



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

DAFFANY LUANA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE POLIMORFISMOS DO ONCOGENE E6 DO  
*PAPILOMAVÍRUS* HUMANO 31**

Recife  
2019

DAFFANY LUANA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE POLIMORFISMOS DO ONCOGENE E6 DO  
*PAPILOMAVÍRUS* HUMANO 31**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica.

**Orientador:** Dr. Antonio Carlos de Freitas

**Coorientadores:** Dra. Bárbara Simas Chagas

Dra. Rita de Cássia Pereira de Lima

Recife

2019

**Catálogo na fonte:**

Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Santos, Daffany Luana de

Avaliação funcional de polimorfismos oncogênese E6 do *Papilomavirus* humano 31/Daffany Luana de Santos. – 2019.

58f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Bárbara Simas Chagas.

Coorientadora: Rita de Cássia Pereira de Lima.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2019.

Inclui referências.

1. Papilomavirus humano. 2. Câncer – Aspectos genéticos. 3. Útero – Câncer. I. Freitas, Antonio Carlos de (Orientador). II. Chagas, Bárbara Simas III.

616.911

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2019 - 179

DAFFANY LUANA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL DE POLIMORFISMOS DO ONCOGENE E6 DO  
*PAPILOMAVÍRUS* HUMANO 31**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica.

Aprovada em 25/02/2019

**Banca Examinadora**

---

Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas (Orientador)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva Neto (Examinador Externo)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dra. Cristiane Moutinho Lago de Melo (Examinador Externo)  
Universidade Federal de Pernambuco

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a DEUS, por estar sempre presente em minha vida, por ter me dado tantas oportunidades, principalmente por ser o autor e consumidor da minha fé.

A minha família, minha mãe, Josefa Oliveira, meu pai, João Santos e meu irmão Diego Santos pelo empenho em me ajudar quando necessário, pelo amor e carinho dedicados e pela confiança em mim depositada.

Ao meu marido Tony Belo, por me encorajar e por toda paciência e amor.

Aos meus enteados Gabriel Belo e Davi Belo, pelo amor e admiração.

Ao meu orientador Dr. Antonio Carlos de Freitas, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório e por todo incentivo na realização das pesquisas.

As minhas coorientadoras Dra. Bárbara Simas e a Dra. Rita de Cássia pela amizade, por toda assistência, instrução e suporte para execução desse trabalho.

Ao Dr. Lindomar Pena por ter possibilitado a realização de todo trabalho de cultivo das células no LAVITE.

A todos os amigos, principalmente aos amigos do LEMTE e do LAVITE, vocês são indispensáveis, em especial a Ruany Silva e Kamylla Conceição, por todos os conselhos e palavras de motivação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica (PPGIT).

Ao secretário Paulo Germano (PPGIT), pelo seu impecável trabalho e contribuições burocráticas.

A plataforma de sequenciamento (Heidi).

Aos órgãos de fomento: Capes, CNPq e FACEPE pelo apoio financeiro.

## RESUMO

Existem cerca de 200 tipos de HPV, dos quais 40 acometem o trato genital, e 15 deles são considerados de alto risco oncogênico, dentre eles, o HPV-31, que é inclusive, o segundo mais frequente em Pernambuco. As oncoproteínas E6 e E7 são responsáveis pela atividade transformante dos HPVs de alto risco. Através de estudos epidemiológicos foi estabelecida a relação entre os tipos de HPV e câncer cervical. Este estudo teve como objetivo, checar o efeito das variantes no oncogene E6 do HPV-31 presentes em Pernambuco (Nordeste, Brasil), inferindo a importância clínica com relação à oncogenicidade do câncer de colo uterino. Os polimorfismos estudados para E6 HPV-31 foram identificados pelo nosso grupo de pesquisa. As amostras foram sub-clonadas em vetor pCI neo para expressão em células de mamíferos. As amostras clonadas foram sequenciadas e alinhadas com a sequência de referência do HPV-31. As construções apresentando os vetores recombinantes contendo E6 foram utilizadas para transfecção de células HEK293. Para investigar os efeitos dos polimorfismos presentes em E6 na via NF- $\kappa$ B, as células foram transfectadas com o vetor de expressão contendo as variantes H60Y, T64A, K123R, A138V, R144G e o *Full* (amostra apresentando todas as variantes), com o plasmídeo repórter de luminescência ( $\kappa$ B) 3-Luc e com o plasmídeo normalizador de luminescência pRenilla, e com o protótipo de E6 do HPV-31 (sequência sem nenhum polimorfismo). Para avaliar os efeitos obtidos, nossas construções foram comparadas com a sequência protótipo, e o vetor vazio que foi usado como controle positivo da ativação da via. Após a transfecção as células foram lisadas, os extratos celulares foram preparados para leitura da luciferase de *firefly* e *renilla* as quais determinaram o *fold* da via NF- $\kappa$ B. Foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre E6 R144G. Porém para a variante T64A houve uma regulação negativa significativa na atividade da via, também em conjunto, os polimorfismos apresentaram uma diminuição na atividade de NF- $\kappa$ B. Para a análise da atividade transcricional de E6, a variante R144G, apresentou uma expressão muito baixa de RNAm. Enquanto a variante T64A apresentou níveis aumentados de expressão relativa. Este estudo corrobora com dados já existentes na literatura sobre os polimorfismos. Além de contribuir para expansão do conhecimento acerca de alterações nucleotídicas no oncogene E6 e seu papel na imortalização celular.

Palavras-chave: Papilomavirus Humano (HPV). Oncogene E6. Variantes. NFkB.

## ABSTRACT

There are about 200 HPV types, 40 of which involve the genital tract, and 15 of them are considered to be at high risk for oncogenic HPV 31, which is the second most common in Pernambuco. The relationship between HPV types and cervical cancer was established through epidemiological studies. The objective of this study was to verify the effect of the variants on HPV31 E6 oncogene present in Pernambuco (Northeastern Brazil), inferring the clinical importance regarding the oncogenicity of cervical cancer. The E6 and E7 oncoproteins are responsible for the transforming activity of high-risk HPVs. The polymorphisms studied for E6 HPV-31 were identified by our research group. Samples were subcloned into neo pCI vector for expression in mammalian cells. The cloned samples were sequenced and aligned with the HPV-31 reference sequence. The constructs showing recombinant E6-containing vectors were used for transfection of HEK293 cells. To investigate the effects of polymorphisms present in E6 on the NF- $\kappa$ B pathway, the cells were transfected with the expression vector containing the H60Y, T64A, K123R, A138V, R144G and Full variants (the all-variant sample) with the plasmid ( $\kappa$ B) 3-Luc reporter and with the pRenilla luminescence normalizing plasmid, and with the HPV-31 E6 prototype. To evaluate the effects obtained, our constructions were compared with the prototype sequence, and the empty vector that was used as positive control of the pathway activation. After transfection the cells were lysed, the cell extracts were prepared for reading of the firefly and renilla luciferase which determined the folding of the NF- $\kappa$ B pathway. For the analysis of transcriptional activity of E6, the R144G variant showed very low mRNA expression. While the T64A variant showed increased levels of relative expression. This study corroborates data already available in the literature on polymorphisms. In addition to contributing to the expansion of knowledge about nucleotide changes in E6 oncogene and its role in cell immortalization.

Key words: Human Papillomavirus (HPV). E6 oncogene. Variants. NF- $\kappa$ B.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Ciclo de infecção viral do HPV. O ciclo de vida do vírus HPV é dependente do processo de diferenciação celular e a expressão das proteínas virais, que através das diferentes camadas do epitélio promovem a manutenção e amplificação do genoma viral, proliferação celular, montagem e liberação das partículas virais.....20
- Figura 2 - Esquema ilustrativo do genoma de HPV mostrando os genes de expressão precoce (E), tardia (L) e região regulatória (LCR).....21
- Figura 3 - Esquema ilustrativo da atuação da oncoproteína E6 do HPV, sobre p53. E6 atua na degradação de p53, sem a ação da proteína supressora tumoral, o DNA danificado continua a se amplificar, dessa forma, E6 atua aumentando a proliferação celular.....25
- Figura 4 - Esquema apresentando as vias de sinalização para a ativação de NF- $\kappa$ B. Esta via pode ser ativada por diversos estímulos (ex. TNF  $\alpha$  e IL-1), após essa ativação se inicia a fosforilação de IKK. Após a fosforilação do I $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B migra para o núcleo e passa a atuar como fator transcricional de genes associados a proliferação, sobrevivência e inflamação.....29
- Figura 5 - Polimorfismos identificados em E6 HPV-31.....32
- Figura 6 - Mapa do vetor pCI-neo.....34
- Figura 7 - Esquema ilustrativo do cultivo e transfecção de células eucarióticas.....37
- Figura 8 - Gel representativo demonstrando a digestão das variantes e protótipo de E6 do HPV31 do vetor pUC57. M: Marcador (GeneRuler 1 KB DNA Ladder- Thermo Scientific); variantes H60Y, T64A, K123R, A138V, R144G protótipo e full respectivamente.....40

- Figura 9 - Gel representativo demonstrando a digestão das variantes e protótipo de E6 do HPV31 do vetor pCI-neo, confirmando os clones. M: Marcador (GeneRuler 1 KB DNA Ladder- Thermo Scientific); variantes H60Y, T64A, K123R, A138V, R144G, protótipo e full respectivamente.....41
- Figura 10 - Estrutura do RNAm do oncogene E6 do HPV-31 :a) E6 all variants. b)sequência de referência para E6. c)variante E6 T64A . d)variante E6 K123R . e) variante E6A138V. f) variante E6 R144G.....45
- Figura 11- Interação proteína-proteína entre a variante E6\_T64A (em vermelho) e E6AP (em dourado). O motivo LXXLL está interagindo com a hélice ligante da proteína E6, na bolsa E6 hidrofóbica.....46

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Funções das proteínas precoces do HPV e seus alvos celulares.....	31
--	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - A análise estatística foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA) seguida de correção de Bonferroni, em que $p < 0,05$ foi considerado significativo. (NS= Não significativo, *= diferença estatística significativa).....	42
Tabela 2 - Energia de ligação calculada a partir das interações proteína-proteína entre HPV-31 E6 e E6AP.....	46

## LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância unidirecional
ASC-H	Células escamosas atípicas HSIL
ASC-US	Células escamosas atípicas de significado indeterminado
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
E	<i>Early</i>
E5	Oncogene E5
E6	Oncogene E6
E6 AP	Proteína de associação a E6
E7	Oncogene E7
HEK- 293	Célula embrionária de rim humano
HPV	Papilomavírus humano
HR	Papilomavírus humano de alto risco oncogênico
<i>HSIL</i>	Lesão epitelial escamosa de alto grau
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Kb	Kilobase
L	<i>Late</i>
LCR	Longa região de controle
<i>LSIL</i>	Lesão intraepitelial de baixo
Luc	Luciferase
NF-Kb	Fator nuclear kB
NIC	Neoplasia intra-epitelial Cervical
Pb	Pares de bases

PBS	Tampão fosfato salino
PE	Pernambuco
PV	Papilomavírus
P53	Proteína p53
RNA	Ácido ribonucleico
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
TNF	Fator de necrose tumoral

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
<b>1.1 OBJETIVOS</b>	<b>18</b>
1.1.1 Objetivo Geral	18
1.1.2 Objetivos Específicos	18
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>19</b>
2.1 CÂNCER CERVICAL E INFECÇÃO DO HPV	19
2.2 PAPILOMAVÍRUS HUMANO	20
2.3 ONCOGENE E6	23
2.4 RELAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS EM E6 E ONCOGENICIDADE	25
2.5 ESTUDO FUNCIONAL: INTERFERÊNCIA BIOLÓGICA	26
2.6 MODELO FUNCIONAL: VIA NF-κB	27
<b>3. METODOLOGIA</b>	<b>32</b>
3.1. VARIAÇÕES NUCLEOTÍDICAS ESTUDADAS	32
3.2 REAÇÃO DE DIGESTÃO DO DNA PLASMIDIAL DO VETOR DE PASSAGEM	32
3.3 SUBCLONAGEM DAS VARIANTES E PROTÓTIPO NO VETOR DE EXPRESSÃO	33
3.4 TRANSFORMAÇÃO EM E. Coli	34
3.5 SEQUENCIAMENTO DE DNA E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS	35
3.6 ISOLAMENTO DO DNA DOS VETORES RECOMBINANTES EM LARGA ESCALA	35
3.7 CULTIVO E TRANSFEÇÃO IN VITRO DE CÉLULAS EUCARIÓTICAS	35
3.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FUNCIONAL DE E6	37
3.9 ENSAIO DE RT-qPCR	38
3.10 ANÁLISE IN SILICO	38

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>40</b>
4.1 DIGESTÃO DAS VARIANTES E PROTÓTIPO DE E6 DO HPV-31 DO VETOR pUC57	40
4.2 SUBCLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DAS SEQUÊNCIAS VARIANTES DO ONCOGENE E6 DO HPV-31	40
4.3 TRANSFEÇÃO IN VITRO DE CÉLULAS EUCARIÓTICAS	41
4.4 ENSAIOS DE LUCIFERASE	41
4.5 ENSAIO DE RT-qPCR	43
4.6 ANÁLISE DA ESTRUTURA DO RNAM	44
4.7 ANÁLISE DE ANCORAGEM MOLECULAR ENTRE AS VARIANTES DE E6 HPV-31 EE6AP	45
<b>5 DISCUSSÃO</b>	<b>47</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b>	<b>52</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>53</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer cervical é o quarto tipo mais prevalente de câncer, com 530.000 casos, dos quais cerca de 275 mil pacientes morrem a cada ano. Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), o Brasil apresentou 16.370 casos de câncer cervical no ano de 2018. Onde o mesmo, é o quarto tumor mais frequente na população feminina, atrás do câncer de pele não melanoma, câncer de mama e o câncer de cólon e reto, além de ser a quarta causa de morte de mulheres por câncer no país. A relação entre tipos de HPV e câncer cervical foi estabelecida a partir de estudos epidemiológicos e funcionais, onde o vírus foi detectado em mais de 99,7% do carcinoma de células escamosas e em 94-100% do carcinoma cervical adenoescamoso.

