Haemoglobin biosynthesis site in rabbit embryos erythroid cells. **Cell Biol Int** 27:747-753.

Cianciarullo AM, Pelajo-Machado M, Spring H, Beçak W, Trendelenburg MF (2003b) Steps in the cellular iron endocytic pathway and the heme synthesis in vertebrates. **Acta Microsc** 12:403-404. on-line: <http://actamicroscopica.ivic.ve>

Cianciarullo AM, Beçak W, Soares MJ (1999) Immunocytochemical mapping of the hemoglobin biosynthesis site in amphibian erythroid cells. **Tissue Cell** 31:342-348.

Cid-Arregui A, Juárez V, zur Hausen H (2003) A synthetic E7 gene of human papillomavirus type 16 that yields enhanced expression of the protein in mammalian cells and is useful for DNA immunization studies **J Virol** 77:4928-4937.

Cheah PL, Looi LM (1990) Biology and pathological associations of human papillomaviruses: a review. **Malaysian J Pathol** 20:1-10.

- Chen EY, Howley PM, Levinson AD, Seeburg PH (1982) The primary structure and genetic organization of bovine papillomavirus type 1 genome. **Nature** 299:529-534.
- Cho NH, Kim YT, Kim JW (2002) Alteration of cell cycle in cervical tumor associated with human papillomavirus: cyclin-dependent kinase inhibitors. **Yonsei Med J** 43:722-728.
- Daniel NN, Korsmeyer SJ (2004) Cell death: critical control points **Cell** 116:205-219.
- Da Silva DM, Velders MP, Nieland JD, Schiller JT, Nickoloff BJ, Kast WM (2001) Physical interaction of human papillomavirus virus-like particles with immune cells. **Int Immunol** 13:633-641.
- Day PM, Lowy DR, Schiller JT (2003) Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. **Virology** 307: 1-11.
- De Villiers EM, Gunst K, Stein H, Scherübl H (2004) Esophageal squamous cell cancer in patients with head and neck cancer: Prevalence of human papillomavirus DNA sequences **Int J Cancer** 109:253-258.
- Dell G, Gaston K (2001) Human papillomaviruses and their role in cervical cancer. **Cell Mol Life Sci** 58:1923-1942.
- Demers GW, Espling E, Harry JB, Etschid BG, Galloway DA (1996) Abrogation of growth arrest signals by human papillomavirus type 16 E7 is mediated by sequences required for transformation. **J Virol** 70:6862-6869.
- Desaintes C, Dmeret C, Goyat S, Yaniv M, Thierry F (1997) Expression of the papillomavirus E2 protein in HeLa cells leads to apoptosis. **EMBO J** 16:504-514.
- Doorbar J (2006) Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clin Sci** 110:525-541.
- Doorbar J (2005) The papillomavirus life cycle. **J Clin Virol** 32S:S7-S15.
- Doyle DA, Lee A, Lewis J, Kim E, Sheng M, MacKinnon R (1996) Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ **Cell** 85:1067-1076.
- Dunne EF, Nielson CM, Stone KM, Markowitz LE, Giuliano AR (2006) Prevalence of HPV infection among men: a systematic review of the literature. **J Infect Dis** 194:1044-1057.
- Flores R, Papenfuss M, Klimecki WT, Giuliano AR (2006) Cross-sectional analysis of oncogenic HPV viral load and cervical intraepithelial neoplasia. **Int J Cancer** 118:1187-1193.
- Frega A, Cenci M, Stentella P, Cipriano L, De Ioris A, Alderisio M, Vecchione A (2003) Human papillomavirus in virgins and behaviour at risk. **Cancer Letters** 194: 21-24.
- Furth PA, Baker CC (1991) An element in the bovine papillomavirus late 3'untranslated region reduces polyadenylated cytoplasmic RNA levels. **J Virol** 65:5806-5812.
- Gardiol D, Kühne C, Glaunsinger B, Lee SS, Javier R, Banks L (1999) Oncogenic Human papillomavirus E6 proteins target the discs large tumour suppressor for proteasome-mediated degradation. **Oncogene** 18:5487-5496.

