



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Bruna Stuqui

Caracterização funcional de *HTRA1* em linhagens celulares HPV
positiva e HPV negativa

São José do Rio Preto
2014

Bruna Stuqui

Caracterização funcional de *HTRA1* em linhagens celulares HPV
positiva e HPV negativa

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Área de Concentração - Virologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof^a Dr^a. Marília de Freitas
Calmon
Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Paula Rahal

São José do Rio Preto
2014

Stuqui, Bruna.

Caracterização funcional de HTRA1 em linhagens celulares HPV positiva e HPV negativa / Bruna Stuqui. -- São José do Rio Preto, 2014
59 f. : il., gráfs., tabs.

Orientador: Marília de Freitas Calmon

Coorientador: Paula Rahal

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências
Exatas

1. Virologia. 2. Vírus do papiloma. 3. Linhagens celulares.
4. Doenças do vírus do papiloma – Aspectos genéticos. 5. Expressão
gênica. I. Calmon, Marília de Freitas. II. Rahal, Paula. III. Universidade
Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências,
Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 616-006.6

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Bruna Stuqui

Caracterização funcional de *HTRA1* em linhagens celulares HPV
positiva e HPV negativa

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Área de Concentração - Virologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Profa. Dra. Marília de Freitas Calmon
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Profa. Dra. Carolina Colombelli Pacca
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP)

Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
28 de fevereiro de 2014

***“Nossa vida é um presente de Deus e o que fazemos dela é o nosso presente
a Ele”***

(São João Bosco)

DEDICO ESTE TRABALHO...

À minha família!

Em especial aos meus pais, Rubens Stuqui e Elisabete José Marchezini Stuqui, anjos que Deus colocou no meu caminho para me educar e me amar e que com certeza cumprem sua missão muito bem. Obrigada por todos os esforços para que eu atingisse meus objetivos, o respeito às minhas decisões e o apoio aos meus sonhos. Amo vocês e sempre estarei presente para ajudá-los!!!

As minhas irmãs, Tamires Stuqui e Maiara Stuqui, que a tempos já não são mais criancinhas, mas continuam pentelhando minha vida a cada oportunidade. Também amo vocês!!!

Sou muito feliz por fazer parte desta família!!!

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar claramente presente na minha vida, me dando força e sabedoria para conduzir cada dia.

Às minhas orientadoras Dra. Marília de Freitas Calmon e Profa. Dra. Paula Rahal, mais do que orientadoras, amigas que contribuíram em todas as fases desse trabalho e que me trouxeram muita experiência e amadurecimento.

À FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro.

À Dra. Luiza Lina Villa, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por ceder gentilmente a linhagem de queratinócitos imortalizados por HPV 16 (HF698) e pelas demais contribuições neste trabalho.

À Dra. Laura Sicheo, do Instituto de Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), por ceder gentilmente a linhagem de carcinoma cervical (C33) e pelas demais contribuições neste trabalho.

À Dra. Louise Chow, da Universidade de Alabama (EUA), por ceder gentilmente as linhagens Bosc 23 e Am-12.

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE -UNESP), pela oportunidade de adquirir conhecimentos valiosos e pela permissão do uso de suas dependências para realização de meu Mestrado.

Aos professores do Curso de Ciências Biológicas e do Programa de Pós Graduação em Microbiologia, pelo papel essencial na minha formação.

Ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia, pela disponibilidade e apoio.
Aos queridos companheiros de Laboratório de Estudos Genômicos Ana Beatriz, Ana Claudia, André, Bruno, Carina, Carol Bonfim, Carol Jardim, Cintia, Guilherme, Henrique, Jaqueline, Letícia, Lilian, Luis, Lucas, Mariana, Marina, Marina C. Valsechi, Natalia, Paola, Renata, Rodolfo, Stephane, obrigada pela amizade.

À Lenira, pela amizade e dedicação ao seu trabalho, que é fundamental ao laboratório.

Ao meu marido, André Luis Giacometti Conceição, que me acompanha à dez anos como namorado e amigo, onde aprendemos a crescer juntos e construir nosso futuro. Um grande companheiro, sempre cheio de incentivos, compreensão e carinho, com quem ainda possuo muitos sonhos a realizar.

Aos meus familiares e demais amigos, pelo apoio, pelo companheirismo e pelos momentos alegres proporcionados em minha vida.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	16
2. Objetivos.....	22
3. Material e Métodos	23
3.1. Clonagem e Sequenciamento.....	23
3.2. Isolamento do DNA plasmidial.....	23
3.3. Cultura de linhagens aderentes	24
3.4. Transfecção	24
3.5. Extração de RNA e síntese de cDNA	25
3.6. qPCR	25
3.7. Imuno-histoquímica	27
3.8. Ensaio de viabilidade celular	27
3.9. Ensaio de apoptose por citometria de fluxo	28
3.10. Análise do ciclo celular por citometria de fluxo	28
3.11. Seleção de linhagem estável de C33 contendo gene E6 de HPV	29
3.12. Ensaio de formação de colônia.....	31
3.13. Silenciamento transcricional de E6 com dsiRNA	32
3.14. Análises Estatísticas	34
4. Resultados.....	35
4.1. Clonagem, sequenciamento e isolamento do DNA plasmidial.....	35
4.2. Transfecção, extração de RNA e obtenção de cDNA	36
4.3. Análise da Expressão Gênica por PCR quantitativo	36
4.3.1. Expressão gênica de HTRA1	36
4.3.2. Expressão gênica de E6 e E7	37
4.4. Análise da expressão de HtrA1 por Imuno-histoquímica	38
4.5. Ensaio de viabilidade celular	39
4.5.1. Linhagens transfectadas com HTRA1.....	39

4.5.1. Linhagem HF698 transfectada com dsiRNA	40
4.6. Ensaio de formação de colônia.....	41
4.6.1. Linhagens celulares HF698 e C33	41
4.6.2. Linhagem estável de C33 contendo gene E6 de HPV	41
4.7. Ensaio de apoptose por Citometria de fluxo	43
4.8. Ensaio de ciclo celular por Citometria de fluxo	44
4.9. Silenciamento transcricional de E6 com dsiRNA	46
5. Discussão.....	47
6. Conclusões.	52
7. Referências Bibliográficas.....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reconstrução por criomicroscopia eletrônica do capsídeo icosaédrico do Papilomavírus humano e genoma de HPV 16.....	7
Figura 2. Modelo esquemático do ciclo replicativo viral no epitélio estratificado e progressão da infecção para malignidade.....	18
Figura 3. <i>Electropherogram quality analysis (Phred)</i>	35
Figura 4. Alinhamento da sequência após sequenciamento do clone de pCMV6/ <i>HTRA1</i> com a ORF de <i>HTRA1</i>	35
Figura 5. Valor da expressão gênica relativa em Log2 do gene <i>HTRA1</i> em amostras de tumor de pênis em HPV positivas e em linhagens HF698 e C33	37
Figura 6. Valor da expressão gênica relativa em Log2 do gene <i>HTRA1</i> em linhagem HF698 e C33 transfectada com <i>HTRA1</i>	37
Figura 7. Valor da expressão gênica relativa em Log2 de E6 e E7.....	38
Figura 8. Imunocitoquímica da proteína HtrA1	39
Figura 9. Ensaio de viabilidade celular.....	40
Figura 10. Ensaio de viabilidade celular após tratamento com dsRNAs	40
Figura 11. Ensaio de Formação de Colônia nas linhagens HF698 e C33.....	41
Figura 12. Valor da expressão relativa em Log2 do gene E6 e expressão proteica de p53 na linhagem C33 contendo E6 de HPV 16.....	42
Figura 13. Ensaio de Formação de Colônia nas linhagens estáveis C33 contendo E6 de HPV 16 ou vetor vazio	43
Figura 14. Ensaio de apoptose.....	44
Figura 15. Análise do ciclo celular.....	45
Figura 16. Silenciamento de E6 com dsRNAs.....	46

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

- BES:** Ácido N,N-Bis-(2-hidroxietil)-2-aminoetansulfônico
- BSA:** Soroalbumina bovina
- cDNA:** DNA complementar, do inglês complementary DNA
- DAB:** Solução 3,3'-diaminobenzidina
- DH5 α :** Bactérias *Escherichia coli* competentes
- DMSO:** Dimetilsulfóxido
- DNA:** Ácido Desoxirribonucleico, do inglês Deoxyribonucleic Acid
- dNTP:** Desoxirribonucleótidos 5'-trifosfatados
- dsiRNA:** RNA de interferência fita dupla
- D10:** Meio DMEM completo (antibiótico e soro fetal bovino 10%)
- E. coli:*** Bactéria *Escherichia coli*
- SFB:** Soro fetal bovino
- G418:** Antibiótico geneticina
- GAPDH:** Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
- h-TERT:*** do inglês Human telomerase reverse transcriptase
- HTRA1:*** do inglês High temperature requirement factor A1
- HPV:** Papilomavírus humano, do inglês Human Papillomavirus
- INCA:** Instituto Nacional do Câncer
- kDa:** Unidade de massa kilodalton
- KSFM:** Meio de cultura sem soro fetal bovino para queratinócitos
- LCR:** do inglês Long Control Region
- mg:** Miligrama
- ml:** Mililitro
- mM:** Milimolar
- mRNA:** Ácido ribonucleico mensageiro, do inglês Messenger Ribonucleic Acid
- MTT:** 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
- NF κ B:** Factor nuclear kappa B

nM: Nanomolar

NADH: Dinucleótido de nicotinamida adenina

NADPH: Dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato

NCBI: Centro de Informação sobre Biotecnologia Nacional, do inglês
National Center for Biotechnology Information

MTT: Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol -2-il]-2,5-difeniltetrazólio

ORF: Fase aberta de leitura, do inglês Opening Reading Frame

pb: Pares de bases

PBS: Tampão fosfato-salino, do inglês phosphate buffered saline

PCR: Reação em cadeia da polymerase, do inglês polymerase chain reaction

PDZ: Domínio C-terminal cujo nome deriva das três proteínas PSD-95,Dlg, e ZO-1 em que foi descoberto primeiramente.