O HPV é um vírus de DNA pertencente à família *Papillomaviridae*, são vírus não-envelopados, de simetria icosaédrica, com 72 capsômeros e um genoma de DNA de fita dupla circular, constituindo-se de aproximadamente 6.800 a 8.400 pares de bases (pb). O genoma do HPV é composto pela região LCR, onde se encontram as sequências regulatórias da transcrição viral e origem de replicação dos genes *Early* (E1, E2, E5, E6 e E7) e *Late* (L1 e L2), sendo assim denominados pela ordem de expressão dos mesmos.

Os genes designados como E (*early*) são comumente expressos desde os primeiros estágios da infecção e estão relacionados a funções regulatórias, como controle de transcrição e replicação virais, e transformação celular, enquanto a expressão dos genes L (*late*), somente é detectada nos estágios finais de infecção, e estão envolvidos na composição do capsídeo viral. Mais de 200 tipos de HPV já foram identificados, sendo 15 deles considerados como tipos de HPVs de alto risco oncogênico. O HPV-16 é considerado o responsável por 50 a 60% dos casos de câncer cervical, seguido pelo HPV-18 (10-12%), e os HPVs 31 e 45 (4-5% cada).

A atividade transformante dos HPVs de alto risco é promovida pelas oncoproteínas E6 e E7, os produtos desses oncogenes são imprescindíveis para os processos de transformação e imortalização celular. Quando presente na célula, a oncoproteína viral E6 recruta a proteína de associação a E6 (E6-AP), e este recrutamento resultam na ubiquitinação e degradação de p53. Sem a proteína p53 a célula perde a capacidade de perceber e reparar possíveis danos no DNA, havendo

um aumento na frequência de mutações, aneuploidias e rearranjos cromossômicos. O acúmulo desses eventos propicia o desenvolvimento de um fenótipo neoplásico resultando em câncer.

Variantes dos oncogenes E6 e E7 são importantes no desenvolvimento de diagnósticos, construção de vacinas e outros métodos terapêuticos de controle das infecções persistentes. As proteínas E6 e E7 do HPV são importantes para várias propriedades virais sendo que variações na sequência do gene de uma ou ambas as proteínas podem conduzir a uma função biológica alterada e, portanto, afetar o resultado clínico. Estudos em HPV-16 mostram que alterações em E6 mapeadas dentro de epítomos de células T alteram o reconhecimento imunológico da célula infectada pelo HPV.

Nosso grupo identificou variações em E6 e E7 do HPV-31 mapeadas dentro das regiões de epítomos de células T e/ou B. Essas variações podem alterar o reconhecimento imunológico da célula infectada pelo HPV, podendo ter implicações diretas sobre a resposta imune, o que poderia por si só, ou em conjunto com outros fatores, esclarecer a alta incidência do HPV-31 em pacientes da região Nordeste. As oncoproteínas E6 dos HPVs de alto risco também são capazes de ativar a via NFκB. O exato mecanismo ainda não está claro, embora existam indícios de que E6 possa interagir com motivos de ligação PDZ presentes em componentes da via de sinalização.

A via NF-κB é essencial para as funções imunes adequadas, mas sua ativação excessiva em células do sistema imune e macrófagos frequentemente causa inflamação crônica. Além de controlar a resposta imune inata e adquirida, a sinalização NF-κB tem papel crucial nos eventos celulares como apoptose, adesão, proliferação, diferenciação e resposta celular ao estresse.

O presente estudo teve como finalidade realizar uma avaliação funcional das variantes do oncogene E6 do HPV-31 para identificar o potencial real dessas variantes e a importância clínica com relação à oncogenicidade do câncer de colo uterino em mulheres do Nordeste do Brasil, usando como modelo funcional a via NFκB.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Realizar uma investigação *in vitro* das variantes presentes no oncogene E6 do HPV-31 circulantes no Nordeste do Brasil e assim auxiliar a compreensão de fatores que possam contribuir para o desenvolvimento do câncer cervical.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a função biológica das variantes presentes em E6 do HPV-31 utilizando a via NF- $\kappa$ B, através da investigação *in vitro* de culturas de células HEK-293;
- Avaliar a função biológica das variantes em E6 do HPV-31 através da expressão gênica;
- Verificar *in silico* a ocorrência de alterações conformacionais na estrutura do RNAm das variantes estudadas;
- Realizar uma análise de ancoragem molecular entre as variantes de E6 HPV-31 e E6AP.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 CÂNCER CERVICAL E INFECÇÃO DO HPV

A cada ano o câncer cervical apresenta o surgimento de aproximadamente 530.000 novos casos, dos quais resultam em 275.000 mortes em todo o mundo. A maioria dos casos, são causados por infecções persistentes por HPVs de alto risco oncogênico (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2017).

A maioria das infecções por HPV é transitória, mas a infecção persistente com hrHPV (HPVs de alto risco) que dura mais de 2 anos pode evoluir para neoplasia intraepitelial cervical de alto grau (NIC). Contudo, a infecção com hrHPV é necessária, mas não suficiente para causar câncer cervical, outros fatores, tais como alterações epigenéticas, tabagismo e contraceptivos também são críticos no desenvolvimento do câncer cervical. (Jemal *et al.*, 2011).

A infecção pelo papilomavírus humano (HPV) é um importante fator de risco para o câncer cervical: 99,7% dos cânceres cervicais estão associados a infecção pelo hrHPV (Hatano *et al.*, 2017).

O câncer cervical, no Brasil, é o quarto tipo mais prevalente de câncer. Segundo dados do INCA, o Brasil apresentou 16.370 casos de câncer cervical no ano de 2018, onde o mesmo, o quarto tumor mais frequente na população feminina, atrás do câncer de pele não melanoma, câncer de mama e o câncer de cólon e reto, além de ser a quarta causa de morte de mulheres por câncer no país (INCA, 2018).

Na década de 1990, 70% dos casos diagnosticados eram da doença invasiva (o estágio mais agressivo da doença), atualmente 44% dos casos são de lesão precursora do câncer, chamada intraepitelal (INCA, 2018).

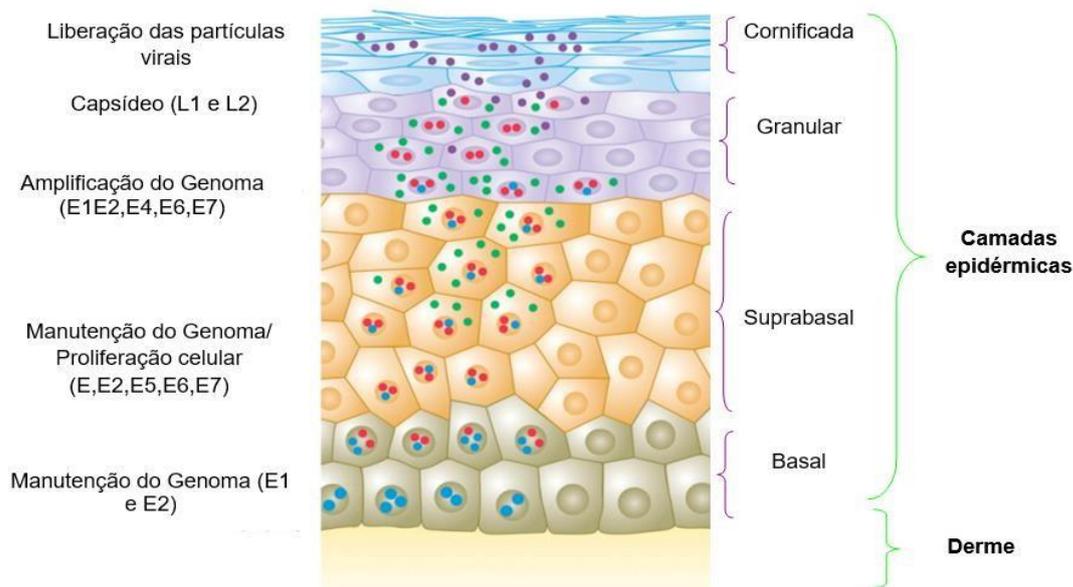
O HPV utiliza como células hospedeiras, os queratinócitos. Uma vez que às infecta, as células passam a se diferenciar com o genoma viral (Stubenrauch e Laimins, 1999; zur Hausen 2002). Possivelmente, a entrada do HPV nas células basais, exposta em microlesões ou abrasões no epitélio cervical, é mediado por proteoglicanos de heparan sulfato (HSPGs) e outros componentes da membrana basal da mucosa anogenital, a exemplo da laminina que atuam como receptores primários para ancoragem do vírus através da interação com a proteína L1 do HPV (Combita *et al.*, 2001; Giroglou *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2009; Doorbar *et al.*, 2012).

Alterações conformacionais irão resultar na exposição da região amino terminal da proteína L2, permitindo a ação da furina convertase que cliva uma região de L2,

resultando em uma segunda alteração conformacional, expondo o sítio de ligação para um segundo co-receptor. É possível encontrar a ação de fatores de crescimento na internalização do vírus e na integração do mesmo (Evander *et al.*, 1997; Licitra *et al.*, 2006; Scheurer *et al.*, 2007; Kines *et al.*, 2009; Surviladze *et al.*, 2013).

Após a entrada do vírus na célula ocorre a acidificação das vesículas de endocitose, levando a desencapsidação do genoma viral e migração para o núcleo da célula, este será estabilizado na forma epissomal. Assim, inicia-se o ciclo de replicação viral, com a expressão dos genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7 (Combata *et al.*, 2001; Giroglou *et al.*, 2001; Woodman *et al.*, 2007; Johnson *et al.*, 2009; Sapp e Day, 2009; Doorbar *et al.*, 2012) (Figura 1). Visto que a proteína E6 atua inativando p53, impede a supressão do ciclo celular, garantindo a continuidade do mesmo. Enquanto isso, a expressão das proteínas L1 e L2 leva a montagem das partículas virais na camada granular. As partículas virais são liberadas na superfície pela descamação do epitélio (Figura 1) (Doorbar, 2005; Howley, 2007).

**Figura 1.** Ciclo de infecção viral do HPV. O ciclo de vida do vírus HPV é dependente do processo de diferenciação celular e a expressão das proteínas virais, que através das diferentes camadas do epitélio promovem a manutenção e amplificação do genoma viral, proliferação celular, montagem e liberação das partículas virais.



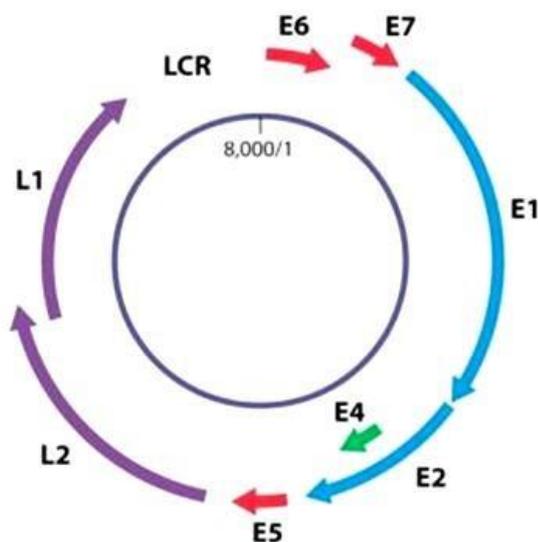
Fonte: Modificado de Lazarczyk *et al.*, (2009).

## 2.2 PAPILOMAVÍRUS HUMANO

O HPV é um vírus de DNA, pertencente à família *Papillomaviridae*, não envelopado, de simetria icosaédrica, com 72 capsômeros e um genoma de DNA de

fita dupla circular, constituindo-se de aproximadamente 6.800 a 8.400 pares de bases (pb) (Tan *et al.*, 1998) (Figura 2). Este tipo de vírus infecta as células mucosas ou cutâneas, no tecido epitelial, através de microlesões, sendo o contato sexual sua principal forma de transmissão (Souto *et al.*, 2005).

**Figura 2.** Esquema ilustrativo do genoma de HPV mostrando os genes de expressão precoce (E), tardia (L) e região regulatória (LCR).



Fonte: Lazarczyk *et al.*, (2009).

O genoma do HPV é composto pela região LCR (*Long Control Region* – Região Longa de Controle) região reguladora não codificadora de aproximadamente 1 kb, onde se encontram as sequências regulatórias da transcrição viral e origem de replicação dos genes *Early* (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) e *Late* (L1 e L2), sendo assim denominados pela ordem de expressão dos mesmos (Favre & Orth, 1997). Os genes designados como E (*early*) são comumente expressos desde os primeiros estágios da infecção e estão relacionados a funções regulatórias, como controle de transcrição e replicação virais, e transformação celular, enquanto a expressão dos genes L (*late*), somente é detectada nos estágios finais de infecção, e estão envolvidos na composição do capsídeo viral (Favre & Orth, 1997).

O gene E1 codifica uma proteína que se liga na origem de replicação viral, apresentando uma atividade de helicase para separação de cadeias de DNA. A proteína E2 liga-se a E1 e estimula a replicação do DNA viral. E2 regula a

distribuição de genomas virais para cada célula filha após a divisão celular (Jimenez, 2015).

A proteína E4 é expressa em uma fase posterior da infecção viral e atua facilitando na liberação do virion no tecido epitelial escamoso. E4 também prende as células na fase G2 do ciclo celular. E5 estimula a atividade transformadora do receptor do fator de crescimento epidérmico resultante no aumento da proliferação celular (Jimenez, 2015). As proteínas E6 e E7 do HPV são conhecidos por induzir a degradação dos genes supressores de tumor p53 e pRb, respectivamente. Elas podem suprimir apoptose e alterar a função dos fatores envolvidos na regulação do ciclo celular, facilitando assim prolongamento do estágio proliferativo da diferenciação dos queratinócitos (Etzel *et al.*, 2010).

Os HPVs são classificados de acordo com a sequência nucleotídica do gene L1 (gene altamente conservado), tornando-se possível o agrupamento dos PVs em gênero (quando se tem sequências acima de 60% de homologia), em espécies (quando apresentam homologia entre 71-89%) e cepas quando diferem até 10% na sequência de L1 (de Villiers *et al.*, 2005; Kalantari *et al.*, 2010). A análise de um único gene não é suficiente para classificar as variantes, portanto, para nomear uma variante é necessário o estudo do genoma completo. Para ser classificada em variante uma sequência precisa diferir de 1% a 10% em relação à sequência de referência e deve apresentar 0,5% a 1% de variação para ser considerada uma sublinhagem (Burk *et al.*, 2013; Zigi *et al.*, 2015).