Gnanamony M, Peedicayil A, Abraham P (2007) An overview of human papillomaviruses and current vaccine strategies. **Indian J Med Microbiol** 25:10-17.

Goodwin EC, DiMaio D. Repression of human papillomavirus oncogenes in HeLa cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2000, 97(23):12513-8.

Green DR (2005) Apoptotic pathways: ten minutes to dead. **Cell** 121:671-674.

Griffin H, Elston R, Jackson D, Ansell K, Coleman M, Winter G, Doorbar J (2006) Inhibition of papillomavirus protein function in cervical cancer cells by intrabody targeting. **J Mol Biol** 355:360-378.

Haga K, Ohno S, Yugawa T (2007) Efficient immortalization of primary cells by p16INK4a specific short hairpin RNA or Bmi-1, combined with introduction of hTERT. **Cancer Sci**. 98:174-154.

Hamada K, Takuwa N, Zhou W, Kumada M, Takuwa Y (1996) Protein kinase C inhibits the CAK-CDK2 cyclin-dependent kinase cascade and G1/S cell cycle progression in human diploid fibroblasts. **Biochim Biophys Acta**. 1310:149-156.

Hebner CM and Laimins LA (2006) Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. **Rev Med Virol** 16:83-97.

Helt AM, Funk JO, Galloway DA (2002) Inactivation of both the retinoblastoma tumor suppressor and p21 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is necessary to inhibit cell cycle arrest in human epithelial cells. **J Virol** 76:10559-10568.

Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, Rajkumar T, Sridhar H, Rose B, Pintos J, Fernandez L, Idris A, Sanchez MJ, Nieto A, Talamini R, Tavani A, Bosch FX, Reidel U, Snijders PJ, Meijer CJ, Viscidi R, Munoz N, Francheschi S (2003) Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. **J Natl Cancer Inst** 95:1772-1783.

Howie HL, Katzenellenbogen RA, Galloway DA (2009) Papillomavirus E6 proteins. **Virology** 384(2):324-334.

Howley PM. Papillomaviridae: The viruses and their replication. In: **Fields Virology**. Fields BN, Knipe DM (eds) Philadelphia, Lippincott-Raven 1996, pp. 2045-2076.

Howley PM, Münger K, Romanczuk H, Scheffner M, Huibregtse JM (1991) Cellular targets of the oncoproteins encoded by the cancer associated human papillomaviruses **Princess Takamatsu Symp** 22:239-248.

Hu J, Cladel NM, Wang Z, Han R, Pickel MD, Cristensen ND (2004) MCSF Enhances protective immunity to cottontail rabbit papillomavirus E8 genetic vaccination in rabbits. **Vaccine** 22:124-130.

Inglis S, Shaw A, Koenig S. (2006) Chapter 11: HPV vaccines: commercial research & development. **Vaccine** 3:S3/99-105.

International Agency For Research on Cancer. Working Group on the evaluation of carcinogenic risks to humans papillomavirus. Lyon, (1995) **IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans** 64.

Karanam B, Gambhira R, Peng S, Jagu S, Kim D-J, Ketner GW, Stern PL, Adams RJ, Roden RBS (2009) Vaccination with HPV16 L2E6E7 fusion protein in GPI-0100 adjuvant elicits protective humoral and cell-mediated immunity. **Vaccine** 27:1040-1049.

Kavati EA, Andrade FB, Leão E, Armbruster-Moraes E, Cianciarullo AM (2009) Interaction of HPV16 L1L2 VLP with stem cells CD34⁺/CD117⁺ of the human amniotic fluid. **Mem Inst Butantan** 66. On-line: <http://www.butantan.gov.br>

Kawana Y, Kawana K, Yosgikawa H, Taketani Y, Yoshiike K, Kanda T (2001) Human papillomavirus type 16 minor capsid protein 12 N-terminal region containing a common neutralization epitope binds to cell surface and enters the cytoplasm. **J Virol** 75:2331-2336.

Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR, Schiller JT (1992) Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. **Proc Natl Acad Sci USA** 89: 12180-12184.