pH: Potencial Hidrogeniônico de uma solução

Primer: Cadeia de ácidos nucleicos iniciadora da replicação

PVDF: do inglês polyvinylidene difluoride

qPCR: PCR em tempo real, do inglês quantitative PCR

RNA: Ácido ribonucléico

RNAi: RNA de interferência

rpm: Rotações por minuto

SDS: Dodecilsulfato de sódio, do inglês Sodium Dodecyl Sulphate

SFB: Soro fetal bovino

TBS-T: do inglês Tris-Buffered Saline and Tween 20

URR: do inglês upper regulatory region

µg: Micrograma

µl: Microlitro

RESUMO

O Papilomavirus humano (HPV) é um dos vírus mais prevalentes entre as infecções sexualmente transmissíveis e está associado com doenças malignas. Os HPVs de alto risco possuem proteínas, denominadas de E6 e E7, caracterizadas como oncoproteínas devido aos seus papéis na transformação celular e na inativação de supressores de tumor. Um dos mecanismos usados na transformação celular pela proteína E6 do HPV de alto risco é a interação do seu domínio carboxi-terminal, PDZ, com domínios PDZs presentes em algumas proteínas celulares, destinando-as à degradação. Uma proteína que está associada com várias condições patológicas e tem domínio PDZ é a protease HtrA1. Esta proteína é pouco expressa em alguns cânceres, sugerindo um papel supressor de tumor. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da superexpressão de HTRA1 em linhagem celular HPV16 positiva (HF698) e HPV negativa (C33). As linhagens celulares foram transfectadas com vetor contendo a ORF de HTRA1 ou vetor vazio. A superexpressão do mRNA e proteína foi confirmada por qPCR e imuno-histoquímica, respectivamente. As linhagens celulares transfectadas foram submetidas a ensaio de formação de colônia, de viabilidade celular, de apoptose e ciclo celular. As células C33 superexpressando HtrA1 formaram significativamente menos colônias e apresentaram redução de viabilidade celular comparadas as células sem expressão de HtrA1. Diferentemente, na linhagem HPV positiva ocorreu aumento no número de colônias nas células superexpressando HtrA1 e não houve diferença no ensaio de viabilidade celular. Esses resultados sugerem que os diferentes padrões observados nas duas linhagens celulares são decorrentes da presença do HPV na HF698 e da ausência na C33. A fim de confirmar se o aumento do número de colônias nas células HF698 superexpressando HtrA1 é decorrente da interação dessa proteína com E6, foi produzida linhagem estável de C33 com o gene E6 e realizado formação de colônia. As células C33 superexpressando E6 e HtrA1 apresentaram um maior

número de colônias comparado com C33 sem E6 superexpressando HtrA1. Através de ensaio de apoptose verificamos que nessas linhagens celulares HtrA1 não interfere na taxa de apoptose. Entretanto, por ensaio de ciclo celular verificou-se que na linhagem HPV positiva há uma porcentagem maior de células em G2/M na presença da ORF de HTRA1, indicando crescimento celular. Na linhagem C33 não houve diferença no número de células nas etapas do ciclo celular. Além disso, avaliamos se o silenciamento de E6 altera a expressão de HtrA1. Confirmamos por qPCR que E6 não exerce controle transcricional sobre HTRA1, da mesma forma, a superexpressão de HTRA1 não altera a expressão de E6 e E7. Esses resultados sugerem que a proteína E6 do HPV de alto risco interage com a proteína HtrA1, induzindo crescimento celular.

Palavras-chave: HTRA1. HPV de alto risco. E6.

ABSTRACT

The Human Papillomavirus (HPV) is one of the most prevalent virus among sexually transmitted infections and it is associated with some malignancies. High risk HPVs contain proteins, E6 and E7, characterized by oncoproteins due to their roles in cellular transformation and suppressor tumor inactivation. One of the mechanisms used in cell transformation by E6 protein from high-risk HPVs is the interaction of its carboxy-terminal domain, known as PDZ, with PDZs domains present in some cellular proteins, triggering them to degradation. A protein that is associated with various pathological conditions and has PDZ domain is the protease HtrA1. This protein is poorly expressed in some cancers, suggesting its tumor suppressor role. The aim of this study was to evaluate the effect of the HtrA1 overexpression in HPV 16 positive (HF698) and HPV negative (C33) cell lines. The cell lines were transfected with vector containing the HTRA1 ORF or empty vector. The mRNA and protein overexpression were confirmed by qPCR and immunohistochemical, respectively. The cell lines transfected were subjected to cell proliferation, viability, apoptosis and cell cycle assays. C33 cells expressing HtrA1 presented significantly fewer colonies and showed reduced viability than cells without HtrA1 expression. On the other hand, in HPV-positive cell line there was an increase in the number of colonies in cells expressing HtrA1 and there was no difference in the cell viability assay. These results suggest that the different patterns observed between the two cell lines studied may be due to the HPV presence in HF698 and its absence in C33 cells. To confirm if the increase in the number of colonies in HPV positive cells (HF698) overexpressing HtrA1 arises from the interaction of this protein with E6, stable lines of C33 containing gene E6 were produced and subsequently performed cell proliferation assay. C33 cells overexpressing E6 and HTRA1 showed an increased number of colonies compared with C33 without E6 overexpressing HtrA1. Apoptosis assay showed that HtrA1 not interfere with the apoptosis rate in these cell lines. However, through

the cell cycle assay was observed higher percentage of G2 / M cells in HPV positive cell line overexpressing HtrA1, indicating cell growth. In HPV negative cell line there was no difference in the number of cells in each stage of the cell cycle between cells transfected with empty vector or HTRA1. Furthermore, we evaluated whether E6 silencing alters the HTRA1 expression. qPCR showed that E6 not exerts transcriptional control over HTRA1, the same way, the HtrA1 overexpression does not alter the E6 and E7 expression. These results suggest that the HPV E6 protein of high-risk HPV interacts with protein HtrA1, inducing cell growth.

Keywords: HTRA1. High risk HPV. E6.

1. INTRODUÇÃO

A infecção por Papilomavírus humano (HPV) é muito comum e, em alguns casos, está associada a doenças malignas. Em muitas populações, mais de 50% das mulheres (até 80%) (EINSTEN et al., 2009) e homens sexualmente ativos são infectados por HPV em algum momento da vida (GIULIANO et al., 2008). Os HPVs são classificados como cutâneos ou mucosos de acordo com o sítio de infecção (BERNARD et al., 2010). Os tipos mucosos possuem diferenças genótípicas que permitem classificá-los como de baixo, intermediário ou alto risco oncogênico (TANG, 2002). HPVs que infectam mucosas ou epitélio escamoso podem causar hiperploriferações benignas, entretanto, infecções por HPVs de alto risco, com tropismo por tecido mucoso (HPV 16 e 18), podem ocasionar lesões intra-epiteliais de alto grau e cânceres, especificamente de colo de útero, peniano, anal e orofaringe. Em contraste, infecções por HPV de baixo risco, como HPV 6 e 11, raramente desencadeiam carcinogênese, sendo responsáveis por lesões benignas (HAWLEY-NELSON et al., 1989).

O carcinoma de colo de útero, um dos principais cânceres associados com a infecção por HPVs de alto risco, é um dos tipos de lesões malignas que mais causa a morte de mulheres em todo mundo, com aproximadamente 500.000 novos casos e 250.000 mortes a cada ano (COGLIANO et al., 2005; ARBYN et al., 2011). No Brasil, foram estimados 17.540 novos casos de câncer de colo de útero somente no ano de 2012 (INCA, 2013). A maioria das infecções por HPV são eliminadas espontaneamente, entretanto, as lesões cervicais podem se desenvolver em mulheres com infecção persistente por HPVs de alto risco (VILLA, 2003). Entre os HPVs de alto risco, o HPV 16 é o mais frequente em câncer cervical, sendo detectado em mais da metade dos casos (ZUR HAUSEN, 2009).

Os Papilomavírus pertencem à família *Papillomaviridae* e aos gêneros *Alphapapillomavirus*, HPVs que infectam preferencialmente mucosa oral ou anogenital em humanos e primatas; *Betapapillomavirus*; *Gamma papillomavirus*; *Nupapillomavirus* e *Mupapillomavirus*, HPVs que infectam preferencialmente pele de humanos (FAUQUET et al., 2005).

O HPV é um vírus icosaédrico não envelopado, com genoma de DNA fita dupla circular de aproximadamente 8 Kb, que se replica no núcleo e causa lesões hiperproliferativas no epitélio estratificado (BERNARD et al., 2010) (Figura 1a). Existem mais de 150 HPVs geneticamente

distintos, sendo numerados de acordo com a ordem de descoberta (DE VILLERS et al., 2004; BERNARD et al., 2010). O genoma do HPV contém oito sequências abertas de leitura, do inglês *open reading frames* (ORFs), as quais codificam seis proteínas precoces (E1, E2, E4, E5, E6 e E7), associadas com a regulação dos genes virais e transformação celular, e duas tardias (L1 e L2), que originam o capsídeo viral (PALEFSKY, HOLLY, 1995; KUMARASWAMY, VUDHYA, 2011). Existe ainda uma região regulatória, não codificadora, de 400 a 1.000 pares de bases que é conhecida pelas denominações *long control region* (LCR) ou *upper regulatory region* (URR), situada entre os genes L1 e E6 (TYRING, 2000) (Figura 1b).

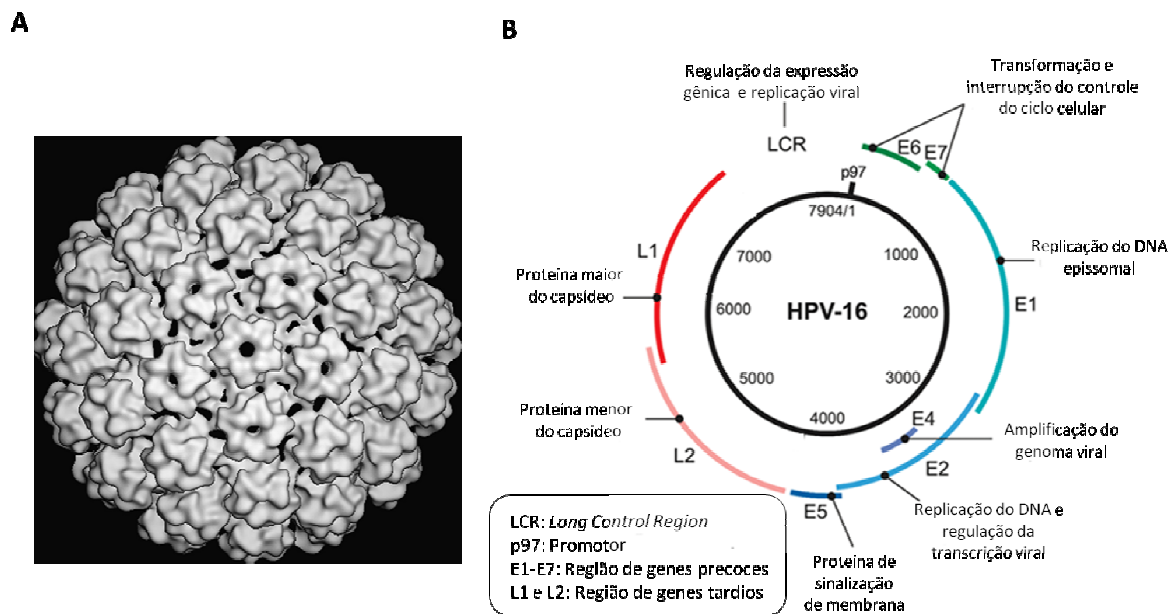


Figura 1. Reconstrução por criomicroscopia eletrônica do capsídeo icosaédrico do Papilomavírus humano (A) e do genoma de HPV 16 (B). Adaptado de Buck, Day e Trus (2013) (A) e de Rautava e Syrjänen (2011) (B).