Mais de 200 tipos de HPV já foram identificados (Bernard *et al.*, 2010) e cerca de 40 tipos acometem o trato genital, sendo 15 deles considerados como tipos de HPVs de alto risco oncogênico (HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV56, HPV-58, HPV-59, HPV68, HPV-73 e HPV-82) (Zur HAUSEN, 2002). O HPV-16 é considerado o responsável por 50 a 60% dos casos de câncer cervical, seguido pelo HPV-18 (10-12%), e os HPVs 31 e 45 (4-5% cada) (Bosch & Sanjose, 2003; Trottier & Franco, 2006).

Taxas de prevalência do HPV e tipos diferem por grupo étnico, e os genótipos dos HPVs variam por áreas geográficas, e essa distribuição tem sido utilizada como objeto de diversos estudos. O HPV-16 apresenta uniformidade em sua distribuição, além de maior prevalência mundial, seguido pelo HPV-18 ou 31, de acordo com a região estudada (Bosch *et al.*, 1995; Clifford *et al.*, 2005; Walboomers *et al.*, 1999).

A infecção por HPV-31 é a segunda mais comum na Europa e Nordeste do Brasil (Gurgel *et al.*, 2015; Baldez *et al.*, 2012; Chagas *et al.*, 2013).

O HPV-16 é o mais predominante no Brasil, entretanto, o segundo mais predominante e varia por região (Baldez da Silva *et al.*, 2009; Castro *et al.*, 2011; Chagas *et al.*, 2013; Cruz *et al.*, 2004; Fernandes *et al.*, 2011). Em Recife, o HPV-16 segue o padrão de frequência mundial, no entanto, o HPV-31 é o segundo mais frequente (15,49%), seguidos pelos tipos 33, 58 e 18 (Baldez da Silva *et al.*, 2009; Lorenzato *et al.*, 2000).

Diferenças na distribuição dos HPVs podem advir tanto pelo processo de migração de pessoas, que gera uma maior diversidade populacional, quanto por comportamentos sexuais (Bosch *et al.*, 1995; Barzon *et al.*, 2008).

Variantes do HPV31 pertencentes a diferentes linhagens apresentaram diferenças na persistência e na capacidade de causar neoplasia intraepitelial cervical de alto grau. Os resultados de Ferenczie colaboradores (2016) indicam que a variação na sequência do gene E6 do HPV31 pode estar envolvida nas diferenças observadas no potencial oncogênico entre as variantes do HPV -31.

O estudo de Gurgel e colaboradores (2015a), evidenciara que variantes de HPV16, HPV-31, e do HPV-58 estão associadas à oncogenicidade, persistência, e a progressão da infecção. Existem poucos registros das variantes de HPV-16, HPV-31 e HPV-58 que são distribuídos no Brasil e mais precisamente no Nordeste do Brasil.

### 2.3 ONCOGENE E6

A atividade transformante dos HPVs de alto risco é promovida pelas oncoproteínas E6 e E7. Os produtos desses oncogenes são importantes para os processos de transformação e imortalização celular. As proteínas supressoras de tumores presentes na célula como a pRb e a p53 são alvo da ação transformante desses oncogenes. A atividade da pRb é inibida pela oncoproteína viral E7, por outro lado, a p53 é degradada subsequentemente à ligação com a oncoproteína E6. Ambas oncoproteínas induzem a proliferação, imortalização e transformação maligna das células infectadas pelo vírus (Tan *et al.*, 1998).

As oncoproteínas E6 e E7 são as duas proteínas oncogênicas mais importantes para a carcinogênese cervical, e são conhecidas por ativar vias

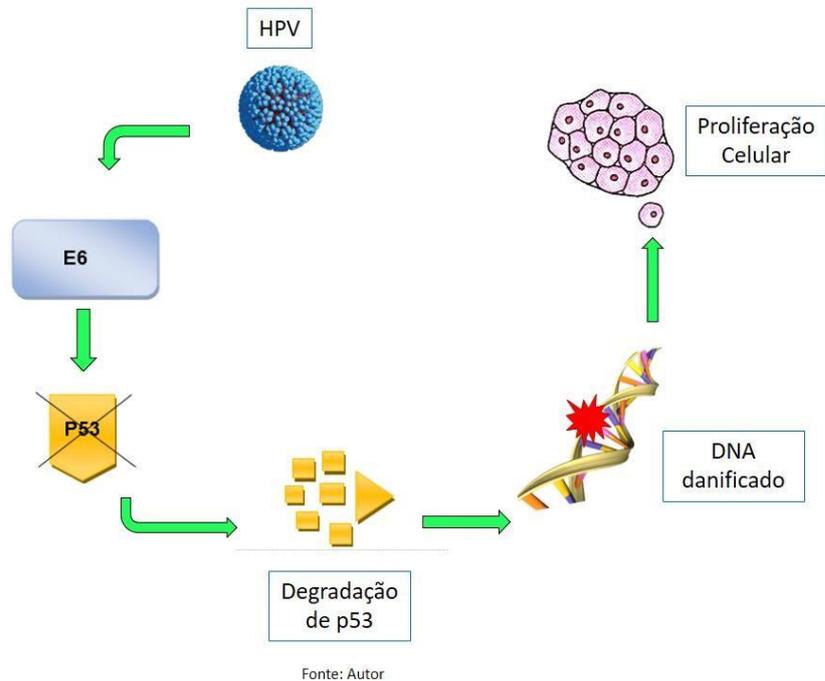
oncogênicas e reprimir as vias de supressão tumoral (Figura 3), o que resulta em desregulação do ciclo celular do hospedeiro e crescimento celular desordenado (Hatano *et al.*, 2017).

A proteína p53 tem a habilidade de perceber diferentes tipos de estresses que as células podem sofrer, com consequentes danos no DNA. Dessa forma, esta proteína é responsável por ativar os genes de mecanismo de reparo do DNA ou sinalizar para apoptose (Silva *et al.*, 2003).

Quando presente na célula, a oncoproteína viral E6 recruta a proteína de associação a E6 (E6-AP), um polipeptídeo celular que tem atividade de ubiquitina ligase, e este recrutamento resulta na ubiquitinação e degradação de p53 (Stubenrauch e Laimins, 1999), assim, a degradação de p53 passa a ser mediada por E6/E6-AP (Bernard *et al.*, 2011), logo E6 atua inibindo a apoptose e possíveis reparos no DNA.

Sem a proteína p53 a célula perde a capacidade de perceber e reparar possíveis danos no DNA, havendo um aumento na frequência de mutações, aneuploidias e rearranjos cromossômicos. O acúmulo desses eventos propicia o desenvolvimento de um fenótipo neoplásico resultando em câncer (Vousden, 1993; Vogel e Motulsky, 2000).

**Figura 3.** Esquema ilustrativo da atuação da oncoproteína E6 do HPV, sobre p53. E6 atua na degradação de p53, sem a ação da proteína supressora tumoral, o DNA danificado continua a se amplificar, dessa forma, E6 atua aumentando a proliferação celular.



## 2.4 RELAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS EM E6 E ONCOGENICIDADE

Existe uma necessidade de estudos sobre a caracterização genômica de variantes circulantes de HPV-16, HPV-31 e HPV-58, pois são os mais comuns, devido à suas diferenças biológicas, o que poderia explicar, em parte, as diferenças no processo de infecção e patogenicidade de alguns HPV variantes (Gurgel *et al.*, 2015).

A distribuição dos genótipos dos HPVs anteriormente era classificada de acordo com as áreas geográficas e as populações estudadas (Bosch *et al.*, 1995; Walboomers *et al.*, 1999; Clifford *et al.*, 2005). Entretanto, esse conceito foi revisto e passou-se a agrupar os HPVs em variantes e subvariantes. O HPV-31, por exemplo, foi reagrupado em três variantes (A, B e C) e sete subvariantes, as variantes A e B são consideradas mais oncogênicas quando comparadas com a variante C (Burk *et al.*, 2013).

Variantes dos oncogenes E6 e E7 são importantes no desenvolvimento de diagnósticos, construção de vacinas e outros métodos terapêuticos de controle das infecções persistentes. As proteínas E6 e E7 do HPV são importantes para várias propriedades virais sendo que variações na sequência do gene de uma ou ambas as

proteínas podem conduzir a função biológica alterada e, portanto, afetar o resultado clínico. Estudos em HPV-16 mostram que alterações em E6 mapeadas dentro de epítomos de células T alteram o reconhecimento imunológico da célula infectada pelo HPV (Ellis *et al.*, 1995).

Estudos em E6 HPV-16 têm destacado, por exemplo, a variante americana (AA) que conferiu maior potencial carcinogênico e sua superexpressão é suficiente para imortalizar e transformar queratinócitos humanos primários, mesmo na ausência de E7 (Law. *et al.*, 2019).

Nosso grupo identificou variações em E6 e E7 do HPV-31 mapeadas dentro das regiões de epítomos de células T e/ou B (Chagas *et al.*, 2011; Chagas *et al.*, 2013). Essas variações podem alterar o reconhecimento imunológico da célula infectada pelo HPV, podendo ter implicações diretas sobre a resposta imune, o que poderia por si só ou em conjunto com outros fatores esclarecer a alta incidência do HPV-31 em pacientes da região Nordeste.

## 2.5 ESTUDO FUNCIONAL: INTERFERÊNCIA BIOLÓGICA

Na última década, vários estudos de identificação foram realizados, gerando um número significativo de variantes dos vários tipos de HPVs, principalmente em hrHPVs, entretanto, surgiu-se a necessidade de se compreender a repercussão biológica dessas variantes, já que as mesmas poderiam estar atuando como atenuantes da carcinogênese cervical (Tamani *et al.*, 2010).

Estudos mostraram associação entre variantes do oncogene E6 do HPV-16 e a carcinogênese cervical. Por exemplo, alterações nos aminoácidos D25E e L83V estão associados com o elevado risco de desenvolvimento de carcinomas cervicais (Zehbe *et al.*, 1998, 2011; Matsumoto *et al.*, 2000; Kammer *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2008; Cai *et al.*, 2010; Freitas *et al.*, 2012).

Diversos estudos demonstraram que as variantes do HPV-16 diferem em sua associação com o câncer do colo do útero, o que demonstra que existem diferenças significativas na patogenicidade entre variantes dentro de um único genótipo (Bernard *et al.*, 2006; Xi *et al.* 2007). Diante disso, vários estudos investigaram a consequência funcional de alterações no gene viral LCR, E2 e E6 em relação à atividade do promotor, expressão dos genes do HPV e replicação do genoma, bem como transformação celular e vias moleculares relacionadas (Lizano *et al.*, 2009; Bernard

*et. al.*, 2006). A maioria dos estudos funcionais e sobre as funções relacionadas à carcinogênese foi realizada em variantes do HPV-16 E6 (Conrad *et. al.*, 1996; Richard *et. al.*, 2010).

Estudos iniciais forneceram evidências de uma associação entre variações no oncogene E6 e infecção persistente (Londesborough *et al.*, 1996; Xi *et al.*, 1995, 1997). Através desses e demais dados sobre o papel de E6 na carcinogênese cervical, algumas pesquisas verificaram que havia uma associação entre variantes no HPV-16 e o câncer invasivo (Chagaset *al.*, 2010; Jimenez, 2015). Além disso, várias proteínas que interagem com E6 foram descritas como alvos para a degradação dependente de E6 (Scheffner e Whitaker, 2003). Além das diversas funções em E6 protótipo (sequência sem nenhuma variação no gene), alterações nos níveis ou na atividade das proteínas virais podem ter papel crítico sobre a tumorigênese. Variações no gene E6 podem alterar a ação biológica ou as propriedades imunogênicas da proteína codificada (Ellis *et al.*, 1995; Zehbe *et al.*, 2003).

Análises dos efeitos de variantes de E6 do HPV-16, constataram que as mesmas podem diferir em sua capacidade de induzir a resistência sérica e regulação de p53 e Bax (Niccoli *et al.*, 2012), atuando em vários processos celulares importantes, como diferenciação, apoptose, imortalização, transformação (Richard *et al.*, 2010; Niccoli *et al.*, 2012), migração e metástase (Zacapala *et. al.*, 2016). Estudos com variação de E6 mostraram influenciar o reconhecimento imunológico pelos linfócitos T, das células hospedeiras, impactando assim na prevalência de variantes de E6 no câncer cervical (Zehbe *et. al.*, 2011). Em um de seus estudos, Ferenczi e colaboradores (2016) encontraram diminuição na estabilidade da proteína p53 entre a sequência protótipo e variantes provenientes de mutagênese em E6 do HPV-16.

## 2.6 MODELO FUNCIONAL: VIA NF- $\kappa$ B

A oncoproteína E6 dos HPVs de alto risco também são capazes de ativar a via NF- $\kappa$ B (Nees *et al.*, 2001; Havard *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2005; James *et al.*, 2006; D'Costa *et al.*, 2012). O exato mecanismo ainda não está claro, embora existam indícios de que E6 possa interagir com motivos de ligação PDZ presentes em componentes da via de sinalização (James *et al.*, 2006).

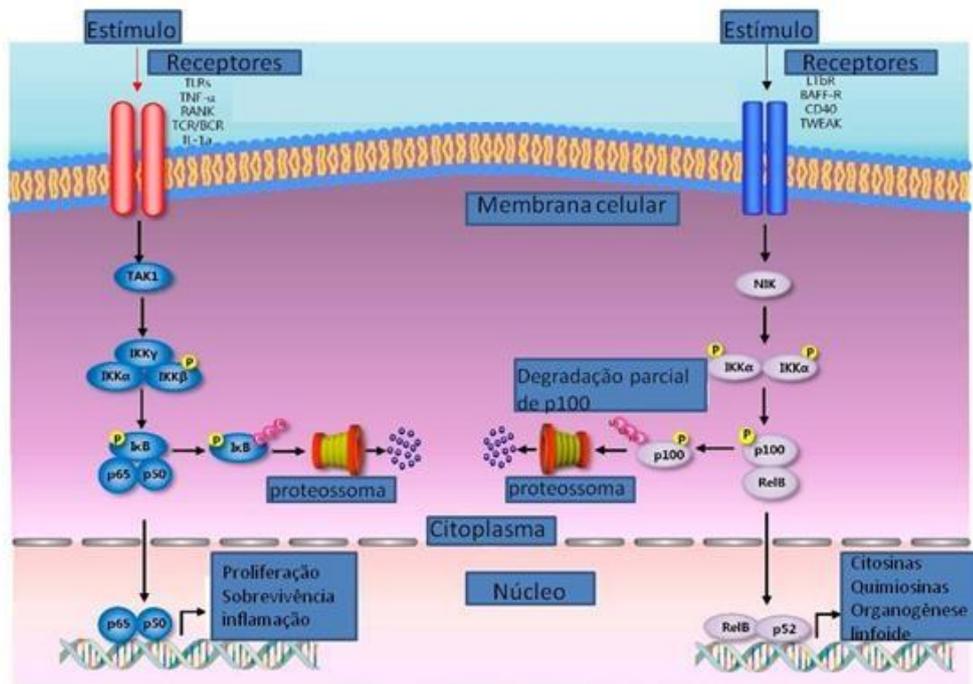
A via NF- $\kappa$ B é essencial para as funções imunes adequadas, mas sua ativação excessiva em células do sistema imune e macrófagos frequentemente causa

inflamação crônica (Li *et al.*, 2002). A estimulação dessa via por citocinas próinflamatórias como TNF- $\alpha$  (Figura 4), inicia a fosforilação do complexo IKK, formado pelas subunidades IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  e duas subunidades NEMO. Como resultado, o I $\kappa$ B fosforilado é degradado, permitindo a migração do NF- $\kappa$ B para o núcleo, onde atua como fator transcricional de genes  $\kappa$ B responsivos. Além de controlar a resposta imune inata e adquirida, a sinalização NF- $\kappa$ B tem papel crucial nos eventos celulares como apoptose, adesão, proliferação, diferenciação e resposta celular ao estresse (Chen e Greene, 2004; Perkins, 2007).