Kiyono T, Foster SA, Koop JI. (1998) Both Rb/ p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. **Nature** 396:84-88.

Kiyono T, Hiraiwa A, Fujita M, Hayashi Y, Akiyama T, Ishibashi M (1997) Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. **Proc Natl Acad Sci USA** 94:11612-11616.

Klingelutz AJ, Foster SA, McDougall JK (1996) Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. **Nature** 380:79-82.

Kuwana T, Newmeyer DD (2003) Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. **Curr Opin Cell Biol** 15:691-699.

Kwong JQ, Henning MS, Starkov AA, Manfredi G. J (2007) The mitochondrial respiratory chain is a modulator of apoptosis. **Cell Biol** 179: 1163-1177.

Leverrier S, Bergamaschi D, Ghali L, Ola A, Warnes G, Akgül B, Blight K, García-Escudero R, Penna A, Eddaoudi A, Storey A (2007) Role of HPV E6 proteins in preventing UVB-induced release of pro-apoptotic factors from the mitochondria. **Apoptosis** 12:549-560.

Liu Y, Cherry JJ, Dineen JV, Androphy EJ, Baleja JD (2009) Determinants of stability for the E6 protein of papillomavirus type 16. **J Mol Biol.** 386(4):1123-1137.

Longworth MS, Laimins LA (2004) Pathogenesis of human papillomavirus in differentiating epithelia. **Microbiol Mol Biol Rev** 68:362-372.

Malanchi I, Caldeira S, Krützfeldt M, Giarre M, Alunni-Fabroni M, Tommasino M (2002) Identification of a novel activity of human papillomavirus type 16 E6 protein in deregulating the G1/S transition. **Oncogene** 21:5665-5672.

Mantovani F, Banks L (2001) The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. **Oncogene** 20:7874-7887.

McMurray HR, Nguyen D, Westbrook TF, Mcance DJ (2001) Biology of human papillomaviruses. **Int J Exp Pathol** 82:15-33.

McLaughlin-Drubin ME, Meyers C (2005) Propagation of infectious, high-risk HPV in organotypic "raft" culture. **Meth Mol Med** 19:171-186.

Mello WA, Villa LL (2005) Investigação de Papilomavírus em Primatas não Humanos do Novo Mundo: Ocorrência e Caracterização Molecular. **Tese Doutor Programa de Pós-Grad Universidade Federal do Pará.** 1-20. 2005.

Nomine Y, Masson M, Charbonnier S, Zanier K, Ristriani T, Deryckere F, Sibler AP, Desplancq D, Atkinson RA, Weiss E, Orfanoudakis G, Kieffer B, Trave G (2006) Structural and functional analysis of E6 oncoprotein: insights in the molecular pathways of human papillomavirus-mediated pathogenesis **Mol Cell**, 21:665-678.

Nonnenmacher B, Breitenbach V, Villa LL, Prola JC, Bozzetti MC (2002) Identificação do papilomavírus humano por biologia molecular em mulheres assintomáticas. **Rev Saúde Pública** 36: 95-100

Ow YLP, Green DR, Hao Z, Mak TW (2008) Cytochrome c: functions beyond respiration. **Nat Rev Mol Cell Biol** 9(7):532-42.

Palumbo ACM, Leão E, Szulczewski V, Andrade FB, Valadão TM, Kavati EA, Armbruster-Moraes E, Cianciarullo AM (2010) HPV16 L1L2 VLP interaction with human amniotic fluid cells. **Acta Microsc** 19 Supp A. On-line: <http://actamicroscopica.ivic.ve>

Park RB and Androphy EJ (2002) Genetic analysis of high-risk E6 in episomal maintenance of human papillomavirus genomes in primary human keratinocytes. **J Virol** 76:11359-11364.

Peng S, Ji H, Trimble C, He L, Tsai YC, Yeatermeyer J, Boyd DA, Hung CF, Wu TC (2004) Development of a DNA vaccine targeting human papillomavirus type 16 oncoprotein E6. **J Virol** 78:8468-8476.