O ciclo replicativo do Papilomavírus humano está fortemente ligado à diferenciação celular dos queratinócitos do hospedeiro. A entrada do HPV no corpo humano requer um ferimento epitelial que permita que o vírus entre nas camadas basais do epitélio (SYRJÄNEN, SYRJÄNEN, 2000). Pyeon e colaboradores (2009) demonstraram que eventos no início da prófase do ciclo celular, como desintegração do envoltório nuclear, são críticos para estabelecimento da infecção por HPV, por isso o Papilomavírus humano infecta somente células do epitélio basal (células não diferenciadas em processo de divisão).

Após a infecção, o vírus se estabelece como um epissomo no núcleo, com baixo número de cópias. Neste estágio, a replicação viral é considerada não produtiva; proteínas E1, E2, E6 e

E7 são expressas em níveis baixos e os vírions não são formados (RAUTAVA, SYRJÄNEN, 2011). À medida que as células infectadas se diferenciam e atingem camadas superiores do epitélio, o vírus inicia a fase produtiva de seu ciclo de vida, caracterizada pela replicação do epissomo viral em mais de 1000 cópias por célula (LEHOUX et al., 2012). Os níveis de proteínas virais necessárias à replicação aumentam (E1, E2, E4, E5) e proteínas do capsídeo (L1 e L2) são produzidas em células epiteliais maduras. Nas células terminais diferenciadas, o DNA viral é empacotado em capsídeos e liberado na superfície do epitélio. As infecções persistentes por HPV aumentam a possibilidade de transformação, levando primeiro à imortalização celular e mais tarde à malignidade (RAUTAVA, SYRJÄNEN, 2011) (Figura 2).

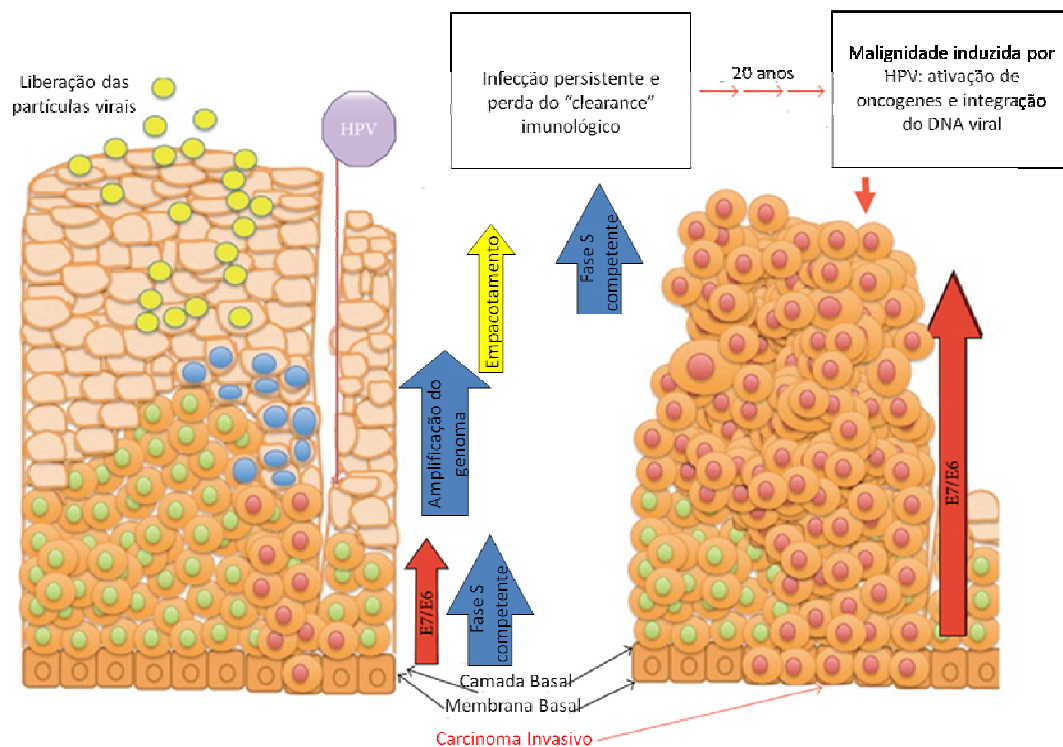


Figura 2. Modelo esquemático do ciclo replicativo viral no epitélio estratificado e progressão da infecção para malignidade. A infecção por HPV ocorre após acesso da partícula viral à camada de células basais do epitélio através de microtraumas. Inicialmente, o genoma do HPV é mantido nas células do epitélio basal como epissomo em poucas cópias, podendo estabelecer infecções latentes de longo prazo. Entretanto, o Papilomavírus humano pode evadir o sistema de reconhecimento e eliminação do sistema imune inato e levar à infecção persistente. A persistência da infecção pode desencadear displasia, uma lesão pré-cancerosa reversível, a qual pode progredir para o carcinoma invasivo. Adaptado de Nagasaka e colaboradores, 2013.

A integração do genoma do HPV no cromossomo da célula hospedeira representa um evento frequente durante a progressão maligna. Aparentemente não existem *hotspots* para

integração do genoma viral no cromossomo do hospedeiro (ZIEGERT et al., 2003). Entretanto, em 40% dos cânceres de colo de útero a integração do genoma viral ocorre em regiões transcricionalmente ativas, resultando na perda da expressão gênica. Estudos sugerem que alterações estruturais no cromossomo hospedeiro, decorrentes da integração do genoma viral, podem contribuir para transformação e carcinogênese (KRAUS et al., 2008; SCHMTZ et al., 2012). Schmtz e colaboradores (2012) observaram perda da função gênica do supressor de tumor CASZ1 em amostras de câncer de colo de útero com genoma de HPV integrado.

A integração frequentemente leva a deleções nas sequências virais. As proteínas E6 e E7 são proteínas virais consistentemente expressas em carcinomas cervicais (BAKER et al., 1987). A expressão dos genes E6/E7 é desregulada após integração do genoma viral, devido à frequente perda do repressor transcricional, E2. Além disso, a integração do DNA viral no genoma da célula hospedeira leva ao aumento da estabilidade do RNAm codificado pelos oncogenes E6/E7, contribuindo para o aumento da expressão dessas proteínas (JEON, LAMBERT, 1995).

Um dos mecanismos bem documentados pelo qual os HPVs de alto risco causam câncer de colo de útero é a inativação do supressor de tumor retinoblastoma (Rb), mediada pela proteína E7, que desencadeia progressão do ciclo celular (JONES et al., 1997). Entretanto, este não é o único mecanismo de transformação celular pelos HPVs de alto risco. A proteína viral E6 estimula a degradação de p53, um supressor de tumor. E6 complexada com a proteína de associação a E6 (E6-AP) funciona como ubiquitina ligase e desencadeia a ubiquitinação de p53 para degradação (SCHEFFNER et al., 1993).

Hsu e colaboradores (2011) mostraram que, além da degradação de p53, a proteína viral E6 interfere na função de enzimas chaves de regulação epigenética. A atividade metiltransferases de histonas em promotores responsivos a p53 é importante para interação desse supressor de tumor com a cromatina e ativação da transcrição de genes. Entretanto, em células infectadas por HPV, a proteína E6 interage com essas enzimas e inibe sua função, desencadeando a repressão de genes controlados por p53, como genes apoptóticos. Em adição aos efeitos de proliferação celular, E6 e E7 interferem em componentes específicos da resposta imune inata, inibindo, por exemplo, NF- κ B e facilitando a persistência da infecção e imortalização celular (VANDERMARK et al., 2012).

A proteína E6 também participa da regulação transcricional de alguns genes, positivamente ou negativamente, por mecanismos dependentes ou independentes de p53.

Cullman e colaboradores (2009) observaram repressão em nível transcricional do supressor de tumor *BTG2* em células positivas para HPV 16 ou 18. Após silenciamento com siRNA específico para E6 ocorreu reindução da expressão de *BTG2*, indicando que a proteína E6 sozinha é capaz de reduzir o nível desse transcrito. Da mesma forma, Parroche e colaboradores (2011) observaram inibição transcricional de *p21^{WAF1}*, proteína reguladora da transição G1/S no ciclo celular, por E6. Diferentemente, Veldman e colaboradores (2001) mostraram que a proteína E6 induz aumento da expressão do gene *hTERT*. O gene *hTERT* codifica a subunidade catalítica da telomerase e permite a ativação da enzima, um importante evento no processo de imortalização e transformação celular.

A região carboxi-terminal da proteína E6 de todos HPVs de alto risco possui um domínio, conhecido como PBM, capaz de reconhecer e se ligar a proteínas humanas com domínios PDZ (LEE et al., 1997). As regiões PDZs são domínios estruturais compostos de 90 resíduos de aminoácidos que se ligam a pequenas regiões na extremidade C-terminal de outras proteínas. A interação de E6 de alto risco com domínio PDZ pode resultar na degradação das proteínas que o carregam (NICOLAIDES et al., 2011). Nicolaidis e colaboradores (2011) mostraram que a interação entre E6 e domínios PDZ aumenta a estabilidade da proteína viral, mantendo um alto nível dessa proteína na célula. As proteínas contendo domínio PDZ são transdutores de sinal ou estão envolvidas na progressão do ciclo celular e regulação da polaridade da célula. Portanto, a interferência nessas funções pela proteína E6 pode criar um ambiente celular favorável para manutenção do genoma viral (NICOLAIDES et al., 2011).

Uma proteína que está associada a diferentes condições patológicas e possui domínio PDZ é a proteína HtrA1, codificada pelo gene *HTRA1* (*High temperature requirement 1*), localizado no cromossomo 10 (10q26). A família de enzimas HtrA são serino-proteases responsáveis por reconhecer proteínas com conformação incorreta e destiná-las ao redobramento ou degradação (TURUNEN et al., 2011; PAGE, DI CERA, 2008). Essa família foi primeiramente identificada em procariotos como chaperonas/proteases essenciais para sobrevivência em elevadas temperaturas, por isso nomeadas *High temperature requirement 1* (CLAUSEN et al., 2002). A estrutura dessas proteínas compreende um domínio de serino-protease e um ou mais domínios PDZ (domínio de interação proteína-proteína) na região C-terminal (MALET et al., 2012). As HtrAs estão envolvidas em uma variedade de funções biológicas e de patogenicidade como controle de qualidade de proteínas no fotossistema II de plantas e cianobactérias

(HUESGEN et al., 2009), resposta a proteínas desdobradas, crescimento celular, apoptose, artrite, câncer e metabolismo de proteínas precursoras de amilóide (ZURAWA-JANICKA et al., 2010; SUZUKI et al., 2004; POLUR et al., 2010; MELTZER et al., 2009).