A família NF- $\kappa$ B consiste em fatores de transcrição que desempenham um papel complexo e essencial na imunidade, inflamação, replicação viral e o início e progressão do câncer. A forma clássica de NF- $\kappa$ B é um heterodímero entre as subunidades p65 (RelA) e p50. Na maioria das células quiescentes, estes dímeros estão ligados a moléculas inibitórias da família de proteínas I $\kappa$ B (inibidores de NF- $\kappa$ B) (Hoesel e Schmid, 2013).

Uma grande variedade de estímulos pode desencadear esse tipo de ativação de NF- $\kappa$ B (por exemplo, citocinas pró-inflamatórias, como TNF  $\alpha$  e IL-1) e é mediada por receptores Toll-like (TLRs), receptores do fator de necrose tumoral (TNFR), receptores de antígenos e receptores de interleucina1 (IL-1R) (Oeckinghaus e Ghosh, 2009; Perkins e Gilmore, 2006). Níveis moderadamente elevados de atividade do NF- $\kappa$ B são frequentemente vistos em condições inflamatórias crônicas (Disis, 2010). A ativação de NF- $\kappa$ B pode aumentar a sobrevivência celular, inibindo a morte celular programada estimulando a transcrição de genes antiapoptóticos (Kucharczak *et al.*, 2003). A NF- $\kappa$ B parece formar um elo crítico entre inflamação crônica e câncer.

**Figura 4.** Esquema apresentando as vias de sinalização para a ativação de NF- $\kappa$ B. Esta via pode ser ativada por diversos estímulos (ex. TNF  $\alpha$  e IL-1), após essa ativação se inicia a fosforilação de IKK. Após a fosforilação do I $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B migra para o núcleo e passa a atuar como fator transcrricional de genes associados a proliferação, sobrevivência e inflamação.



Fonte: Adaptado de Park e Hong, 2016.

Os papilomavírus desenvolveram mecanismos para se adaptar às vias de controle do crescimento celular, regular a replicação do DNA e diferenciação celular. Após a infecção bem sucedida de um queratinócito, o vírus expressa as proteínas E1 e E2, que são necessárias para a replicação e manutenção do DNA viral (Kadaja et al., 2009).

Nakahara e colaboradores (2015) verificaram que a oncoproteína E1 do HPV induz a ativação de NF- $\kappa$ B. A via NF- $\kappa$ B medeia uma resposta negativa para regular a replicação do HPV, e essa resposta pode estar associada ao controle dos números de cópias virais. A integração do DNA do HPV, resultando em uma situação em que o padrão agregado (epissomal e integrado) se torna o estado mais prevalente (Nakahara et al., 2015).

A perda do oncogene E2 durante a integração do HPV no genoma do hospedeiro resulta na ativação constitutiva dos oncogenes virais E5, E6 e E7 (Tabela 1). Os oncogenes E6 e E7 usam múltiplos mecanismos para escapar da vigilância imunológica do hospedeiro (permitindo a persistência viral) e desregular o ciclo celular e o controle da apoptose facilitando assim o acúmulo de danos no DNA e a

transformação celular. Os genes do HPV apresentam funções variadas e possuem diversos alvos (Quadro1). A atividade mais bem caracterizada do E6 do HPV-16 é a sua capacidade de degradar a proteína supressora de tumor p53 através da via do proteassoma.

A ativação constitutiva da via NF- $\kappa$ B tem sido associada como mal prognóstico para vários tipos de cânceres, entre eles linfoma (Zou *et al.*, 2007), leucemia (Vilimas *et al.*, 2007), pulmão (Tew *et al.*, 2008), mama (Chua *et al.*, 2007) e ovário (Annunziata *et al.*, 2010). A ativação desta via promove a expressão de genes que promovem a proliferação celular e o bloqueio da apoptose, aumento na angiogênese tumoral e potencial metastático (Gupta *et al.*, 2010; Prasad *et al.*, 2010).

Existe uma contradição que surge de estudos recentes que demonstram um efeito contrário ao esperado das funções das oncoproteínas E6 e E7 sobre a via NF $\kappa$ B, dependendo do tipo de célula experimentado. A ativação da via NF- $\kappa$ B é um achado frequente em células escamosas de carcinoma, sendo uma importante evidência de transformação de células epiteliais (Huber *et al.*, 2004).

**Quadro 1.** Funções das proteínas precoces do HPV e seus alvos celulares.

ONCOPROTEÍNA (HPV)	FUNÇÃO	ALVOS
E1	Replicação do genoma viral e indução da ativação da NF- $\kappa$ B	Topoisomerase RPA
E2	Replicação do DNA viral, transcrição do DNA viral e repressão dos genes E6 e E7	Brd4, ChiR1
E4	Facilitar liberação e transmissão de vírions e desregulação da rede de citoqueratina	Citoqueratina 8/18
E5	Media os sinais mitogênicos dos fatores de crescimento. Ativa o EGFR, e promove a expressão da COX-2. Inibe a resposta imune.	EGFR, MHC 1, receptor TRAIL, receptor FAS
E6	Regulação expressão de NF- $\kappa$ B. Manutenção do genoma viral (junto com E7). Desregulação do ciclo celular. Promove a proliferação celular. Bloqueia apoptose.	p53, p73, p300, IRF3, BAK, BAX, ADA3, CPB, TERT, MAGI-1, Caspase 8, c-Myc, PDZ, Fibulin-1.
E7	Regulação da expressão de NF- $\kappa$ B, proliferação, inibição de apoptose, transformação maligna, indução de mecanismos de replicação celular.	pRb, p21, p27, p107, p130, IRF-1, ATM, CDK/ciclina A e E

Fonte: Adaptado de Tilborghs (2017).

Há evidências de que ambas as proteínas E6 e E7 de HPV-38, considerado cutâneo, possam ativar NF- $\kappa$ B (Hussain *et al.*, 2011). A ativação de NF- $\kappa$ B leva a uma regulação positiva de cIAP2, um inibidor de apoptose, o que poderia se esperar conferir alguma resistência a agentes de danos ao DNA (James *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2010). É possível que a ativação desta via por E6 em células da ectocérvice aumente a proliferação, enquanto a ativação da via seja inibitória ao crescimento de células derivadas da zona de transformação, onde a maioria dos cânceres cervicais se desenvolve (Vandermark *et al.*, 2012).

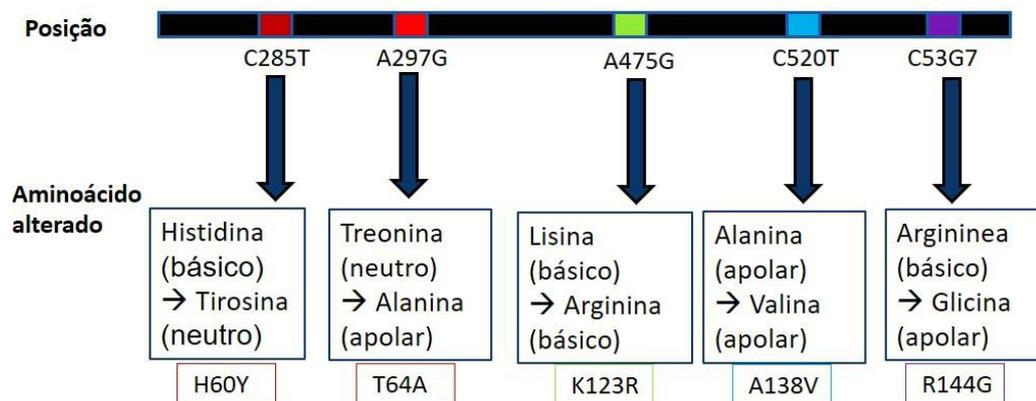
Desta forma, é possível que alterações (principalmente não-sinônimas) no gene E6, sejam capazes de alterar a função biológica, através da via NF- $\kappa$ B.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. VARIAÇÕES NUCLEOTÍDICAS ESTUDADAS

As variantes de E6 do HPV-31 de maior relevância epidemiológica foram escolhidas a partir daquelas identificadas pelo nosso grupo de pesquisa nos trabalhos já publicados (Figura 5) (CHAGAS *et al.*, 2011 e 2013).

**Figura 5.** Polimorfismos identificados em E6 HPV-31.



A mudança de nucleotídeo na posição 537 foi descrita pela primeira vez nestes estudos. As alterações não-sinônimas presentes no gene E6 estão situadas nas posições: C285T, A297G, A475G, C520T e C537G (Chagas *et al.*, 2011) representadas pela nomenclatura atribuída as mudanças de aminoácidos: H60Y, T64A, K123R, A138V e R144G.

#### 3.2 REAÇÃO DE DIGESTÃO DO DNA PLASMIDIAL DO VETOR DE PASSAGEM

Para realização desta etapa, vetores contendo variantes com polimorfismos únicos presentes em E6 foram construídos (H60Y, T64A, K123R, A138V, R144G).

Além das variantes, também foi utilizado o E6 protótipo, ou seja, o E6 selvagem, sem alterações (Prot.). Uma amostra contendo todos os polimorfismos também foi estudada (Full), possibilitando uma compreensão de como as alterações atuam em conjunto. As amostras contendo as variantes do oncogene E6 do HPV-31 (450 pb) foram sintetizados e clonados no vetor pUC57 (Thermo Fisher Scientific) fixados em um filtro, que foram submetidos a uma eluição.

Posteriormente, foi feita uma transformação em *E. coli* com as construções contendo as sequências variantes de DNA, protótipo e o full. O DNA plasmidial foi

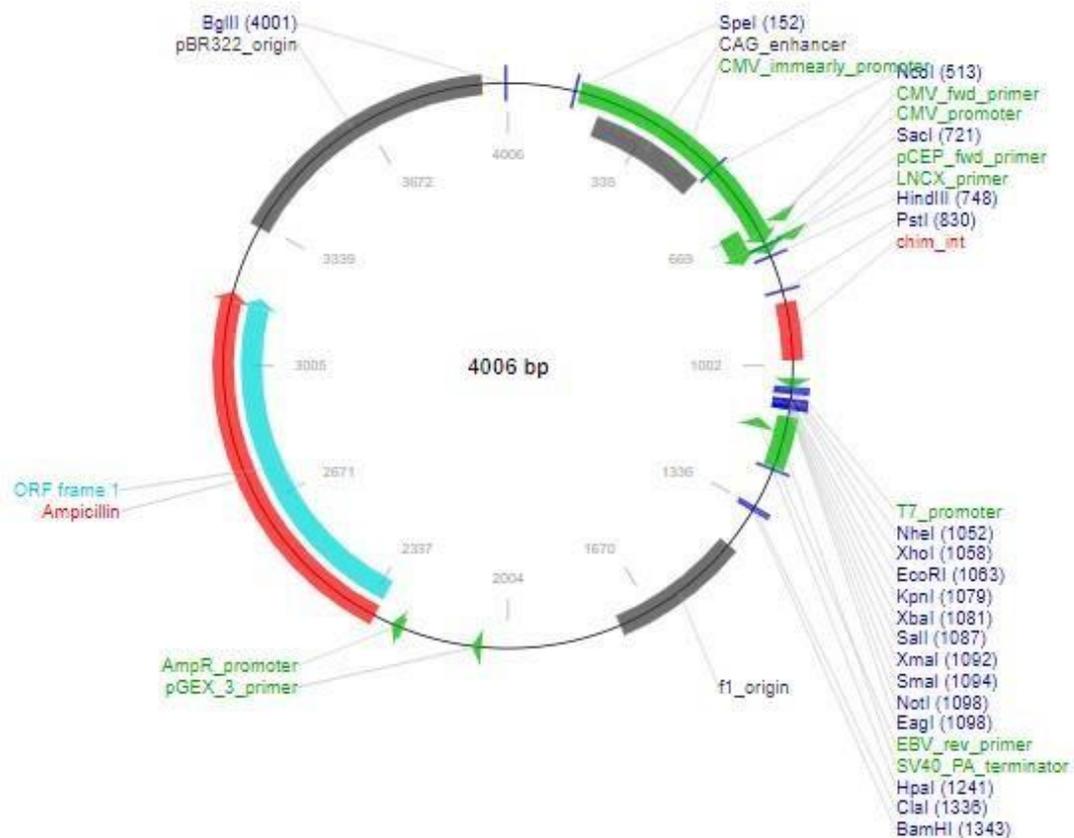
extraído e cada produto da extração de DNA plasmidial foi digerido em uma reação de volume final de 20µl, contendo 1U da enzima XhoI e 1U da enzima XbaI e um tampão que permite a dupla digestão com essas duas enzimas. A reação foi incubada por no mínimo 4 horas a 37°C.

### 3.3 SUBCLONAGEM DAS VARIANTES E PROTÓTIPO NO VETOR DE EXPRESSÃO

As construções apresentando E6 no pUC57 foram submetidas a digestão dupla através das enzimas XhoI (temperatura ótima 37°C, Promega) e XbaI (Temperatura ótima 37°C, Promega) para liberação do inserto. Para confirmar inicialmente a presença de clones foi necessário aplicar uma eletroforese nos produtos da digestão e observar o padrão de bandas em gel de agarose a 1.5%. Em seguida, foi realizada a purificação dos produtos da digestão através do kit *Wizard SV gel and PCR CleanUp System* (Promega), de acordo com as instruções do fabricante.