Pfister H., Fuchs P.G. (1994) Anatomy, taxonomy and evolution of papillomaviruses. **Intervirol** 37:143-149.

Rabello-Santos SH, Zeferino L, Villa LL, Sobrinho JP, Amaral RG, Magalhães AV (2003) Human papillomavirus prevalence among women with cervical intraepithelial neoplasia III and invasive cervical cancer from Goiânia, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 98:181-184.

Raj K, Berguerand S, Southern S, Doorbar J, Beard P (2004) E1⁺E4 protein of human papillomavirus type 16 associates with mitochondria. **J Virol** 78(13):7199:7207.

Romanczuk H, Howley PM (1992) Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. **Proc Natl Acad Sci USA** 89:315931-315963.

Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenabeele P (2004) Toxic proteins released from mitochondria in cell death **Oncogene** 23:2861-2874.

Salvia PND, Andrade LALA, Hackel C (2004) Indicadores de doença Residual No Seguimento de Pacientes Conizadas por Lesão Intaepitelial Escamosa de Alto Grau. **Qualif Tese de Doutor** 3-15.

Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM (1990) The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. **Cell** 63:1129-1136.

Schneider-Maunoury S, Croissant O, Orth G (1987) Integration of human papillomavirus type 16 DNA sequence: a possible early event in the progression of genital tumors. **J Virol** 61:3295-3298.

Sieczkarski SB, Whittaker GR (2002) Dissecting virus entry via endocytosis. **J Gen Virol** 83:1535-1545.

Simmonds M, Storey A. (2008) Identification of the regions of the HPV 5 E6 protein involved in Bak degradation and inhibition of apoptosis. **Int J Cancer** 123(10):2260-2266.

Sonnex C (1998) Human papillomavirus infection with particular reference to genital disease. **J Clin Pathol** 51:643-648.

Subramanyam D, Krishna S (2006) c-Myc substitutes for Notch1-CBF1 functions in cooperative transformation with papillomavirus oncogenes **Virology** 347:191-198.

Szulczewski V, Leão E, Borelli P, Beçak W, Müller M, Armbruster-Moraes E, Cianciarullo AM (2010) HPV16 L1L2 VLP interaction with human leukocytes. **Acta Microsc** 19 Supp A. On-line: <http://actamicroscopica.ivic.ve>

Szulczewski V (2009) Estudo *in vitro* sobre a interação celular de papilomavírus humano em leucócitos do sangue periférico. Dissertação de Mestrado. Programa Interunidades em Biotecnologia IPT-USP-IBU, pp. 137. On-line: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/87/87131/tde-19082009-134506/>

Szulczewski V, Palumbo ACM, Leão E, Borelli P, Beçak W, Müller M, Armbruster-Moraes E, Cianciarullo AM (2008a) Estudo *in vitro* sobre a interação celular de papilomavírus humano em leucócitos do sangue periférico. **54º CBG-SBG**, online: <http://web2.sbg.org.br/congress/sbg2008/pdfs/25730.pdf>

Szulczewski V, Palumbo ACM, Aires KA, Bazan SB, Ho PL, Boccardo EM, Villa LL, Armbruster-Moraes E, Cianciarullo AM (2008b). Proc Apoptosis World 2008, 1:113. On-line: http://www.transduction-meeting.lu/pdf/abstract_book/2008.pdf.

Thierry F, Spyrou G, Yaniv M, Howley P (1992) Two AP1 sites binding JunB are essential for human papillomavirus type 18 transcription in keratinocytes. **J Virol** 66:3740-3748.

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

Töpffer S, Müller-Schiffmann A, Matentzoglou K, Scheffner M, Steger G. J (2008) Protein tyrosine phosphatase H1 is a target of the E6 oncoprotein of high-risk genital human papillomaviruses. **Gen Virol** 88, 2956-2965

Tuma PL, Hubbard AL (2003) Transcytosis: crossing cellular barriers. **Physiol Rev** 83:871-932.

Tyring SK (2000) Human papillomavirus infections: epidemiology, pathogenesis, and host immune response. **J Amer Acad Dermatol** 43:S18-26.