HtrA1 foi a primeira serino-protease humana descrita desta família (ZUMBRUNN, TRUEB, 1996; HU et al, 1998). Essa protease é expressa como um precursor de peso molecular de 51 kDa, com uma sequência sinal inicial de 22 aminoácidos, provavelmente responsável por direcionar HtrA1 à secreção (CLAWSON et al., 2008). A estrutura de HtrA1 consiste em um domínio N-terminal regulatório, um domínio de serino-protease e um domínio PDZ C-terminal (TRUEBESTEIN et al., 2011), que pode mediar a ligação a proteínas alvo (KARRING et al., 2012). O papel específico do domínio PDZ de HtrA1 não é claro, entretanto, sabe-se que ele reconhece sequências C-terminais e internas de caráter hidrofóbico (KARRING et al., 2012).

O gene *HTRA1* foi selecionado para estudo funcional a partir de um microarray realizado pelo grupo da Dra. Luísa Lina Villa em linhagem derivada de prepúcio de recém nascido, a HF698 (TERMINI et al., 2008), onde foi encontrado um grupo de genes (*HTRA1*, *ANKDR11*, *EIF4EBP2* e *ITPKC*) com expressão diferencial. Neste microarray, os genes *HTRA1* e *ANKDR11* apresentaram baixa expressão e os genes *EIF4EBP2* e *ITPKC* estavam com alta expressão em queratinócitos infectados por HPV16. Posteriormente, foi realizado em nosso laboratório análise do padrão de expressão destes genes por meio de qPCR, sendo extraído RNA de amostras normais de tecido peniano, carcinoma de células escamosas de pênis e da linhagem HF698. Os genes *HTRA1* e *ANKDR11* apresentaram baixa expressão em 100% das amostras de carcinomas de células escamosas de pênis, sendo que o gene *HTRA1* apresentou menor expressão que o gene *ANKDR11*. O gene *EIF4EBP2* apresentou baixa expressão em 90% das amostras analisadas e o gene *ITPKC* apresentou superexpressão em 50% das amostras. Somente os genes *HTRA1* e *ANKDR11* apresentaram similaridade no padrão de expressão entre as amostras de carcinomas de células escamosas e a linhagem de queratinócitos derivada de prepúcio. Portanto, o gene *HTRA1* foi selecionado para este estudo funcional por apresentar o menor índice de expressão nas amostras analisadas.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste projeto foi identificar a possível regulação da expressão do gene *HTRA1* pelo oncogene E6 de HPV16 e analisar o efeito da superexpressão de HtrA1 em cultura celular de queratinócitos imortalizados por HPV de alto risco (HF698) e em cultura celular de carcinoma cervical HPV negativo (C33). Para isso, foram utilizadas metodologias moleculares, procurando atender os seguintes objetivos específicos:

1. Transfectar as linhagens HF698 e C33 com vetor de expressão contendo a ORF de *HTRA1* (pCMV6/*HTRA1*).
2. Analisar a expressão de mRNA e proteica de HtrA1 nas linhagens transfectadas com pCMV6/*HTRA1*.
3. Analisar a expressão dos oncogenes E6 e E7 de HPV16 na linhagem HF698 transfectada com pCMV6/*HTRA1* e comparar com a expressão destes mesmos oncogenes na linhagem não transfectada com vetor de expressão para *HTRA1*.
4. Realizar ensaio de viabilidade celular em linhagens HF698 e C33 transfectadas com vetor pCMV6/*HTRA1* e com o vetor vazio.
5. Realizar ensaio de apoptose nas linhagens HF698 e C33 transfectadas com vetor contendo a ORF do gene *HTRA1* e com o vetor vazio.
6. Realizar análise de ciclo celular em linhagens HF698 e C33 transfectadas com vetor contendo a ORF do gene *HTRA1* e com o vetor vazio.
7. Selecionar linhagem estável de carcinoma cervical (C33) contendo o gene E6 de HPV de alto risco e, posteriormente, realizar transfecção transiente com pCMV6/*HTRA1*.
8. Realizar ensaio de proliferação celular em linhagens HF698, C33 e C33 contendo E6 transfectadas com vetor contendo a ORF do gene *HTRA1* e com o vetor vazio.
9. Avaliar a expressão do gene *HTRA1* na linhagem celular imortalizada por HPV 16 (HF698) após o silenciamento transcricional do oncogene *E6* por meio de dsRNA.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Clonagem e Sequenciamento

Os vetores de expressão pCMV6/*Entry* (*vetor vazio*) e pCMV6/*HTRAI* (*OriGene Technologies*, cat. PS100001 e RC222362), contendo gene de resistência a Canamicina, foram utilizados na transformação de bactérias *E.coli* (DH5 α) competentes para posterior isolamento de grandes quantidades de plasmídeo e sequenciamento. 100 ng de cada vetor foi adicionado a alíquotas de 150 μ L de bactérias *E.coli* (DH5 α) competentes em gelo, onde permaneceram por 30 minutos. Após choque térmico de 30 segundos a 42 °C, o material foi novamente colocado no gelo, durante 5 minutos. Foram adicionados 250 μ L de meio SOC líquido (Sigma) e as bactérias foram incubadas por uma hora a 37 °C com agitação de 200 rpm. Em seguida, foram transferidas para placas contendo 25 mL de meio sólido LB com Canamicina (25 μ g/mL), permanecendo a 37 °C por 16 horas. Após o crescimento das bactérias em meio sólido, as colônias foram selecionadas.

Após a seleção das colônias, os clones foram transferidos para tubos de 15 mL, contendo 4 mL de meio LB líquido e 25 μ g/mL de Canamicina, permanecendo a 37 °C com rotação de 200 rpm, durante 16 horas. Após crescimento em meio líquido, 500 μ l da solução com bactérias transformadas foram transferidos a 500 mL de meio LB líquido estéril com 25 μ g/mL de Canamicina para crescerem em grandes quantidades, permanecendo nas mesmas condições descritas anteriormente.

3.2. Isolamento do DNA plasmidial

Os plasmídeos foram extraídos por meio do Kit Endo Free Plasmid MaxiPrep (*Qiagen*), conforme a descrição do fabricante. O sequenciamento foi realizado segundo a técnica de didesoxinucleotídeos (Sanger), utilizando o Kit Big Dye terminator (Applied Biosystems), os oligonucleotídeos específicos para reação, VP1.5 Forward (5'GACTTTCCAAAATGTCG 3') e XL39 Reverse (5'ATTAGGACAAGGCTGGTGGG 3') e o sequenciador automático ABI3130XL (Applied Biosystems).

Os programas computacionais *BLAST* do National Cancer Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) e Bioedit, foram utilizados para verificação da qualidade das seqüências e homologia dos fragmentos obtidos com a ORF do *HTRAI* contida no NCBI.

3.3. Cultura de linhagens celulares aderentes

Queratinócitos humanos imortalizados por HPV16 (HF698) (SCHLEGEL et al., 1988), gentilmente cedidos pela Profa. Dra. Luisa Lina Villa, foram cultivados em meio de cultura contendo 3 partes de meio para queratinócitos (K-SFM), com fator de crescimento epidermal e extrato pituitário bovino, e 1 parte de DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 100 µg/ul de estreptomicina e penicilina. A linhagem celular derivada de câncer cervical humano (C33) (ATCC: HTB-31), negativa para HPV, foi cultivada em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 100 µg/ul de estreptomicina e penicilina (meio completo). As células foram mantidas em uma atmosfera a 37°C em 5% de CO₂.

Para produção da linhagem estável de carcinoma cervical (C33) contendo gene E6 de HPV 16 foram utilizadas, previamente, as linhagens Bosc 23 e Am-12, para produção de partículas retrovirais contendo os vetores de interesse. As linhagens celulares ecotrófica Bosc 23 (ATCC CRL-11270) e anfitriônica Am-12 foram cultivadas em meio DMEM com 10% de SFB. As células foram mantidas em estufa úmida, a 37 °C, e com 5% de CO₂. Todas essas células foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Louise Chow da Universidade de Alabama, Birmingham, U.S.A.

3.4. Transfecção

A transfecção das células foi realizada usando FuGENE HD Transfection Reagent (*Promega*) com razão de 1µg : 3µl (DNA plasmidial : FuGENE). Para que a confluência fosse de 80% no momento da transfecção, 2x10⁵ (HF698) ou 4x10⁵ (C33) células por reação foram plaqueadas em placa de 6 poços, em meio sem antibiótico suplementado com 10% de soro fetal bovino. Após 24 horas, 3 µg de DNA plasmidial e 9 µL de FuGENE HD foram misturados a 150 µL de meio OPTI-MEM (Life Technologies) e incubados por 15 minutos a temperatura ambiente. O meio foi aspirado das células e 2 mL de meio novo sem antibiótico contendo 10% de soro bovino foi repostado. Toda a reação de transfecção foi adicionada ao novo meio. As células foram incubadas por 48 horas para extração de RNA, a uma temperatura de 37 °C e uma atmosfera com 5% de CO₂. A eficiência de transfecção foi checada através de uma transfecção paralela com vetor contendo GFP (pcDNA3.1/GFP), por meio de contagem das células emitindo fluorescência verde, no microscópio de fluorescência (ZEISS Axio Vert.A1).

Para a análise de superexpressão de HtrA1 após 48 horas de transfecção com o vetor pCMV6/*HTRA1*, as células aderentes foram submetidas a reação de Imunocitoquímica.

Para o teste de viabilidade celular (MTT), apoptose e ciclo celular as células foram analisadas após 24, 48 e 72 horas de transfecção.

Nos ensaios de formação de colônia, a seleção de células transfectadas se iniciou 48 após a transfecção, em um meio completo contendo antibiótico G418 (Life Technologies) na concentração de 150 µg/mL na linhagem HF698 e 800 µg/mL na linhagem C33.

3.5. Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total das células, transfectadas ou não com vetor de superexpressão do *HTRA1*, foi extraído pelo método Trizol (Life Technologies), segundo as instruções do fabricante.

O RNA extraído foi reversamente transcrito utilizando primers randômicos e o kit High-Capacity cDNA Archive (Applied Biosystems). Foi utilizado 5 µg de RNA total, ao qual foi adicionado 1,25 µL de oligo dT (0,5 µg/µL), 2,5 µL de dNTPs mix (25X), 5 µL iniciadores randômicos (10X), 5,0 µL de Tampão de Transcriptase Reversa (10X), 2,0 µL de RNase OUT (40 U/µL), 5,0 µL da enzima Multiscribe Reverse Transcriptase (50 U/µL) e água, completando volume final de 50 µL. A reação consistiu de uma etapa inicial de 25 °C durante 10 minutos e foi finalizada com uma incubação a 37 °C por 120 minutos.