Posteriormente, foram realizadas reações de ligação entre o plasmídeo pCI-neo (Promega) (Figura 6) e o inserto (sequências variantes, protótipo e full) seguindo as instruções do fabricante. O produto dessas novas ligações foi usado como agente transformante de células de *E. coli*. Todos os clones foram confirmados por digestão enzimática para liberação do inserto e sequenciados.

**Figura 6.** Mapa do vetor pCI-neo.



Fonte: <https://www.addgene.org/vector-database/2183/>

### 3.4 TRANSFORMAÇÃO EM *E. Coli*

Células competentes de *Escherichia coli* da linhagem DH5 $\alpha$  foram transformadas com as construções contendo as sequências variantes de E6 do HPV-31, protótipo e full, em seguida, selecionadas após 16 horas de crescimento a 37°C em meio LB na presença do antibiótico ampicilina (100  $\mu$ g/ml). As colônias que cresceram foram isoladas e repicadas, sendo incubadas *overnight* a 37°C. Os clones recombinantes foram selecionados e colocados na estufa *overnight* a 37°C sob agitação em meio LB líquido contendo ampicilina (100  $\mu$ g/ml) por 16 horas. O DNA plasmidial foi extraído utilizando-se o kit *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), seguindo as instruções do fabricante e por fim digerido.

### 3.5 SEQUENCIAMENTO DE DNA E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS

Para confirmação dos clones, o DNA plasmidial dos recombinantes foi submetido ao sequenciamento automático pelo método dideoxi-terminal fluorescente, utilizando o kit *BigDye™ Terminator Cycle Sequencing v 3.1* (Applied Biosystems®), através da Plataforma Tecnológica de Sequenciamento do Laboratório de Genômica e Expressão Gênica –LABCEN/CB/UFPE, utilizando o sequenciador automático de DNA Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystem®), de acordo com os padrões estabelecidos nesta unidade. Foram utilizados iniciadores específicos, que anelam na sequência do vetor e no inserto com a finalidade de confirmações dos clones recombinantes. Cada clone obtido foi sequenciado três vezes em cada sentido (direto e reverso).

As sequências obtidas foram submetidas ao pacote de programas STADEN (Staden, 1996). Posteriormente, as sequências foram alinhadas com a sequência de referência do HPV-31 (NC\_001526) utilizando o *ClustalW* (Thompson *et al.*, 1994).

As análises de variabilidade genética foram realizadas a partir do programa MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011).

### 3.6 ISOLAMENTO DO DNA DOS VETORES RECOMBINANTES EM LARGA ESCALA

O DNA dos vetores recombinantes foi isolado por maxi-preparação utilizando-se o *kit Plasmid Plus Maxi* (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Os plasmídeos foram usados para transfecção de células HEK-293 (Células Embrionárias de Rim Humano). As células foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM-Invitrogen®) acrescido de 10% soro bovino fetal (Gibco®); 1% L-glutamina (Sigma®) – DMEM completo. As células foram mantidas em estufa úmida a 37°C e com 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.7 CULTIVO E TRANSFECÇÃO *in vitro* DE CÉLULAS EUCARIÓTICAS

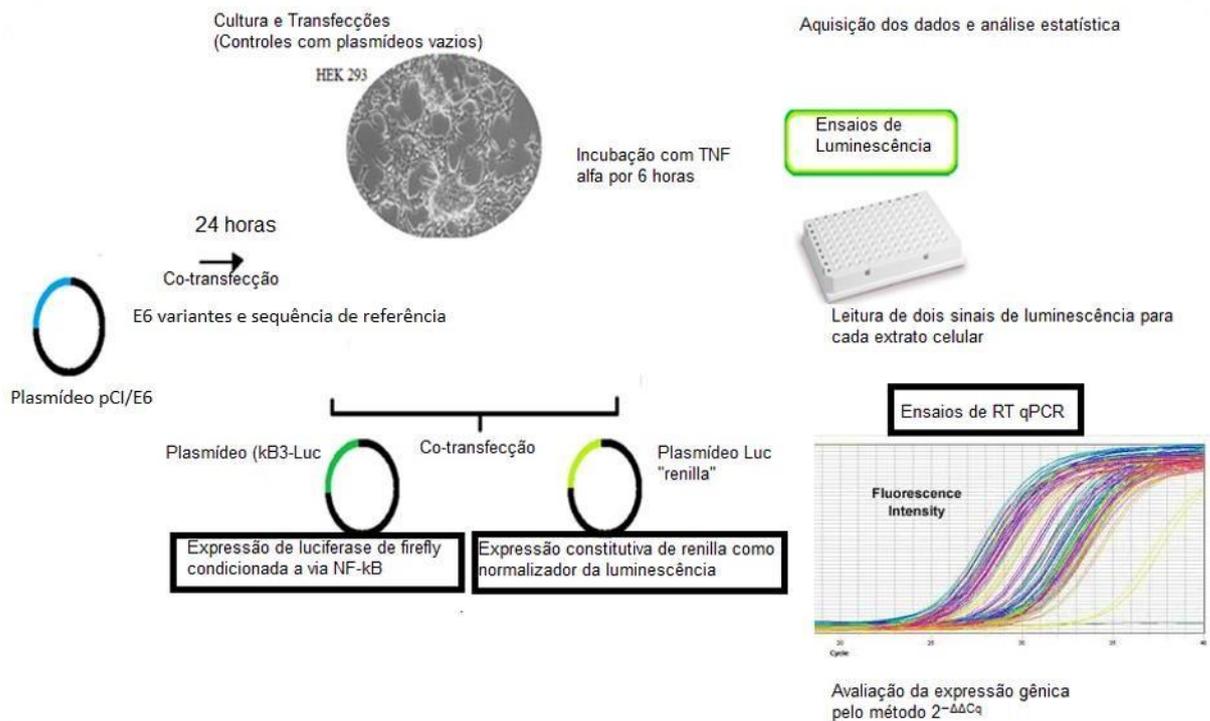
A linhagem celular utilizada foi HEK-293, foram cultivadas em meio DMEM acrescido com 10% de soro bovino fetal. Quando as garrafas de cultura celular T75 estavam com uma confluência entre 40-80%, a contagem das células foi realizada

no *Vicell* (contador de células e analisador de viabilidade celular) e em seguida distribuídas em placas de seis poços.

As células foram transfectadas (Figura 7) com as construções de vetores recombinantes utilizando o reagente de transfecção *Polyfect* (Qiagen), de acordo com as instruções sugeridas pelo fabricante. As transfecções foram realizadas em placas de cultura de células de 6 poços, onde  $5 \times 10^5$  células foram plaqueadas em 3ml de meio de cultura. Todos os grupos de células foram co-transfectadas com um repórter de luciferase *firefly* dependente de NF- $\kappa$ B, o qual é construído com três sítios de ligação do fator transcricional  $\kappa$ B sendo denominado (kB)3-Luc (1 ug) (BCCMTM / LMBP, Gent, Bélgica) e um plasmídeo expressando Renilla luciferase (1 ng) como normalizador da luminescência.

As células foram incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Grupos de células foram transfectadas com 1.5  $\mu$ g do gene E6 com cada uma das variantes, ou com todas em conjunto (full), ou com o protótipo, ou com o vetor pCI vazio. Após 24 horas da transfecção, as células foram incubadas com TNF $\alpha$  (10 ng/ml) durante 6 horas para estimulação da via.

**Figura 7.** Esquema ilustrativo do cultivo e transfecção de células eucarióticas.



Fonte: Autor.

### 3.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FUNCIONAL DE E6

A transfecção celular foi realizada utilizando o reagente Polyfect (Qiagen), de acordo com o protocolo do fabricante. As células foram incubadas com TNFa (10 ng / ml) durante 6 horas. Após esse período, foi adicionado às células uma solução de PBS gelado (tampão fosfato salino) para finalizar a indução da via. Parte da cultura foi utilizada para a etapa de lise celular utilizando o *ReporterLysis Buffer* (Promega) de acordo com as instruções do fabricante, e a outra parte utilizada para a extração de RNA para posterior ensaio de RT-qPCR. O gene  $(\kappa B)3$ -Luc apresenta três sítios de ligação para o fator NF- $\kappa B$ , o que condiciona sua expressão a uma maior ou menor atividade do fator  $\kappa B$ . (Byg *et al.*, 2012).

A atividade do NF- $\kappa B$  foi medida pelo Luminômetro de Microplaca GloMax® (Promega®) utilizando o sistema de ensaio de repórter da luciferase (Promega). A fim de assegurar eficiências de transfecção comparáveis, os resultados foram normalizados por renilla firefly. As leituras para firefly e renilla foram normalizadas para os níveis de proteína detectados na amostra pelo ensaio de proteína de

Bradford, e a ativação da curva foi determinada pela atribuição de 1 ao vetor vazio, pois nessa condição não houve nenhuma alteração na via.

### 3.9 ENSAIO DE RT-qPCR

O RNA total da cultura foi extraído utilizando o RNeasy Mini kit (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Todas as amostras foram tratadas com DNase I (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante. A pureza do RNA foi mensurada por meio da relação 260/280 e 260/230.

O cDNA foi sintetizado pelo kit Improm® Reverse Transcription (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. As reações de qPCR foram realizadas pelo kit QuantiTect SYBR Green® PCR (Qiagen), os primers e concentrações de cDNA foram os mesmos descritos por Leitão et al., (2014). O protocolo do ciclo foi de 95°C durante 15 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 10 s e o anelamento dos genes de referência a 55°C durante 30 s, enquanto que o gene E6 anelou a 60°C.

O protocolo da curva de fusão variou gradualmente de 65 a 95 ° C.A normalização da expressão gênica adotou os genes de referência GAPDH e ACTB (genes candidatos a genes de referência na carcinogênese cervical). A expressão gênica foi calculada de acordo com Livak e Schmittgen, (2001). Cada reação foi realizada em três repetições biológicas, incluindo um controle negativo para cada gene.

### 3.10 ANÁLISE *IN SILICO*

Para verificar se há mudanças na estrutura do mRNA devido a presença das variantes, as sequências do transcrito foram submetidas ao servidor RNAstructure™ de predição de estrutura secundária (Reuter e Mathews, 2010). As predições da estrutura do RNAm foram obtidas pelo menor resultado de energia livre.

A estrutura das proteínas E6 de referência e das variantes foi modelada. A sequência de aminoácidos da proteína de referência HPV-31 E6 (AAA46950) foi utilizada para a determinação da sua estrutura 3D. Uma pesquisa de “blast” foi realizada no Protein Data Bank (PDB) usando o algoritmo blastp para seleção de

modelos. O modelo selecionado foi uma estrutura cristalina do complexo ternário HPV16 E6 / E6AP / p53 (ID PDB: 4XR8), com 65,69% de identidade (e-value: 4e-63), que foi usado para modelagem de homologia de proteína E6 HPV-31.

O modelo de estrutura da proteína L1 de CPV1 foi previsto usando o Modeller 9.21 (Sali & Blundell, 1993). Os modelos obtidos foram refinados pela minimização de energia usando ModRefiner (Xu e Yang, 2011). Os modelos previstos foram avaliados por PROCHECK (Laskowski et al., 1993). As alterações não-sinônimas deste estudo (H60Y, T64A, K123R, A138V e R144G) foram inseridas na estrutura de referência do E6 HPV-31 usando o servidor web RosettaBackrub (Lauck et al., 2010).

Simulações de ancoragem molecular foram realizadas usando pyDockWEB (Jimenez-Garcia et al., 2013), que usa orientações de ancoragem de corpo rígido geradas por FTDock (Gabb et al., 1997). As simulações foram realizadas com parâmetros padrão, utilizando eletrostática, energia de dessolvatação e contribuição limitada de van der Waals, para gerar 10000 encaixes de proteína-proteína de corpo rígido entre os modelos de proteína E6 HPV-31 (referência e variantes) e a estrutura E6AP (PDB id: 4giz). De modo a melhorar os resultados de acoplamento, foi utilizada uma restrição indicando o péptido LXXLL (ELTLQELLGEE) de E6AP. O pyDockRST foi usado para calcular a porcentagem de restrições de distância satisfeitas, juntamente com a energia de ligação de eletrostática e dessolvatação, para identificar orientações corretas de ancoragem (Chelliah et al., 2006). A função de pontuação do pyDock foi usada para avaliar a energia de ligação das posições de encaixe proteína-proteína de corpo rígido (Cheng et al., 2007).

### 3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

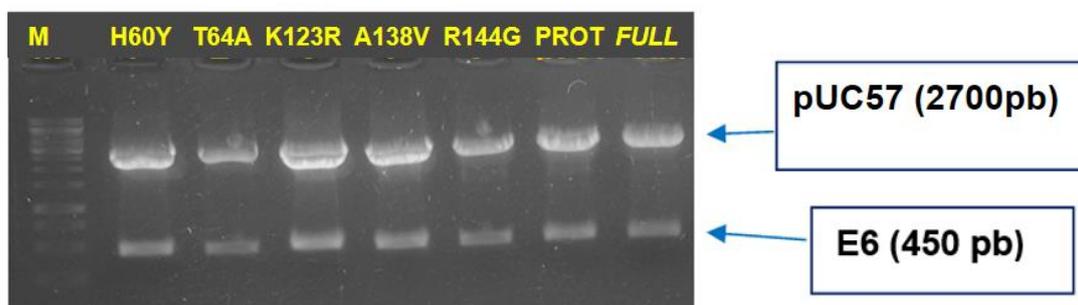
A análise estatística foi realizada utilizando o *Anova One Way* seguida pela correção de Bonferroni, onde valores de  $p < 0,05$  serão considerados significantes.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 DIGESTÃO DAS VARIANTES E PROTÓTIPO DE E6 DO HPV-31 DO VETOR pUC57

Após a transformação e extração do DNA plasmidial, as variantes contidas no vetor pUC57 foram digeridas (Figura 8) por enzimas de restrição (XhoI e XbaI) para posterior subclonagem no vetor de expressão.