Underbrink MP, Howie HL, Bedard KM, Koop JI, Galloway DA (2008) E6 proteins from multiple human betapapillomavirus types degrade Bak and protect keratinocytes from apoptosis after UVB irradiation. **J Virol** 82(21):10408-17.

Unger ER, Franco ED (2001) Human Papillomavirus into the new millennium. **Gynecol Oncol Gen** 28:653-664.

Viac J, Chardonnet Y, Bouvard V, Leval J, Morgon A, Thivolet J (1987) Virus expression. EGF and transferrin receptors in human papillomas. **Virch Arch Pathol Anat Histopathol.** 411:73-77.

Villa LL, Bernard HU, Kast M, Hildesheim A, Amestoy G, Franco EL (2002) Past, present and future of HPV research: highlights from the 19th International Papillomavirus Conference-HPV2001. **Virus Res** 89:163-173.

Vogt M, Butz K, Dymalla S, Semzow J, Hoppe-Seyler F (2006) Inhibition of Bax activity is crucial for the antiapoptotic function of the human papillomavirus E6 oncoprotein **Oncogene** 25:4009-4015.

Wakabayashi MT, Da Silva DM, Potkul RK, Kast WM (2002) Comparison of human papillomavirus type 16 L1 chimeric virus-like particles versus L1/L2 chimeric virus-like particles in tumor prevention. **Intervirol** 45:300-307.

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

Wang H, Mo P, Ren S, Yan C (2010) Activating transcription factor 3 activates p53 by preventing E6-associated protein from binding to E6. **J Biol Chem** [Epub ahead of print].

Wei LH, Kuo ML, Chen CA, Cheng WF, Cheng SP, Hsieh FJ, Hsieh CY (2001) Interleukin-6 in cervical cancer: the relationship with vascular endothelial growth factor **Gynecol Oncol** 82:49-56.

Wilson R, Laimins LA (2005) Differentiation of HPV-containing cells using organotypic "raft" culture or methylcellulose. **Meth Mol Med** 119:157-169.

Xu Y, Zhu KJ, Chen XZ, Zhao KJ, Lu ZM, Cheng H (2008) Mapping of cytotoxic T lymphocytes epitopes in E7 antigen of human papillomavirus type 11. **Arch Dermatol Res** 300(5):235-42

Yamato K, Fen J, Kobuchi H, Nasu Y, Yamada T, Nishihara T, Ikeda Y, Kizaki M, Yoshinouchi M (2006) Induction of cell death in human papillomavirus 18-positive cervical cancer cells by E6 siRNA. **Cancer Gene Ther** 13:234-241.

Yugawa T, Kiyono T (2009) Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins **Rev Med Virol** 19:97-113.

Zhang Y, Dasgupta J, Ma RZ, Banks L, Thomas M, Hen XS (2007) Structures of a Human papillomavirus (HPV) E6 Polypeptide Bound to MAGUK Proteins: Mechanisms of Targeting Tumor Suppressors by a High-Risk HPV Oncoprotein **J Virol** 81:3618-3626.

Zhou J, Sun XY, Louis K, Frazer IH (1994) Interaction of human papillomavirus (HPV) type 16 capsid proteins with HPV DNA requires an intact L2 N-terminal sequence. **J Virol** 68:619-625.

zur Hausen H (2009) Papillomaviruses in the causation of human cancers – a brief historical account. **Virology** 384:260-265.

zur Hausen H (2008) Papillomaviruses-vaccination and beyond. **Biochem (Moscow)** 73:498-503.

zur Hausen H Papillomavirus and cancer: from basic studies to clinical application (2002) **Nat Ver Cancer**, 2: 342-350.

zur Hausen H (1999) Papillomaviruses in human cancers. **Proc. Assoc. Am. Phys** 111:581-587.

zur Hausen H (1996) Papillomaviruses infections - a major cause of human cancers. **Biochem Biophys Act** 1288:55-78.

zur Hausen H (1991) Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. **Virology** 184:9-13.