3.6. qPCR

Primeiramente, as análises por PCR quantitativo foram realizadas para verificar a expressão de *HTRA1* em 10 amostras de tumor de pênis HPV positivas e nas linhagens HF698 e C33, comparado com amostras de tecido normal de pênis. As amostras de tumor de pênis e tecido de pênis normal foram obtidas no Hospital de Base de São José do Rio Preto e seu uso aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (Processo: 3444/2007).

Confirmada a baixa expressão de *HTRA1* nas células HF698 e C33, foram realizadas análises por PCR quantitativo para verificar a expressão desse gene nessas linhagens, e dos oncogenes virais *E6* e *E7*, na linhagem HF698, após transfecção com o vetor de superexpressão do *HTRA1* e vetor vazio (pCMV6/*Entry*), utilizando primers específicos para esses genes.

A amplificação do cDNA e a análise da expressão gênica ocorreu em equipamento ABI Prism® 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) pelo sistema SYBR® Green

(Applied Biosystems). Para análise da expressão dos genes alvo *HTRA1*, *E6* e *E7*, foi utilizado 1 µl de *primers forward* e *reverse* (10 µM) (Tabela 1), 10 µl SYBR® Green e 7 µl de água. O valor da expressão relativa dos genes alvo foi determinado pelo método de quantificação relativa em relação ao gene endógeno (normalizador), gliceraldeído-3-fosfato dehydrogenase (*GAPDH*). Para este gene, foi utilizada a seguinte reação: 0,8 µl de primers forward e reverse (10 µM) (Tabela 1), 10 µl SYBR® Green e 7,4 µl de água.

A ciclagem compreendeu uma etapa inicial de 2 minutos a 50 °C para a ativação da enzima UNG, seguido de 10 minutos a 95 °C para inativação da UNG, evitando que a enzima degrade os produtos da amplificação, iniciada em seguida, e também para a ativação da enzima AmpliTaq Gold®. Posteriormente, seguiu 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C para extensão. O anelamento dos iniciadores ocorreu durante a rampa de descida de 95 °C a 60°C. A coleta do sinal ocorreu nos 30 segundos finais da etapa de extensão. Ao final, foi acrescentado um passo de dissociação que compreende duas etapas de 15 segundos a 95 °C, intercaladas por uma etapa de 30 segundos a 60 °C. A curva de dissociação tem como objetivo a verificação de ocorrência de dímeros de iniciadores, produtos inespecíficos e de contaminações.

Para o cálculo da expressão diferencial foi utilizado o modelo matemático proposto por Pfaffl (2001). Considera-se que houve uma redução ou aumento da expressão gênica, dos genes selecionados, quando o valor da expressão gênica (R) em log2 for menor que -2 ou maior que 2, respectivamente.

Tabela 1. Sequência dos primers dos genes *E6*, *E7*, *HTRA1* e *GAPDH* utilizados nas análises de PCR quantitativo.

Gene	Sequência do Primer 5' - 3'
<i>E6</i>	F - GACCCAGAAAGTTACACAG R - CATAAATCCCGAAAAGCAAAG
<i>E7</i>	F - ACAAGCAGAACCGGACAGAG R - TGCCCATTAACAGGTCTTCC
<i>HTRA1</i>	F - CGCACTCATCAA AATTGACC R - CTGTGTTTTGAAGGGAAAACG
<i>GAPDH</i>	F - ACCCACTCCTCCACCTTTGA R - CTGTTGGTGTAGCCAAATTCGT

3.7. Imunocitoquímica

Para a análise da superexpressão da proteína HtrA1, as linhagens celulares estudadas foram plaqueadas em placa de 6 poços e após 24 horas transfectadas com vetor vazio ou vetor pCMV6-*HTRA1*. Após 48 horas, as células transfectadas foram lavadas com tampão fosfato salina (PBS), fixadas com paraformaldeído 4% por 30 minutos, lavadas novamente e submetidas a inativação de peroxidases endógenas com peróxido de hidrogênio a 3% em metanol, durante 30 minutos. Após lavagem em PBS, as células foram incubadas em soroalbumina bovina a 1% (BSA), para bloqueio de proteínas inespecíficas. O anticorpo primário policlonal *rabbit anti-HTRA1* (abcam, ab38611) foi aplicado a uma diluição de 1:50 em BSA 1% e incubado *overnight*, a 4°C em câmara úmida. A linhagens celulares foram lavadas em PBS e incubados com o anticorpo secundário biotilado (Goat anti-rabbit IgG: Santa-Cruz Biotechnology, sc-2018) por 45 minutos na diluição de 1:200, lavadas novamente e incubadas com reagente AB do kit Rabbit ABC Staining System (Santa-Cruz Biotechnology, sc-2018), para amplificação de sinal, por 45 minutos em câmara úmida. A revelação foi realizada com a solução 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (DAKO). As amostras foram contracoradas com Hematoxilina de Harris. O controle negativo da reação foi obtido omitindo-se o anticorpo primário e com incubação apenas com soroalbumina bovina a 1%.

A superexpressão de HtrA1, obtida nas reações de imunocitoquímica, foi quantificada nas linhagens celulares por densitometria, no analisador de imagens, utilizando o software AXIOVISION. Posteriormente, os dados foram calculados e demonstrados como média \pm S.E.M. da densidade óptica média (DOM).

3.8. Ensaio de viabilidade celular (MTT)

O teste do MTT é um teste amplamente utilizado para determinação da viabilidade de células isoladas. Esta técnica avalia a atividade metabólica celular, quantificando a redução metabólica do MTT ((3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)) por desidrogenases associadas ao NADPH e ao NADH, que resulta na produção de cristais de formazano, intensamente coloridos no interior das células. Estes podem ser observados ao microscópio ou extraídos e dissolvidos com solventes orgânicos, como por exemplo o DMSO, permitindo a sua quantificação através de espectrofotometria.

O ensaio de viabilidade celular com MTT (Sigma) foi realizado nas linhagens celulares HF698 e C33 não transfectadas, transfectadas com vetor vazio e transfectadas com vetor pCMV6/*HTRA1* em placa de 96 poços. Cada poço recebeu no momento da transfecção 100 µl de meio novo e 2 µl da solução de transfecção. A solução de transfecção foi preparada utilizando 2 µg de DNA plasmidial, 6 µl de Fugene HD e quantidade suficiente de Optimem para completar o volume de 100 µl. O teste foi realizado após 24, 48 e 72 horas de transfecção, em quintuplicata e em dois eventos independentes.

Os valores obtidos foram normalizados com o controle e expressos em valor de porcentagem de viabilidade, utilizando a fórmula a seguir:

$$\% \text{ de viabilidade} = (\text{Absorbância da amostra} / \text{Absorbância do controle}) \times 100$$

3.9. Ensaio de apoptose por Citometria de Fluxo

As células apoptóticas e necróticas foram determinadas pelo kit FITC Annexin V Apoptosis Detection II (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA).

Após 24, 48 e 72 horas de transfecção com os vetores pCMV6/*Entry* e pCMV6/*HTRA1*, as células HF698 e C33 aderidas e em suspensão no meio de cultura foram lavadas duas vezes com PBS 1X e ressuspendidas em tampão de ligação 1X a uma concentração de 1×10^6 células/ml. 100 µl de cada amostra foram transferidos para um tubo de 1,5 ml, juntamente com 5 µl de FITC Annexin V e 5 µl de PI. Após homogeneizada, a solução foi incubada a temperatura ambiente por 15 minutos, no escuro. Para leitura foram adicionados 400 µl de tampão de ligação 1X e, posteriormente, adquiridos 10.000 eventos de cada amostra em Citômetro de Fluxo Guava Easycheck-Millipore.

3.10. Análise do ciclo celular por Citometria de Fluxo

Primeiramente, as células foram sincronizadas em G0 através da privação de soro fetal bovino, na C33, e de suplementos para queratinócitos e soro fetal bovino na HF698, por 36 horas antes da transfecção com os vetores pCMV6/*Entry* e pCMV6/*HTRA1*.

Após 24, 48 e 72 horas de transfecção, 2×10^5 células, foram lavadas com PBS 1X e fixadas com etanol 70% gelado a 4 °C. A fixação com etanol permite que as células sejam permeáveis ao iodeto de propídeo. Após 12 horas, foram centrifugadas a 450 g por 5 minutos, o etanol foi removido e as células incubadas por 30 minutos, no escuro, com 200 µL de reagente

Guava Cell Cycle Reagent (EMD Millipore Corporation, Hayward, CA, EUA), constituído de iodeto de propídeo, um intercalante de DNA. Para análise, foram adquiridos 10.000 eventos de cada amostra no Citômetro de Fluxo Guava Easycheck-Millipore.

3.11. Seleção de linhagem estável de C33 contendo gene E6 de HPV

A linhagem celular ecotrópica Bosc 23 (ATCC CRL-11270) foi utilizada para eletroporação dos vetores retrovirais pLXSN-E6 de HPV-16 e pLXSN (vetor vazio). O sobrenadante desta linhagem, contendo vetores retrovirais, foi utilizado na infecção da linhagem celular anfotrópica Am-12. Os retrovírus presentes no sobrenadante de Am-12 infectada foram utilizados para infecção em linhagem de carcinoma cervical HPV negativa (C33). A seleção de linhagem estável de C33 contendo gene E6 de HPV 16 (C33/pLXSN-E6) e C33 contendo o vetor vazio (C33/pLXSN) foi realizada utilizando G418 (Life Technologies) a 600 µg/ml.

3.11.1. Eletroporação da linhagem celular ecotrópica Bosc 23

Os vetores retrovirais recombinantes pLXSN-E6 de HPV-16 e pLXSN (vetor vazio) foram transfectados na linhagem celular ecotrópica Bosc 23 por eletroporação. Para cada vetor retroviral foram utilizadas 5×10^6 células diluídas em 250 µl de CitoMix (HEPES, ATP, Glutathione, KCl, 1M CaCl₂, 5M EGTA, 1M MgCl₂, 0,1M K/PO₄ pH7.6). Na cubeta de transfecção com espaçamento de 4 mm entre os eletrodos (Bio-Rad), foram colocados 15 µg do vetor recombinante, 2,5 µl de BES (ácido N,N-Bis-(2-hidroxietil)-2-aminoetansulfônico) 0,5 M (pH=7,2) (Sigma) e 50 µg de DNA de esperma de salmão (Life Technologies) junto com as células. Em seguida, o pulso elétrico foi dado a 960 µF, 170 volts em um aparelho Gene Pulser II (Bio-Rad). Após o pulso elétrico, foi adicionado à mistura 200 µl de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB e antibiótico e as células foram então plaqueadas em 7 ml do mesmo meio em placas de cultura de 10 cm de diâmetro. Após 4 horas, o meio foi substituído por 10 ml de meio novo.