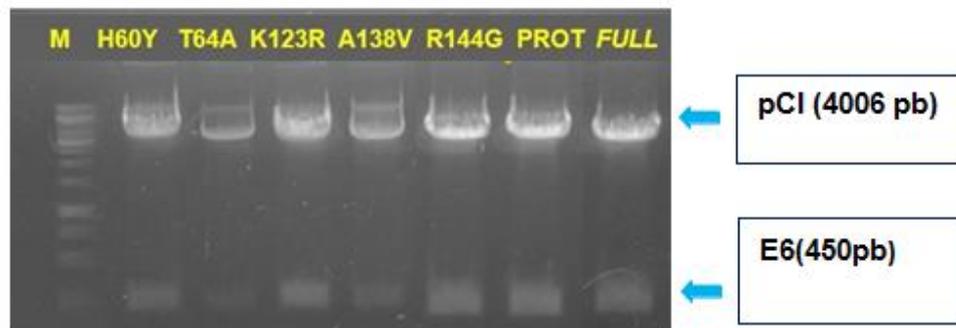
**Figura 8.** Gel representativo demonstrando a digestão das variantes e protótipo de E6 do HPV31 do vetor pUC57. M: Marcador (GeneRuler 1 KB DNA Ladder- Thermo Scientific); variantes H60Y, T64A, K123R, A138V, R144G protótipo e full respectivamente.



### 4.2 SUBCLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DAS SEQUÊNCIAS VARIANTES DO ONCOGENE E6 DO HPV-31

Cada produto da digestão foi utilizado numa reação de ligação no vetor de expressão em células de mamífero pCI-neo (Promega) e confirmados por ensaio de restrição (Figura 9). Além disso, todos os clones recombinantes obtidos foram submetidos a reações de sequenciamento para a confirmação da integridade das sequências variantes do oncogene E6 do HPV-31 através da comparação dessas sequências com as sequências de referência depositadas no GenBank (HPV-31 – J04353.1).

**Figura 9.** Gel representativo demonstrando a digestão das variantes e protótipo de E6 do HPV31 do vetor pCI-neo, confirmando os clones. M: Marcador (GeneRuler 1 KB DNA Ladder- Thermo Scientific); variantes H60Y, T64A, K123R, A138V, R144G, protótipo e full respectivamente.



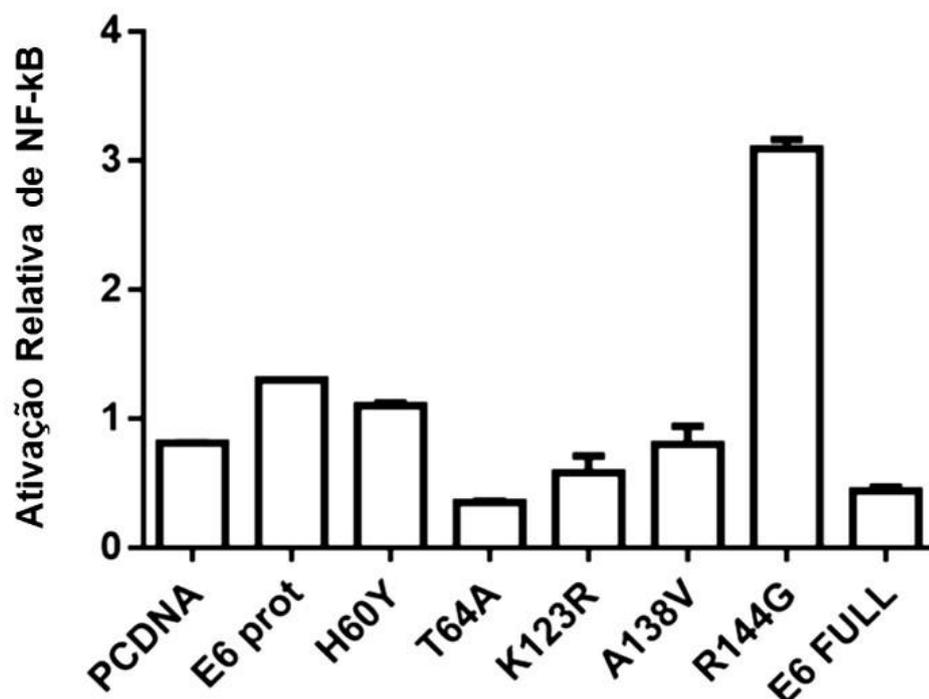
#### 4.3 TRANSFEÇÃO *IN VITRO* DE CÉLULAS EUCARIÓTICAS

Após a confirmação da subclonagem no veor de expressão, o DNA dos vetores recombinantes contendo E6 HPV-31 foram isoladas por maxipreparação e utilizados para transfecção das células eucarióticas HEK-293. Para a primeira etapa da transfecção a viabilidade celular foi de 97,7 % e na segunda etapa a viabilidade das células foi de 96%.

#### 4.4 ENSAIOS DE LUCIFERASE

Para investigar o efeito do E6 e de cada uma das suas variantes na via do NF- $\kappa$ B, as células HEK-293 foram transfectadas em triplicata com cada uma das variantes separadamente, (H60Y, T64A, K123R, A138V, E6 R144G) e uma amostra contendo todas as variantes (full). Os seus efeitos sobre a via NF- $\kappa$ B foram comparados com os encontrados em células expressando HPV-31 E6 sequência de referência (que foram transfectadas com protótipo) e células transfectadas com plasmídeo vazio). Dentre os resultados obtidos (Gráfico 1), a variante R144G apresentou maior ativação sobre a via NF- $\kappa$ B, seguida pelo E6 protótipo e H60Y enquanto a maior parte das variantes atuaram reprimindo a via.

**Gráfico 1.** Efeito do E6 HPV-31 na ativação da via NF- $\kappa$ B em células HEK293 transfectadas. Cada grupo foi transfectado com uma das construções das variantes do E6 (H60Y, T64A, K123R, A138V, R144G) ou com construção de referência E6 HPV-31 ou com a sequência apresentando todas as variantes. As barras representam a média de cada condição realizada em duplicada. Barras de erro indicam um erro padrão médio.



**Tabela 1.** A análise estatística foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA) seguida de correção de Bonferroni, em que  $p < 0,05$  foi considerado significativo. (NS= Não significativo, \*= diferença estatística significativa).

Teste de Comparação Múltipla de Bonferroni	Significante: $p < 0.05$
pCDNA vs 31-E6 Prot.	*
pCDNA vs Full	NS
pCDNA vs H60Y	NS
pCDNA vs T64A	NS
pCDNA vs K123R	NS
pCDNA vs A138V	NS
pCDNA vs R144G	*
31-E6 Prot. vs Full	*

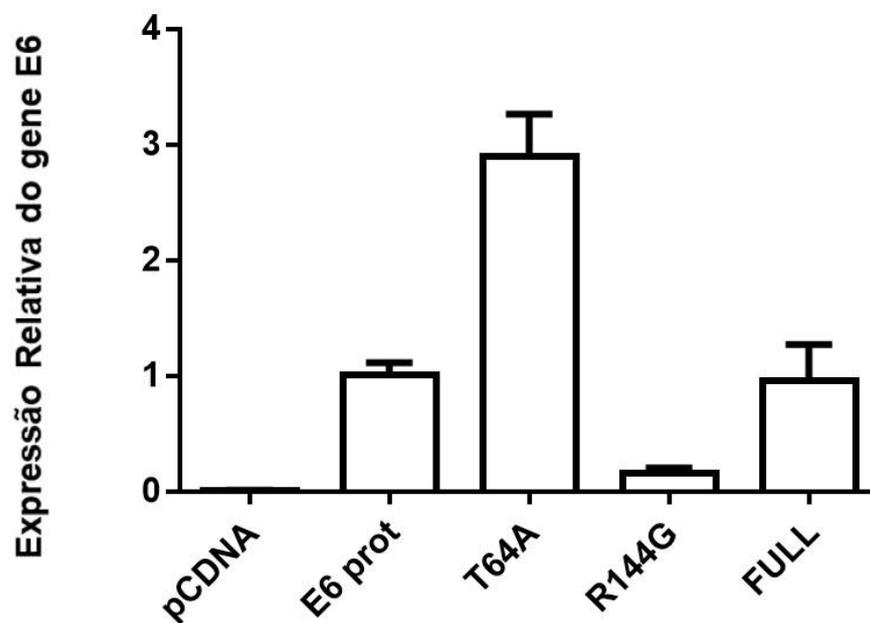
31-E6 Prot. vs H60Y	NS
31-E6 Prot. vs T64A	*
31-E6 Prot. vs K123R	*
31-E6 Prot. vs A138V	*
31-E6 Prot. vs R144G	*
H60Y vs Full	*
H60Y vs T64A	*
H60Y vs K123R	*
H60Y vs A138V	NS
H60Y vs R144G	*
T64A vs Full	NS
T64A vs K123R	NS
T64A vs A138V	NS
T64A vs R144G	*
E6-3 vs Full	*
K123R vs A138V	NS
K123R vs R144G	*
A138V vs Full	NS
A138V vs R144G	*
R144G vs Full	*

#### 4.5 ENSAIO DE RT-qPCR

Para investigarmos a atividade transcricional das diferentes variantes de E6 HPV-31, foi realizada uma avaliação quantitativa do perfil de transcrição das variantes que indicaram maiores mudanças frente a ativação relativa de NF- $\kappa$ B (que foram T64A e R144G). Os valores das expressões das variantes foram comparados a sequência protótipo e as variantes T64A e R144G apresentaram diferenças significantes em seus valores de expressão (Gráfico 2). Nossos dados da análise da atividade transcricional, demonstraram que dentre os valores das expressões, a variante R144G, apresentou uma menor expressão nos níveis do mRNA. Enquanto a variante T64A apresentou níveis aumentados de expressão relativa. Os resultados de Wu e colaboradores (2018), demonstraram que os níveis de

expressão dos RNAm em E6 e E7 aumentaram significativamente em pacientes positivos para HPV-16 (Wu *et al.*, 2018).

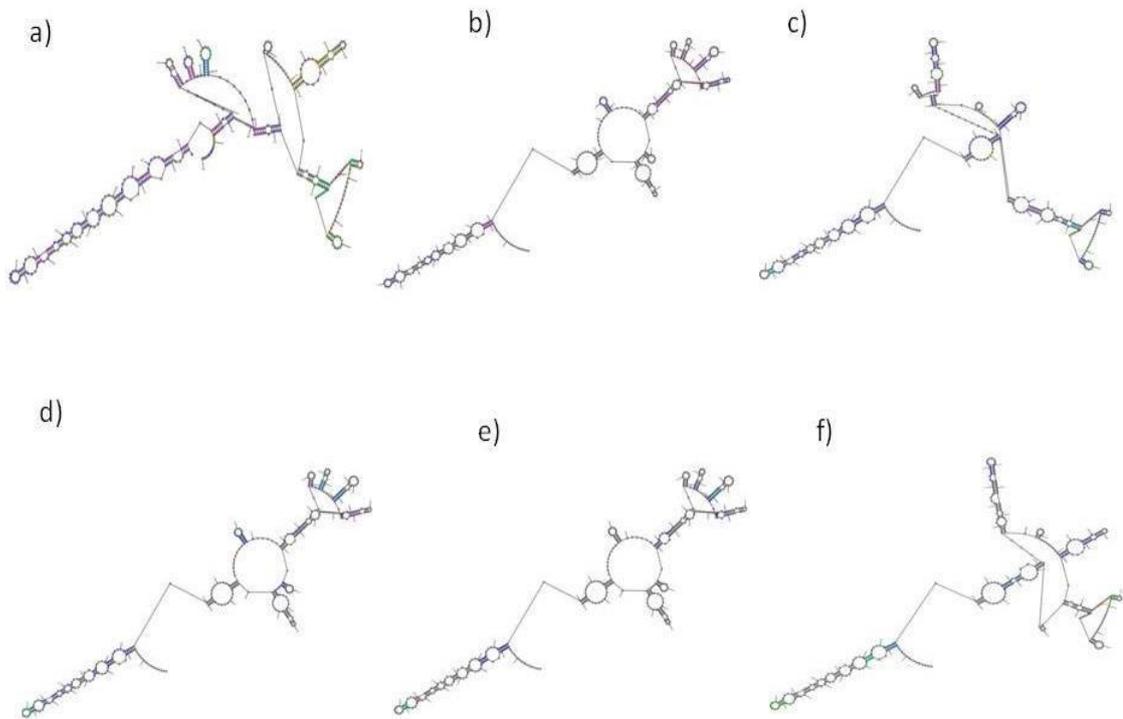
**Gráfico 2.** Expressão de RNAm das variantes do E6 HPV-31. Após a extração de RNA das células transfectadas com as variantes (T64A, R144G) respectivamente e comparadas com a sequência protótipo e com a sequência apresentando todas as variantes. A normalização da expressão gênica utilizou os genes de referência GAPDH e ACTB. Cada reação foi realizada em duas repetições biológicas, incluindo um controle negativo para cada gene. A expressão gênica foi calculada por  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ .



#### 4.6 ANÁLISE DA ESTRUTURA DO RNAm

Os mRNAs das variantes e da sequência de referência do E6 do HPV-31 não apresentaram diferenças em relação as estruturas secundárias formadas (Figura 10).

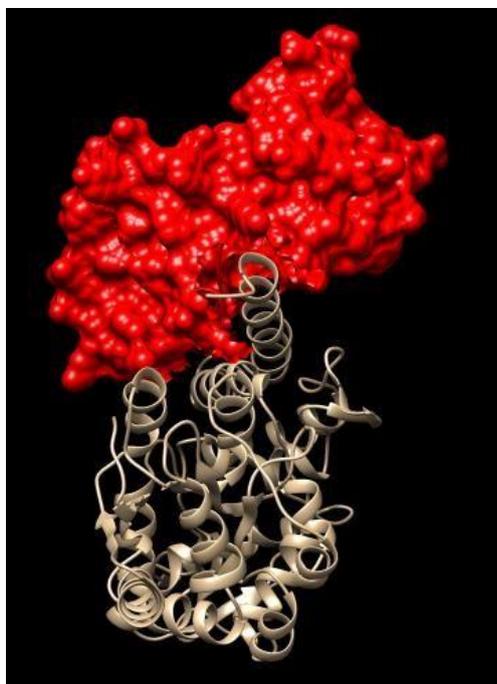
**Figura 10.** Estrutura do RNAm do oncogene E6 do HPV-31 :a) E6 all variants. b) sequência de referência para E6. c) variante E6 T64A . d) variante E6 K123R . e) variante E6A138V. f) variante E6 R144G.



#### 4.7 ANÁLISE DE ANCORAGEM MOLECULAR ENTRE AS VARIANTES DE E6 HPV-31 E E6AP

A estrutura de proteína do protótipo de E6 do HPV-31 e as variantes em E6 do HPV-31 foram modeladas. Com estes modelos, uma análise de ancoragem molecular foi realizada para testar se as alterações de aminoácidos poderiam afetar o reconhecimento de E6AP pela proteína E6 HPV-31. Foi possível observar que todos os modelos de E6 HPV-31 foram capazes de interagir com o E6AP (Figura 13). A Tabela 3 mostra a energia de ligação de pyDock de todas as interações proteína-proteína. No entanto, é possível observar que as variantes T64A, K123R, A138V, R144G foram capazes de se ligar ao E6AP com menor energia pyDock quando comparados com a proteína do protótipo de E6 HPV-31, indicando que esses polimorfismos podem aumentar a energia de ligação destas proteínas das variantes E6 HPV-31 ao E6AP.

**Figura 11.** Interação proteína-proteína entre a variante E6\_T64A (em vermelho) e E6AP (em dourado). O motivo LXXLL está interagindo com a hélice ligante da proteína E6, na bolsa E6 hidrofóbica.



**Tabela 2.** Energia de ligação calculada a partir das interações proteína-proteína entre HPV-31 E6 e E6AP.

<b>stras HPV31</b>	<b>Eletrostática</b>	<b>Dessolvatação</b>	<b>VdW</b>	<b>reIRST</b>	<b>Total</b>
Protótipo	-31.386	16.241	60.472	84.615	-93.713
T64A	-37.555	4.459	123.324	76.923	-97.687
K123R	-25.908	-4.210	23.560	69.231	-96.993
A138V	-32.095	12.239	60.001	84.615	-98.471
R144G	-16.589	3.233	41.333	76.923	-86.146
<i>Full</i>	-24.331	9.047	56.499	84.615	-94.249

## 5 DISCUSSÃO

No nosso estudo foram escolhidas cinco variantes do gene E6 nas seguintes posições: C285T, A297G, A475G, C520T, C537G, de acordo com o aminoácido alterado e os códons, podem ser denominados de: H60Y, T64A, K123R, A138V, R144G, respectivamente. Todas estas alterações não-sinônimas já foram descritas na literatura (Chagas *et al.*, 2011; Chagas *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2018).

A maioria dos estudos com variantes, foram unicamente voltados a estudos de identificação e distribuição nas populações. Diante disso, os estudos funcionais das variantes dos HPVs se tornaram relevantes para compreensão da repercussão biológica destas alterações, levando em consideração o potencial oncogênico, dessas variantes (Villa *et al.* 2006; Villa *et al.*, 2000; Sichero *et al.*, 2007). Evidências experimentais suportam a teoria de que variações intra-típicas podem afetar o potencial carcinogênico dos HPVs (Bernard *et al.*, 2006). Apesar da relevância desses estudos, existem poucos trabalhos de avaliação funcional feitos no Brasil (Villa *et al.* 2006; Freitas *et al.*, 2012; Chagas *et al.*, 2013; Gurgel *et al.*, 2013).

Pouco se sabe sobre o efeito funcional das variantes presentes em E6 HPV-31, esta é a primeira vez que as variantes E6 do HPV-31 foram avaliadas no Brasil e informações sobre a variabilidade do gene E6 do HPV-31 ainda são muito limitadas. Este estudo demonstrou que algumas variantes de E6 podem estar atuando no aumento da atividade da via NF- $\kappa$ B, outras podem estar atuando na redução da atividade da via. O trabalho de Zacapala e colaboradores (2016), destacou que variantes da oncoproteína E6 HPV-16 demonstraram alterações nos processos relacionados à carcinogênese (Zacapala *et al.*, 2016).

Esse tipo de alteração na função biológica das proteínas é possível, porque um único polimorfismo pode afetar a função de uma proteína inteira. Um estudo inicial realizado com HPV-16, na população sueca descobriu que os cânceres invasivos estavam mais relacionados a variante L83V, apenas um pequeno número estava relacionado ao protótipo (Lichtig *et al.*, 2006).

O trabalho de Ferenczi (2016) demonstrou que o protótipo e variantes (provenientes de mutagênese) do oncogene E6 HPV-31 foram capazes de diminuir a estabilidade da proteína supressora tumoral, p53, e o E6 protótipo apresentou uma atividade mais fraca em comparação com E6 variante, na degradação de p53.

Um possível fator que possa ter sido responsável pelas diferenças funcionais entre variantes em E6, seria as alterações de aminoácidos proporcionadas pela mudança da base, podendo resultar assim, em mudança na conformação da proteína codificada.

Variantes do E6 HPV-16 demonstraram ter funções variáveis na ligação e degradação da p53, assim como a inibição da diferenciação dos queratinócitos, e a modulação da apoptose (Asadurian *et al.*, 2007; Lichtig *et al.*, 2006; Niccoli *et al.*, 2012; Richard *et al.*, 2010; Sichero *et al.*, 2012; Stoppler *et al.*, 1996; Zehbe *et al.*, 2011; Zehbe *et al.*, 2009).

A via NF- $\kappa$ B desempenha um papel importante na resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro. Esta via, é frequentemente alvo de diversos vírus, incluindo o HPV (Brady e Bowie, 2014; Correia *et al.*, 2013; Lemon, 2010; Vandermark *et al.*, 2012). As proteínas E6 e E7 do HPV-16 regulam a expressão de NF- $\kappa$ B, mas há dados divergentes se estimulam (James *et al.*, 2006; Nees *et al.*, 2001) ou suprimem a ativação de NF- $\kappa$ B (Havardetal., 2005). A via NF- $\kappa$ B pode atuar como um supressor tumoral nos estágios iniciais da infecção pelo HPV, mas parece estar sob baixa regulação durante o início do câncer (Pallavi *et al.*, 2015). Esses dados confirmam que NF- $\kappa$ B parece ser um ator importante no desenvolvimento do câncer do colo do útero (Tilborghs *et al.*, 2018).

Os valores da expressão relativa do oncogene E6 HPV-31, para os polimorfismos avaliados, T64A, R144G e *Full*, indicaram que a variante R144G, apresentou um nível reduzido na expressão do RNAm, em relação ao protótipo, a amostra contendo todas as variantes (*Full*), e sobretudo em relação a variante T64A, que por sua vez, apresentou níveis aumentados na expressão do RNAm. A variante R144G foi identificada por Chagas e colaboradores (2013), e está localizada em regiões de epítomos de células B e T, podendo influenciar o reconhecimento imunológico de células infectadas pelo HPV (Chagas *et al.*, 2013). Estes resultados sugerem que existem modificações nos padrões de expressão gênica, na presença das variantes.

Os níveis de expressão do RNAm em E6 e E7 aumentaram significativamente em pacientes positivos para HPV-16 (Wu *et al.*, 2018), pouco se sabe a respeito do HPV-31. Níveis alterados de RNA mensageiro, podem estar associados a o grau de estabilidade do RNA e a efetividade da interação da proteína com componentes da

via NF- $\kappa$ B. A degradação do RNA mensageiro (RNAm) está associada a regulação dos níveis de transcrição na célula, e consiste em um fator relevante na modulação da expressão gênica (Presnyac *et. al.*, 2015). Ao comparar as variantes T64A e R144G entre si, através do teste de comparação múltipla de Bonferroni, foi visto que havia diferença significativa entre essas variantes, conforme visto na tabela 1.

Os dados apresentados nesse estudo, da ativação relativa de NF- $\kappa$ B demonstram que dentre os polimorfismos estudados, (H60Y, T64A, K123R, A138V, R144G e *Full*), podemos destacar o R144G, que atuou no aumento significativo da atividade da via NF- $\kappa$ B. Assim como os resultados de Hussain e colaboradores (2012), mostraram que as oncoproteínas E6 e E7 do HPV-38 ativam a via NF- $\kappa$ B, e atuam cooperando com o TNF- $\alpha$  na ativação da via, através da fosforilação de I $\kappa$ B e p65 (Hussain *et. al.*, 2012).

Estes dados corroboram com os dados iniciais de Li e colaboradores (2002), em que destacam o papel do oncogene E6 sobre a ativação de NF- $\kappa$ B, e sua ativação excessiva em células do sistema imune e macrófagos frequentemente causa inflamação crônica (Li *et al.*, 2002).

No entanto, nossos dados sugerem que a expressão do *Full* (contendo simultaneamente H60Y, T64A, K123R, A138V, R144G) reduz a atividade da via, assim como as variantes H60Y, T64A, K123R e A138V, que também indicam estar reduzindo a atividade de NF- $\kappa$ B. A análise estatística mostrou diferença significativa entre as variantes individuais presentes em E6 (H60Y, T64A, K123R, A138V, R144G) e o controle (E6 protótipo do HPV-31) com valor de  $p < 0.0001$ , exceto pela variante H60Y.

De acordo com os resultados, apresentados neste estudo, da ativação relativa de NF- $\kappa$ B e da expressão relativa de E6, verificou-se que a variante T64A apresentou mais RNA e atuou reprimindo a via, possivelmente, devido a seus níveis aumentados de transcritos, pois na presença de mais proteínas, pode estar havendo maior interação, assim atuando na repressão da via. A ativação de NF- $\kappa$ B é um passo crítico para a proliferação celular, a inibição mediada por E6 / E7 da atividade de NF- $\kappa$ B é provavelmente um recurso viral para permitir a imortalização (Vandermark *et al.*, 2012). As oncoproteínas E6 e E7 são produzidas para prevenir a parada e apoptose do crescimento celular e retardar a diferenciação, inativando p53 e a proteína retinoblastoma (pRB) (Tummers, 2015).

O HPV manipula várias vias moleculares e celulares nas células do hospedeiro para evitar vigilância imunológica do hospedeiro e respostas imunes antivirais. A supressão imune mediada por HPV durante a persistência do vírus pode também contribuir para a evasão de células tumorais de respostas imunes antitumorais (Westrich *et. al.*, 2017).

Por sua vez, nossos resultados frente a variante R144G demonstraram níveis reduzidos de RNA, porém a mesma, atuou no aumento da ativação da via NF- $\kappa$ B, o que pode estar relacionado com fato de apresentar maior interação com o alvo da via (I $\kappa$ B). No estudo de Mesplède e colaboradores (2011), os resultados de diferentes ensaios de luciferase demonstram que todas as variantes do E6 HPV-16 (R10G, L83V e R10G / L83V) foram ligeiramente mais eficientes que o protótipo na degradação de p53. Em contraste, entre as proteínas codificadas por variantes em E6 HPV-33, a A138V apresentou atividade de degradação da p53 significativamente maior que o protótipo. Estes resultados confirmam que variantes naturais do E6 HPV-16 diferem em sua capacidade de promover a rotatividade de p53. (Mesplède *et. al.*, 2011).

Os resultados da ativação relativa de NF- $\kappa$ B, sugerem que a alteração T64A pode mais ser expressiva em relação a R144G. Pois a apesar da R144G (isolada) ter aumentado drasticamente a atividade da via, quando em conjunto com a T64A e com as demais variantes (na amostra *full*), apresentou uma redução na atividade da via. O que pode indicar, que a variante T64A pode estar atuando sobre a R144G e as demais variantes.

A fim de verificar se as variantes do oncogene E6 podem gerar estruturas alternativas de RNAm em relação as sequências de referência do HPV 31, cada estrutura secundária de RNAm foi prevista (Figura 10), todavia, os mRNAs das variantes e da sequência de referência do E6 do HPV-31 não apresentaram diferenças em relação as estruturas secundárias formadas. As estruturas secundárias pré-RNAm podem influenciar uma série de etapas de processamento, incluindo splicing alternativo. Uma vez que a maioria das proteínas reguladoras de *splicing* se ligam ao RNA de fita simples, a presença de RNA em fitas duplas pode impedir sua ligação (Hiller *et al.*, 2007), o que pode influenciar a produção final da proteína E6.

Nos resultados da modelagem foi possível observar que todos os modelos de E6 HPV-31 foram capazes de interagir com o E6AP. As variantes T64A, K123R, A138V, R144G foram capazes de se ligar ao E6AP com menor energia pyDock quando comparados com a proteína do protótipo de E6 HPV-31, indicando que esses polimorfismos podem aumentar a energia de ligação destas proteínas das variantes E6 HPV-31 ao E6AP. Estes dados demonstram um possível maior potencial oncogênico destas variantes, já que a proteína E6 interage com a E3 ubiquitina ligase celular E6AP e isso altera a especificidade do substrato de E6AP e medeia a ligação de E6 / E6AP a p53, assim E6AP pode subsequentemente ubiquitinar p53, que por sua vez é degradado pelo proteassoma (Stutz *et. al.*, 2015).

O presente estudo, aborda pela primeira vez, uma análise funcional de variantes no oncogene E6 do HPV-31, em que algumas alterações atuaram no aumento da atividade de NF- $\kappa$ B, como a R144G, e outras na redução da atividade dessa via, como a T64A. Mais estudos dos efeitos *in vitro* dessas alterações, tendo em vista aspectos imunológicos, são necessários, para afirmar com clareza o papel desses polimorfismos sobre NF- $\kappa$ B.

## 6 CONCLUSÃO

- Neste estudo encontramos uma das primeiras evidências sobre a atuação das variantes presentes em E6 HPV-31, sobre a ativação ou repressão da via NF- $\kappa$ B em células HEK-293.
- A análise funcional de células HEK-293 transfectadas com o gene E6 de HPV-31 apresentando as variantes H60Y, K123R, A138V e R144G, apresentaram uma ativação da via NF- $\kappa$ B. Entretanto, a variante R144G apresentou maior ativação da via e as variantes T64A e Full apresentaram depressão na via.
- A expressão do mRNA de E6 contendo a variante T64A foi mais expresso em células transfectadas enquanto que o mRNA da variante R144G foi menos expresso.
- As variantes T64A, K123R, A138V, R144G foram capazes de se ligar ao E6AP com menor energia quando comparados com a proteína do protótipo de E6 HPV-31, indicando que esses polimorfismos podem aumentar a energia de ligação das proteínas das variantes E6 HPV-31 ao E6AP.
- A análise de estrutura do RNA evidenciou que não há diferenças eminentes entre a estrutura de E6 selvagem (protótipo) e as variantes estudadas (H60Y, T64A, K123R, A138V, R144G).
- Com este estudo, foi visto que algumas variações no gene E6 do HPV-31 foram capazes de ativar a via NF- $\kappa$ B enquanto outras de reduzir a atividade da via. Ao mesmo tempo que tais variações ocasionaram em baixa ou alta expressão de RNAm a depender do tipo de interação com E6AP e outros possíveis fatores que possam estar associados a este evento.