3.11.2. Infecção da linhagem celular anfotrópica Am-12

Aproximadamente 48 horas após a transfecção dos vetores retrovirais na linhagem celular Bosc 23, o sobrenadante gerado dessas células foi aspirado por uma seringa de 5 ml de capacidade. A seringa foi, então, acoplada a um filtro de 0,45 µm e o conteúdo do sobrenadante

foi gotejado sobre as células Am-12 cultivadas em placas de 10 cm de diâmetro até uma confluência de aproximadamente 50% e com o meio previamente aspirado. Foi então agregado ao meio polibreno (Sigma) para uma concentração final de 10 µg/ml. Após 6 horas foram adicionados mais 5 ml de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB e antibiótico. Aproximadamente 48 horas após a infecção das células Am-12, iniciou-se a seleção com neomicina (Gibco BRL) em uma concentração final de 500 µg/ml por 14 dias.

3.11.3. Infecção das células de carcinoma cervical (C33)

O sobrenadante das células Am-12 selecionadas foi utilizado para infectar a linhagem HPV negativa C33. Em resumo, o sobrenadante das células Am-12 foi aspirado por uma seringa de 5 ml. A seringa foi então acoplada a um filtro de 0,45 µm e o conteúdo foi gotejado sobre as células de carcinoma cervical cultivadas em placas de 10 cm de diâmetro até uma confluência de aproximadamente 50% e com o meio previamente aspirado. Foi então agregado ao meio polibreno (Sigma) para uma concentração final de 10 µg/ml. Após 45 minutos foram adicionados mais 5 ml de meio de DMEM com o objetivo de minimizar os efeitos do soro sobre as células. Quatro horas após a infecção, o meio foi completamente substituído por DMEM e, após mais 48 horas, iniciou-se a seleção em meio contendo antibiótico G418 (Life Technologies) a 600 µg/ml por 14 dias. A confirmação da expressão transcricional de E6 na linhagem C33/pLXSN-E6 foi obtida por qPCR (item 3.6) e da expressão proteica por Western Blotting.

3.11.3.1. Western Blot

A confirmação da expressão da oncoproteína E6 na linhagem C33/pLXSN-E6 foi realizada indiretamente através da expressão de p53 (53KDa), já que não existe anticorpo comercial para esta oncoproteína viral. O mecanismo de ubiquitinação de p53 pela proteína E6 de HPV de alto risco, seguido da degradação, desencadeia diminuição da expressão de p53 na presença de E6 (Scheffner et al., 1993). Portanto, a diminuição da expressão de p53 na linhagem C33/pLXSN-E6 comparado com a linhagem com vetor vazio (C33/pLXSN) indica expressão de E6.

Para a preparação do lisado celular e subsequentemente extração de proteína, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1X e tripsinizadas com Tripsina EDTA 1X. Após a adição de PBS 1X, a suspensão celular foi centrifugada a 1500 rpm por 5 minutos. Para a lise celular, o

pellet celular foi ressuspendido em 100 μ L de reagente CellLytic M Cell Lysis gelado e incubado por 20 minutos a 4°C. Após a centrifugação do lisado celular a 13.000 rpm por 10 minutos a 4°C, 50 μ L do supernadante foi transferido para um novo e estocado em freezer -80°C para análise por Western blotting.

A amostra de proteína foi misturada com tampão de amostra e fervida por 5 minutos a 95°C. Usando o gel de SDS-poliacrilamida, as proteínas foram separadas baseadas no seu peso molecular. Para o gel SDS-Page, 20 μ L da proteína lisada (10 μ g), assim como 10 μ L do PageRuler Prestained Ladder (Thermo) foram adicionados ao gel e a separação foi realizada durante 1 hora a 150 volts em tampão Tris-Glicina/SDS 1x (Bio-Rad laboratories). A transferência das proteínas do gel para a membrana de PVDF foi realizada durante 2 horas a 100 volts em uma temperatura de 4°C, em cuba de transferência com tampão gelado.

Após a transferência, os sítios ligantes livres na membrana foram bloqueados por meio de incubação da membrana em leite desnatado 5% (Bio-Rad laboratories) dissolvido em tampão salino (tampão TBST) (tampão Tween-TBS) por 1 hora a temperatura ambiente. O anticorpo primário monoclonal de camundongo anti-p53 (abcam – ab28) foi diluído em leite desnatado 5% (Bio-Rad laboratories) dissolvido em tampão salino (tampão TBST) (tampão Tween-TBS), aplicado a membrana a uma diluição de 1:500 e incubado por 16 horas a 4°C sob agitação. O anticorpo de camundongo anti-GAPDH (MilliPore Corporation Bedford, MA, EUA) foi aplicado a uma diluição de 1:5000 e incubado durante 16 horas a 4°C sob agitação, para detecção da proteína endógena de 36KDa, GAPDH. Após as incubações, as membranas foram lavadas três vezes com tampão TBST por 15 minutos e incubadas no anticorpo secundário de coelho anti-mouse IgG-HRP a uma diluição de 1:2000 em leite desnatado 5%/tampão TBST por 1 hora a temperatura ambiente. Novamente, a membrana foi lavada três vezes em tampão TBST por 15 minutos. Em seguida, foi adicionado às membranas na proporção 1:1 o substrato quimioluminescente “Pierce ECL Western Blotting Substrate” (Pierce), durante 1 minuto em temperatura ambiente. Subsequentemente, a membrana foi revelada no leitor Chemi-Doc (Bio-Rad laboratories).

3.12. Ensaios de formação de colônia

Após 24 horas de transfecção, as células HF698 e C33 que receberam somente FuGENE (Mock), as transfectadas com vetor vazio e as transfectadas com vetor de superexpressão do

HTRA1 foram tripsinizadas e plaqueadas em triplicata (6×10^4 células na linhagem C33 e 8×10^4 células na linhagem HF698) em placas de 6 poços. Após 24 horas, foi adicionado meio completo contendo antibiótico G418 (Life Technologies). A adição de G418 (Life Technologies) ao meio tem como objetivo selecionar clones expressando a região de resistência a neomicina provida pelo vetor pCMV6/*Entry*. A concentração ideal de seleção pela droga foi previamente determinada, sendo utilizado na linhagem celular HF698 a concentração de 150 $\mu\text{g/mL}$ e na C33 800 $\mu\text{g/mL}$. As células receberam antibiótico G418 por 14 dias com reposição do meio completo e antibiótico G418 a cada dois dias, tempo suficiente para que todas as células do grupo Mock fossem eliminadas, indicando seleção das células expressando gene de resistência a G418. O ensaio de formação de colônia foi realizado em três eventos independentes.

Após a seleção, as colônias foram coradas com cristal violeta 0,01%. Para isso, as células foram lavadas três vezes com PBS 1X, fixadas em formaldeído 10% por 10 minutos e corados em 0.01% de cristal violeta por 15 minutos. Após, as células foram lavadas três vezes com água destilada e colocadas para secar *overnight*.

As linhagens estáveis de carcinoma cervical C33 contendo E6 (C33/pLXSN-E6) ou vetor vazio (C33/pLXSN) também foram submetidas a ensaio de formação de colônia antes e após transfecção com pCMV6/*HTRA1*, como descrito acima, exceto o número de células da triplicata, que foi alterado para 10^4 células. Entretanto, neste ensaio não foi possível realizar a seleção com G418 (Life TechnologiesLife TechnologiesLife Technologies) das células transfectadas com pCMV6/*HTRA1*, pois os retrovírus utilizados para produção das linhagens estáveis (pLXSN-E6 e pLXSN) também contém o gene de resistência a G418. Para que a análise dos resultados não fosse prejudicada, o ensaio de formação de colônia foi conduzido utilizando quatro grupos: células C33/pLXSN-E6 transfectadas com *HTRA1*, células C33/pLXSN transfectadas com *HTRA1*, células C33/pLXSN-E6 não transfectadas com *HTRA1*, C33/pLXSN não transfectadas com *HTRA1*. O ensaio durou 12 dias, tempo suficiente para que a confluência não fosse alta e o número de colônias possível de ser contado.

3.13. Silenciamento transcricional de E6 com dsRNA

Foram testadas três moléculas de dsRNA direcionadas para diferentes regiões de E6 de HPV 16. As sequências de RNA duplex descritas a seguir foram construídas usando o software da IDT (Integrated DNA Technologies):

- dsiRNA HPV16 E6(1):

5'-CAGAAAGUUACACAGUUAUGCACA-3'

3'-GGGUCUUUCA AUGGUGUCAAUACGUGU-5'

- dsiRNA HPV16 E6(2):

5'-UCAAGAACACGUAGAGAAACCCAGC -3'

3'-GUAGUUCUUGUGCAUCUCUUUGGGUCG -5'

- dsiRNA HPV16 E6(3):

5'-GAACUGCAAUGUUUCAGGACCCACA -3'

3'-CUCUUGACGUUACAAAGUCCUGGGUGU -5'

Foi utilizado como controle negativo um dsiRNA disponibilizado pela IDT (NC1) que não está presente no genoma de humanos, camundongos ou ratos, com a seguinte sequência:

-dsiRNA NC1 (Controle negativo):

5'-CGUUA AUCGCGUAUAAUACGCGUAU-3'

3'-CAGCAAUUAGCGCAUUAUUAUGCGCAUA-5'

As moléculas de dsiRNAs foram inseridas em células HF698, utilizando o reagente de transfecção Lipofectamina RNAiMax (Life Technologies), cerca de 18 horas após plaqueamento de 4×10^3 células em placa de 96 poços, seguindo as instruções do fabricante. As moléculas de dsiRNAs (1 nM e 3 nM) e a lipofectamina (0,15 μ l por poço) foram diluídas em meio Opti-MEM, em tubos separados, completando o volume de 5 μ l de cada solução para cada poço, e incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, a mistura de opti-mem e lipofectamina foi adicionada a mistura de opti-mem e dsiRNA na proporção 1:1 e incubadas por 10 minutos. 10 μ l da mistura resultante foram adicionados aos poços contendo 100 μ l de meio sem antibióticos e incubados em estufa por 72 horas. A transfecção foi realizada em triplicata e em dois eventos independentes.

A eficiência de transfecção de moléculas de dsiRNAs nas células foi assegurada utilizando-se o controle de transfecção TYE™ 563 DS (IDT) a 5nM, que consiste em um RNAi fluorescente. A eficiência de transfecção, de cerca de 100%, foi observada em microscópio de fluorescência.

Para avaliar os possíveis efeitos citotóxicos causados pelo tratamento com moléculas de dsRNAs na cultura foi realizado ensaio de viabilidade celular por MTT após 72hrs de transfecção (item 3.8).

Para avaliar se há inibição transcricional de E6 após 72 hrs de transfecção com os dsRNAs foi extraído o RNA total das células pela técnica de trizol, realizada a síntese de cDNA e PCR quantitativo para E6 (item 3.6). Além disso, a fim de avaliar se E6 exerce regulação transcricional sobre o gene *HTRA1*, foi realizado PCR quantitativo para *HTRA1* na amostra em que a expressão de E6 foi silenciada em 60%.

3.14. Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o Software GraphPad Prism5. O teste Mann-Whitney foi aplicado para comparar o nível de expressão de proteína detectada por imunocitoquímica. As comparações entre células transfectadas com pCMV6/*Entry* e células transfectadas com pCMV6/*HTRA1* foram realizadas usando teste *t-student*. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando os valores de p foram menores que 0,05.

4. RESULTADOS

4.1. Clonagem, isolamento do DNA plasmidial e sequenciamento

Após transformação com os vetores de expressão pCMV6/*Entry* e pCMV6/*HTRAI*, foi realizada extração e purificação de grandes quantidades de DNA plasmidial com Kit Endo Free Plasmid MaxiPrep (Qiagen), conforme a descrição do fabricante. Posteriormente, foi realizado o sequenciamento segundo a técnica de didesoxinucleotídeos (Sanger), utilizando o Kit Big Dye terminator (Applied Biosystems), os oligonucleotídeos específicos para reação, VP1.5 forward e XL39 Reverse e o sequenciador automático ABI3130XL. Após obtenção dos plasmídeos, foi realizado o sequenciamento como descrito acima. Verificamos que as sequências eram de boa qualidade através do programa *Electropherogram Quality Analysis* (Figura 3). As sequências obtidas foram alinhadas pelo programa Bioedit, onde foi possível visualizar a qualidade da sequência do vetor vazio, o alinhamento do vetor pCMV6/*HTRAI* com o fragmento 1569 pb do gene *HTRAI* e com as sequências das *tags* MYC e DDK presentes neste vetor (Origene) (Figura 4).

Number of Reads: 4					
<input type="checkbox"/> > 100 bases <input type="checkbox"/> > 200 bases <input type="checkbox"/> > 250 bases <input type="checkbox"/> > 300 bases <input type="checkbox"/> > 350 bases <input type="checkbox"/> > 400 bases					
Read number	Total of bases	# Bases with quality > 20	# Bases with quality > 30	% Vector	> 100 bases & quality > 20
<input checked="" type="checkbox"/> pCMV6EV.foward.2012.06.21.ab1	1307	513 (39%)	474 (36%)	28 1s%[%]	Ok
<input checked="" type="checkbox"/> pCMV6EV.reverse.2012.06.21.ab1	1281	633 (49%)	585 (46%)	29 1s%[%]	Ok
<input checked="" type="checkbox"/> pCMV6HTRAI.foward.2012.06.21.ab1	1319	584 (44%)	541 (41%)	12 1s%[%]	Ok
<input checked="" type="checkbox"/> pCMV6HTRAI.reverse.2012.06.21.ab1	1328	554 (42%)	526 (40%)	15 1s%[%]	Ok
Total	5235	2284 (44%)	2126 (41%)		No: 0 Ok: 4

Figura 3. Electropherogram quality analysis (Phred) mostrando as amostras de boa qualidade, em verde (Ok), para os clones de pCMV6/*Entry* e pCMV6/*HTRAI*.

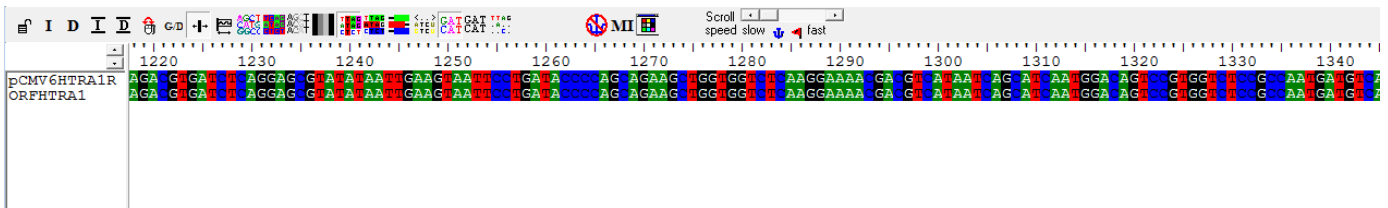


Figura 4. Alinhamento da sequência gerada após sequenciamento do clone de pCMV6/*HTRAI* com a ORF de *HTRAI*.

4.2. Transfecção, extração de RNA e obtenção de cDNA

Foi realizada transfecção com FuGENE HD do vetor vazio (pCMV6/*Entry*) e do vetor contendo a ORF do gene *HTRA1* (pCMV6/*HTRA1*) nas linhagens HF698 e C33, em placa de 6 poços, em triplicata, para extração de RNA seguida de quantificação em espectrofotômetro e validação do RNA. A eficiência de transfecção foi confirmada através da transfecção paralela com o vetor contendo GFP, que emitiu fluorescência verde no microscópio de fluorescência. A eficiência de transfecção foi cerca de 60% na linhagem HF698 e 40% na linhagem C33.

A integridade do RNA foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 2%, que mostrou a presença de duas bandas correspondentes aos RNAs ribossomais, 28S e 18S, das subunidades ribossômicas.

As amostras também foram validadas após a síntese de seu cDNA. Tal procedimento é utilizado para confirmação da integridade do RNA. Observou-se que os cDNAs obtidos apresentavam boa qualidade, através da amplificação por PCR do gene *ACTB*, o qual serve de controle para transcritos abundantes, cujo produto apresenta 613pb.

4.3. Análise da Expressão Gênica por PCR quantitativo

4.3.1 Expressão Gênica de *HTRA1*

A técnica de PCR quantitativo foi utilizada, primeiramente, para verificar a expressão do gene *HTRA1* em amostras normais de tecido peniano, em amostras de tumor de pênis HPV positivas e nas linhagens HF698 (HPV positiva) e C33 (HPV negativa). Confirmada a baixa expressão desse gene nessas amostras (Figura 5), a técnica de PCR quantitativo foi utilizada para verificar a superexpressão do gene *HTRA1* na linhagem imortalizada com HPV 16 (HF698) e na linhagem HPV negativa (C33) após a transfecção com vetor pCMV6/*HTRA1*, em relação as células que receberam o vetor vazio. Para avaliar a expressão do gene selecionado foi utilizado o método de quantificação relativa em relação a um gene endógeno (gene normalizador das reações), o gene *GAPDH*.

O gene *HTRA1* apresentou-se superexpresso na amostra transfectada com o vetor contendo a ORF de *HTRA1* em relação à amostra transfectada com vetor vazio, tanto na linhagem HF698 quanto na C33. Esse resultado demonstra expressão transcricional eficiente deste gene no vetor de expressão pCMV6/*HTRA1* (Figura 6).

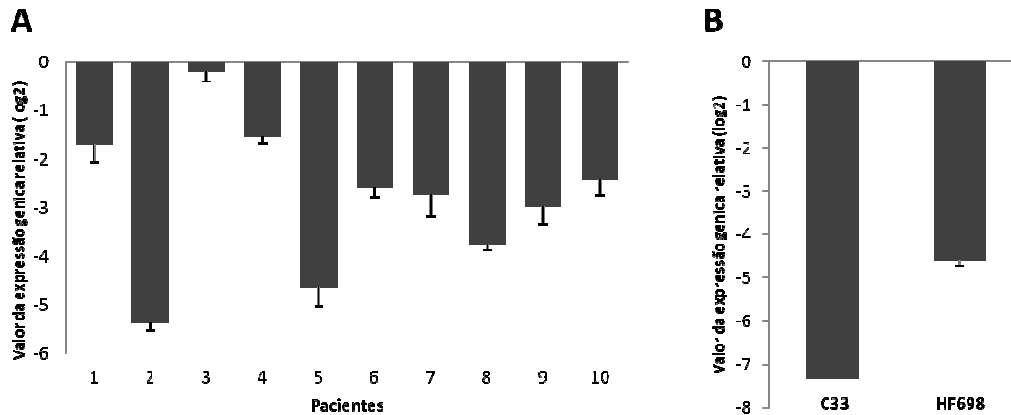


Figura 5. Valor da expressão gênica relativa em Log2 do gene *HTRA1* em amostras de tumor de pênis HPV positivas (A) e nas linhagens HF698 e C33 (B), comparado com amostras de pênis normal (amostra referência).

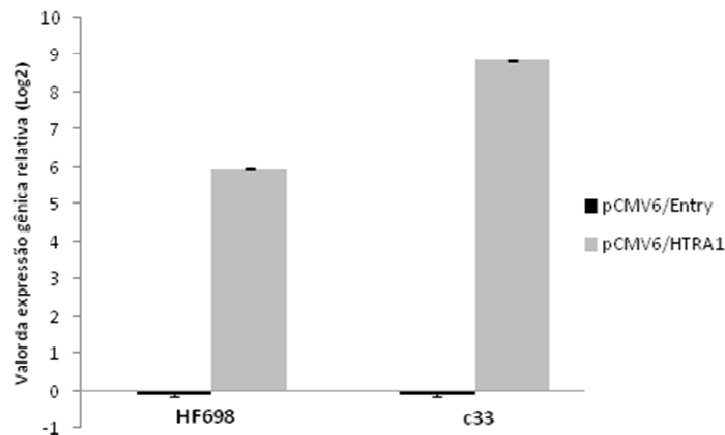


Figura 6. Valor da expressão gênica relativa em Log2 do gene *HTRA1* em linhagem HF698 e C33 transfectada com vetor de expressão contendo ORF de *HTRA1* (cinza) ou vetor vazio (preto), comparado com linhagem não transfectada (amostra referência).

4.3.2. Expressão Gênica de *E6* e *E7*

A técnica de PCR quantitativo foi utilizada para verificar a existência de expressão diferencial dos oncogenes virais *E6* e *E7* após transfecção com vetor de expressão

pCMV6/*HTRA1* ou pCMV6/*Entry* em relação as células não transfectadas com nenhum tipo de vetor, na linhagem de queratinócitos imortalizados por HPV de alto risco (HF698).

Para avaliar a expressão dos oncogenes foi utilizado o método de quantificação relativa em relação a um gene endógeno (gene normalizador das reações), o gene *GAPDH*.

Os oncogenes analisados não apresentaram expressão diferencial após transfecção com o vetor contendo a ORF de *HTRA1* em relação à amostra transfectada com vetor vazio (Figura 7).