## REFERÊNCIAS

- BERNARD, HANS-ULRICH et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**, v. 401, n. 1, p. 70-79, 2010.
- BERNARD, HANS-ULRICH; et al.. Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications. **International journal of cancer**, v. 118, n. 5, p. 1071-1076, 2006.
- BERNARD, XAVIER et al. Proteasomal degradation of p53 by human papillomavirus E6 oncoprotein relies on the structural integrity of p53 core domain. **PloS one**, v. 6, n. 10, p. e25981, 2011.
- BOSCH, F. XAVIER; DE SANJOSÉ, SILVIA. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer—burden and assessment of causality. **JNCI monographs**, v. 2003, n. 31, p. 3-13, 2003.
- CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK et al. Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer. **Nature**, v. 543, n. 7645, p. 378, 2017.
- CHAGAS, BARBARA SIMAS. Avaliação de possível alteração nos genes E6 e E7 do papilomavírus humano tipos 18 e 31 e sua relação com o polimorfismo do códon 72 do gene TP53 em lesões de colo de útero de pacientes da região Nordeste do Brasil. 2010. 93 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Genética, **Universidade Federal de Pernambuco**, Recife, 2010. Disponível em: <<https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/6794>>. Acesso em: 17 mar. 2019.
- CHELLIAH V, BLUNDELL TL, FERNÁNDEZ-RECIO J. Efficient restraints for proteinprotein docking by comparison of observed amino acid substitution patterns with those predicted from local environment. **J Mol Biol**. v.357, n.5, p.1669-82. 2006.
- CHEN, LIN-FENG; GREENE, WARNER C. Shaping the nuclear action of NFκB. **Nature Reviews Molecular cell biology**, v. 5, n. 5, p. 392, 2004.
- CHENG TM, BLUNDELL TL, FERNANDEZ-RECIO J. pyDock: electrostatics and desolvation for effective scoring of rigid-body protein-protein docking. **Proteins**.v.68, n.2, p.503-15. 2007.
- COMBITA, ALBA LUCIA et al. Gene transfer using human papillomavirus pseudovirions varies according to virus genotype and requires cell surface heparan sulfate. **FEMS microbiology letters**, v. 204, n. 1, p. 183-188, 2001.
- D. XU, Z. YANG. Improving the Physical Realism and Structural Accuracy of Protein Models by a Two-step Atomic-level Energy Minimization, **Biophysical Journal**. V. 101,p.2525-2534. 2011

DA SILVA, MFPT BALDEZ et al. Frequency of human papillomavirus types 16, 18, 31, and 33 and sites of cervical lesions in gynecological patients from Recife, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, n. 1, p. 462-466, 2012.

DA SILVA, MFPT BALDEZ et al. HPV31 and HPV33 incidence in cervical samples from women in Recife, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 4, p. 14371443, 2009.

DAYYANI, FARSHID et al. Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). **Head & neck oncology**, v. 2, n. 1, p. 15, 2010.

DIAMOND, G.; BECKLOFF, N.; RYAN, L. K. Host defense peptides in the oral cavity and the lung: similarities and differences. **Journal of dental research**, v. 87, n. 10, p. 915-927, 2008.

DOORBAR J. The papillomaviruses life cycle. **J Clin Virol**. V.32, p.7-15. 2005

ELLIS JR, et al. 1995. The association of an HPV 16 oncogene variant with HLA-B7 has implications for vaccine design cervical cancer. **Nat Med** v.1, p.464-470. 1995

FAVRE M, RAMOZ N, ORTH G. Human papillomaviruses: general features. **Clin Dermatol**; v. 5, n.2, p.181-98. 1997.

FERENCZI, ANNAMÁRIA et al. Phylogenetic and functional analysis of sequence variation of human papillomavirus type 31 E6 and E7 oncoproteins. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 43, p. 94-100, 2016.

FJOSE A., ELLINGSEN S., WARGELIUS A., SEO H.C. RNA interference: mechanisms and applications. **Biotechnology annual review**. v.7,p. 31-57. 2001

GABB HA, JACKSON RM, STERNBERG MJ. Modelling protein docking using shape complementarity, electrostatics and biochemical information. **J Mol Biol**. v.272, n.1,p.106-20. 1997.

GIROGLOU T, et al. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. **J Virol**. v.75, n.3, p.1565-1570 (2001)

GURGEL, APA DINIZ et al. Prevalence of human papillomavirus variants and genetic diversity in the L1 gene and long control region of HPV16, HPV31, and HPV58 found in North-East Brazil. **BioMed research international**, 2015a.

GURGEL, APAD et al. Prevalence of Human Papillomavirus Variants and Genetic Diversity in the L1 Gene and Long Control Region of HPV16, HPV31, and HPV58 Found in North-East Brazil. **Biomed Research International**, v. 2015, p.1-12, 2015b.

HANG, JIANHUI et al. Genetic variability in E5, E6, E7 and L1 genes of human papillomavirus type 31. **Molecular Medicine Reports**, [s.l.], p.5498-5507, 2018.

HATANO, TAKASHI et al. Identification of human papillomavirus (HPV) 16 DNA integration and the ensuing patterns of methylation in HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma cell lines. **International journal of cancer**, v. 140, n. 7, p. 1571-1580, 2017.

HOWLEY P, LOWY D. Virology. 5th. **Philadelphia. Lippincot Williams e Wilkins**, 2007.

HSU, YAW-WEN et al. Genotype-specific methylation of HPV in cervical intraepithelial neoplasia. **Journal of gynecologic oncology**, v. 28, n. 4, 2017.

HUSSAIN, ISHRAQ et al. NF- $\kappa$ B protects human papillomavirus type 38 E6/E7 immortalized human keratinocytes against tumor necrosis factor alpha and UV mediated apoptosis. **Journal of virology**, v. 85, n. 17, p. 9013-9022, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Câncer. Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: [http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo\\_uterio/definicao](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo_uterio/definicao) Acesso em: 26 setembro. 2018.

JAMES MA, LEE JH, KLINGELHUTZ AJ. HPV16-E6 associated hTERT promoter acetylation is E6AP dependent, increased in later passage cells and enhanced by loss of p300. **Int J Cancer**. v.119, n.8, p.1878-85. 2006.

JAMES, M.A., LEE, J.H., KLINGELHUTZ, A.J., Human papillomavirus type 16 E6 activates NF-kappaB, induces cIAP-2 expression, and protects against apoptosis in a PDZ binding motif-dependent manner. **J. Virol**. v.80, n.11, p.5301-5307. 2006.

JEMAL A, et al. Global cancer statistics. **J Clin** v.61, n.1, p.69-90. 2011.

JIMENEZ, AMJ et al. Regulation of human oncogenes' expression by human papillomavirus (HPV) 16 E6 protein. **Journal of Metallomics and Nanotechnologies**, v. 1, p. 25-29, 2015.

JIMENEZ-GARCIA B., PONS C. AND FERNANDEZ-RECIO J. "pyDockWEB: a web server for rigid-body protein-protein docking using electrostatics and desolvation scoring". **Bioinformatics**. v.29, n.13, p.1698-1699. 2013.

LASKOWSKI RA. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures, **J. Appl. Cryst.**v.26,p.283-291. 1993.

LAUCK F, et al. RosettaBackrub - A web server for flexible backbone protein structure modeling and design. **Nucleic Acids Research**, V.38, n.2, p.569-575, 2010.

LAW, PTY et al. Oncogenic comparison of human papillomavirus type 58 E7 variants. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 23, n. 2, p. 15171527, 2019

LAZARCZYK M, et al. The E6 and E7 proteins as a natural barrier against papillomaviruses:

a new insight into the pathogenesis of human papillomavirus infections. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.73, p.348-370. 2009.

LEE K, et al. Distribution of human papillomavirus 16 E6, L1, L2 and E2 gene variants in pre-malignant cervical disease. **Virus Res**.v.131, p106-110. 2008.

LI Q, VERMA IM. NF- $\kappa$ B regulation in the immune system. **Nat Rev Immunol**. v.2: p.331-367. 2002.

LIZANO M, BERUMEN J, GARCIA-CARRANCA A. HPV-related carcinogenesis: Basic concepts, viral types and variants. **Arch Med Res**, v.40, p428-434. 2009.

LONDESBOROUGH P, et al. Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities. **Int J Cancerv**.69, p.364-368. 1996.

LORENZATO F, et al. The use of human papillomavirus typing in detection of cervical neoplasia in Recife (Brazil). **Int J Gynecol Cancer**. v.10, n.2,p.143-150. 2000.

MARTINS TR,et al. HPV genotype distribution in Brazilian women with and without cervical lesions: correlation to cytological data. **Virolog J**.v.12, n.13, p138. 2016.

MESPLÈDE, THIBAUT et al. p53 degradation activity, expression, and subcellular localization of E6 proteins from 29 human papillomavirus genotypes. **Journal of virology**, v. 86, n. 1, p. 94-107, 2012.

NAKAGAWA, JTT; SCHIRMER, J; BARBIERI, M. Vírus HPV e câncer de colo de útero. **Revista Brasileira de Enfermagem**, [s.l.], v. 63, n. 2, p.307-311, 2010.

PALLAVI, SINGHAL et al. NFKB1/NFKB1a polymorphisms are associated with the progression of cervical carcinoma in HPV-infected postmenopausal women from rural area. **Tumor Biology**, [s.l.], v. 36, n. 8, p.6265-6276, 2015.

PARK MH,HONG JT. Roles of NF- $\kappa$ B in Cancer and Inflammatory Diseases and Their Therapeutic Approaches. **Cells**. V.29, n.5, 2016.

RICHARD C, et al. The immortalizing and transforming ability of two common human papillomavirus 16 E6 variants with different prevalence in cervical cancer. **Oncogene**, v.29, p.3435-3445. 2010.

SALI A; BLUNDELL T L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **J Mol Biol**. v.234,n.3, p.779–815. 1993.

SANJOSE, SILVIA DE et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. **The Lancet Oncology**, [s.l.], v. 11, n. 11, p.1048-1056, 2010.

- SHOJI M., et al. RNA interference during spermatogenesis in mice. **Developmental Biology**. v.282, p.524-534. 2005.
- SILVA AMT, AMARAL MVT, CRUZ AD. HPV e câncer: O papel do papilomavírus humano na carcinogênese. **Biotecnol Ciênc Desenvol**. v.29, p.48-54. 2003.
- SOUTO R, FALHARI JPB, DA CRUZ AD. O papilomavírus humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. **Rev Bras Cancerologia**; v.51, p.155-160. 2005.
- STADEN R. The Staden sequence analysis package. **MolBiotechnol**.v.5, n.3, p.23341. 1996.
- STÖPPLER, M. CONRAD et al. Natural variants of the human papillomavirus type 16 E6 protein differ in their abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation. **Journal of virology**, v. 70, n. 10, p. 6987-6993, 1996.
- STUBENRAUCH F, LAIMINS LA. Human papillomavirus cycle: Active and latent phases. **Cancer Biol**. v.9, p.379-386. 1999.
- STUTZ, CHRISTINA et al. Intracellular analysis of the interaction between the human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein and inhibitory peptides. **PloS one**, v. 10, n. 7, p. e0132339, 2015.
- TAMURA K,et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods.**Mol Biol Evol**.v.28, n.10, p.2731-9. 2011.
- TAN, SHYH-HAN et al. Nuclear matrix attachment regions of human papillomavirus type 16 point toward conservation of these genomic elements in all genital papillomaviruses. **Journal of virology**, v. 72, n. 5, p. 3610-3622, 1998.
- THOMPSON JD,HIGGINS DG,GIBSON TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positionspecific gap penalties and weight matrix choice.**NucleicAcids Res**.v.22, p.4673-80. 1994.
- TIDY, JA; VOUSDEN, KH; FARRELL, PJ. Relation between infection with a subtype of HPV16 and cervical neoplasia. **The Lancet**, v. 333, n. 8649, p. 1225-1227, 1989.
- TILBORGHS, SAM et al. The role of Nuclear Factor-kappa B signaling in human cervical cancer. **Critical Reviews In Oncology/hematology**, v. 120, p.141-150, 2017.
- TUMMERS, BART et al. The interferon-related developmental regulator 1 is used by human papillomavirus to suppress NFκB activation. **Nature communications**, v. 6, p. 6537, 2015.
- VAN GUNSTEREN, WF. et al. Biomolecular simulation: the {GROMOS96} manual and user guide. 1996.

VANDERMARK, ER. et al. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins alter NF $\kappa$ B in cultured cervical epithelial cells and inhibition of NF- $\kappa$ B promotes cell growth and immortalization. **Virology**, v. 425, n. 1, p. 53-60, 2012.

VOUSDEN, K. Interactions of human papillomavirus transforming proteins with the products of tumor suppressor genes. **The FASEB journal**, v. 7, n. 10, p. 872879, 1993.

WESTRICH, JOSEPH A.; WARREN, CODY J.; PYEON, DOHUN. Evasion of host immune defenses by human papillomavirus. **Virus research**, v. 231, p. 21-33, 2017.

WU, MING-ZHE et al. Diagnostic Utility of HPV16 E6 mRNA or E7 mRNA Quantitative Expression for Cervical Cells of Patients with Dysplasia and Carcinoma. **Cell Transplantation**, v. 27, n. 9, p.1401-1406, 2018.

XI, LONG FU et al. Risk for high-grade cervical intraepithelial neoplasia associated with variants of human papillomavirus types 16 and 18. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 16, n. 1, p. 4-10, 2007.

ZACAPALA-GÓMEZ, Ana Elvira et al. Changes in global gene expression profiles induced by HPV 16 E6 oncoprotein variants in cervical carcinoma C33-A cells. **Virology**, v. 488, p. 187-195, 2016.

ZEHBE, INGEBORG et al. Rare human papillomavirus 16 E6 variants reveal significant oncogenic potential. **Molecular Cancer**, v. 10, n. 1, p.77-90,2011.

ZUR HAUSEN, Harald. Papillomavirus infections—a major cause of human cancers. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1288, n. 2, p. F55-F78, 1996.