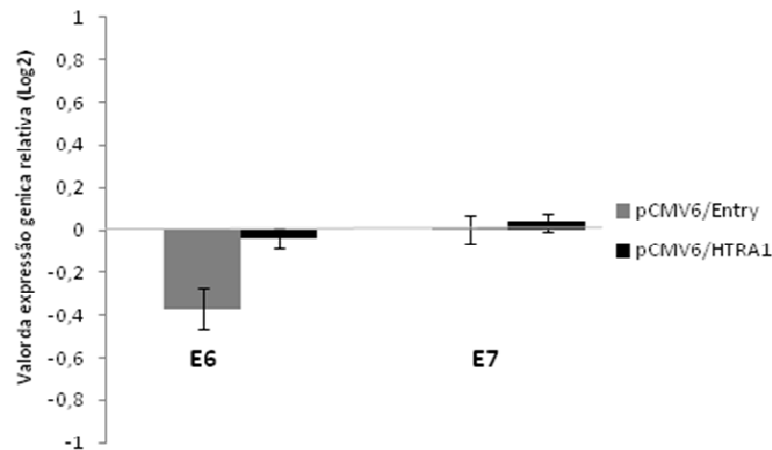


Figura 7. Valor da expressão gênica relativa em Log2 dos oncogenes virais *E6* e *E7* em queratinócito imortalizado por HPV de alto risco (HF698), transfectado com vetor de expressão contendo ORF de *HTRA1* (preto) ou vetor vazio (cinza), comparado com linhagem não transfectada (amostra referência).

4.4. Expressão de HtrA1 por Imunocitoquímica

Após confirmação da expressão de *HTRA1* por qPCR nas linhagens transfectadas com pCMV6/*HTRA1*, foi realizada uma nova transfecção com o mesmo vetor contendo *HTRA1* e vetor vazio, para detecção proteica de HtrA1 por imunocitoquímica.

A presença da proteína HtrA1 foi observada nas linhagens transfectadas com pCMV6/*HTRA1*. Estas células apresentaram um aumento significativo da expressão de HtrA1 quando comparadas às linhagens transfectadas com o vetor de expressão vazio (Figura 8).

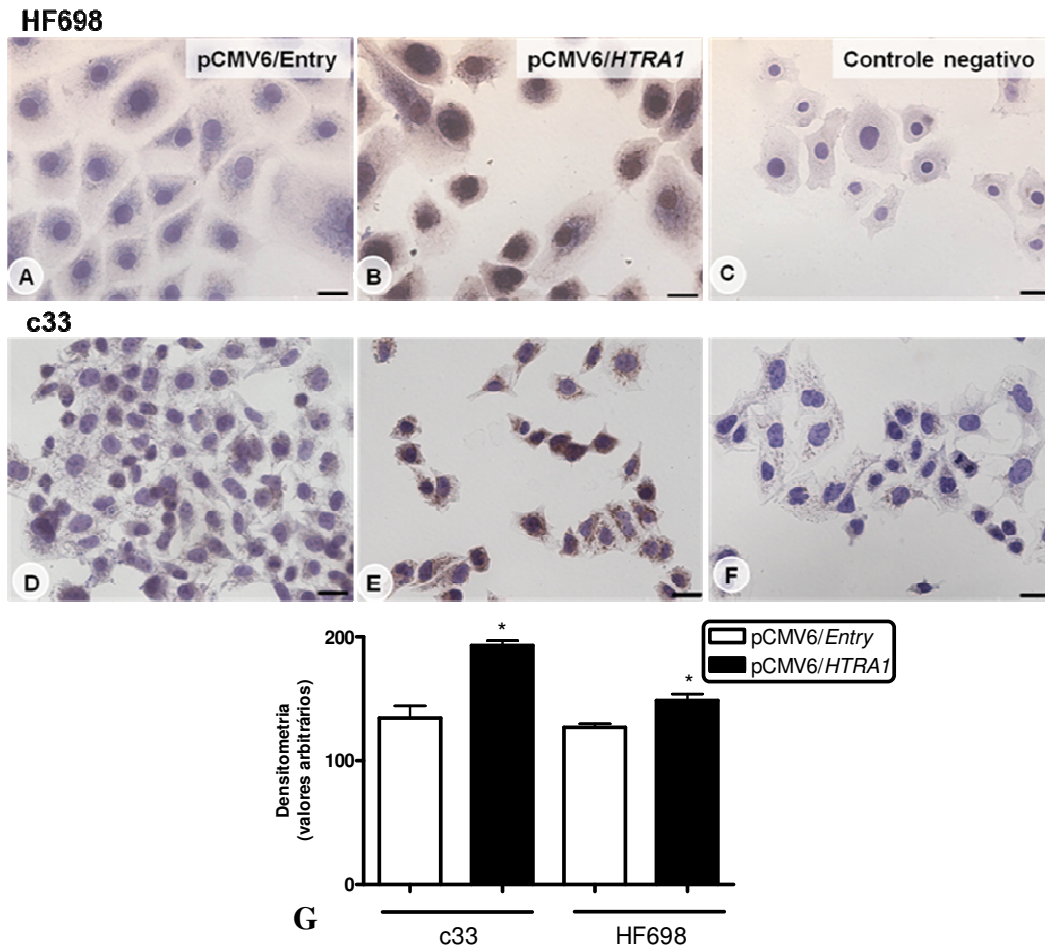


Figura 8 – Imunocitoquímica da proteína HtrA1 superexpressa na linhagem HF698 (B) e C33 (E) transfectada com pCMV6/*HTRA1* e com baixa expressão na linhagem HF698 (A) e C33 transfectada com pCMV6/Entry (D). Controle negativo da reação da HF698 (C) e C33 (F). (G) Análise densitométrica da expressão da proteína HtrA1 nas linhagens transfectadas. *P < 0,01 vs pCMV6/Entry (Mann Whitney test). Barras: 20 µm.

4.5. Ensaio de viabilidade celular (MTT)

4.5.1. Linhagens HF698 e C33 transfectadas com *HTRA1*

Para ensaio de viabilidade celular com MTT (Sigma), células HF698 (3×10^3 células para todos tempos experimentais) e C33 (2×10^4 para o tempo experimental de 24 hrs e $1,5 \times 10^4$ para os tempos de 48 e 72 hrs) foram plaqueadas em placa de 96 poços, em quintuplicata. No dia seguinte, as células receberam somente OPTI-MEM (Life Technologies) e FuGENE HD (Mock); OPTI-MEM (Life Technologies), FuGENE HD (Promega) e vetor vazio ou OPTI-MEM (Life Technologies), FuGENE HD (Promega) e vetor contendo a ORF para *HTRA1*. Após 24, 48 e 72 horas foi realizado o ensaio de viabilidade celular nas duas linhagens. Na linhagem celular HPV positiva, HF698, não foi observada diferença na viabilidade das células transfectadas com vetor

vazio ou vetor pCMV6/*HTRA1* (Figura 9a). Já na linhagem celular HPV negativa, C33, houve redução de cerca de 50% da viabilidade celular nas células superexpressando HtrA1 comparado às células que receberam vetor vazio, em todos os tempos experimentais (24, 48 e 72 horas) (Figura 9b).

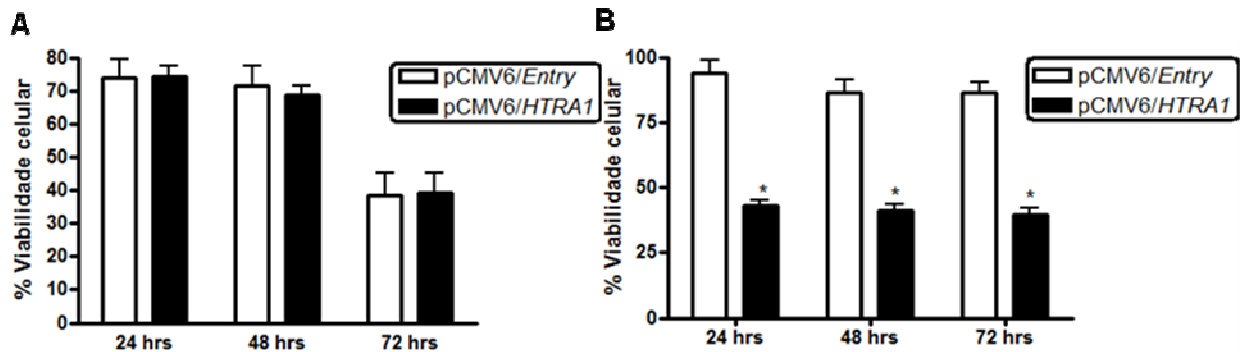


Figura 9. Ensaio de viabilidade celular. Efeito da superexpressão de HtrA1 na viabilidade celular da linhagem HF698 (A) e C33 (B) transfectadas com vetor contendo *HTRA1* ou vetor vazio. * $P < 0,0001$ versus pCMV6/Entry (*t*-student).

4.5.2. Linhagem HF698 transfectada com dsRNA

Para avaliar os possíveis efeitos citotóxicos causados pelo tratamento com diferentes moléculas de dsRNAs na linhagem HF698 foi realizado ensaio de viabilidade celular por MTT, após 72 hrs de transfecção com dsRNAs nas concentrações de 1 e 3 nM. As amostras foram analisadas em quintuplicata, em dois eventos independentes, como descrito previamente.

A viabilidade celular com todos dsRNAs utilizados se manteve acima de 50%, sendo que a maior viabilidade foi de cerca de 80% com o dsRNA E6(3) (Figura 10).

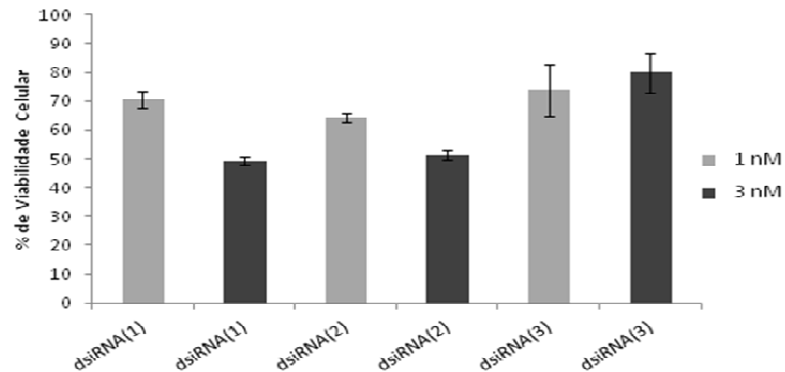


Figura 10. Ensaio de viabilidade celular após tratamento com três dsRNAs construídos para diferentes regiões de E6, nas concentrações de 1 nM e 3 nM.

4.6. Ensaio de formação de colônia

4.6.1. Linhagens celulares HF698 e C33

Após a seleção por 14 dias com antibiótico G418, em três eventos independentes, foi observado aumento no número de colônias nas células superexpressando HtrA1 na linhagem HPV positiva, HF698 (Figura 11a e b). Entretanto, na linhagem HPV negativa, a C33, a superexpressão de HtrA1 levou a redução significativa no número de colônias comparado ao grupo transfectado com vetor vazio (Figura 11c e d).

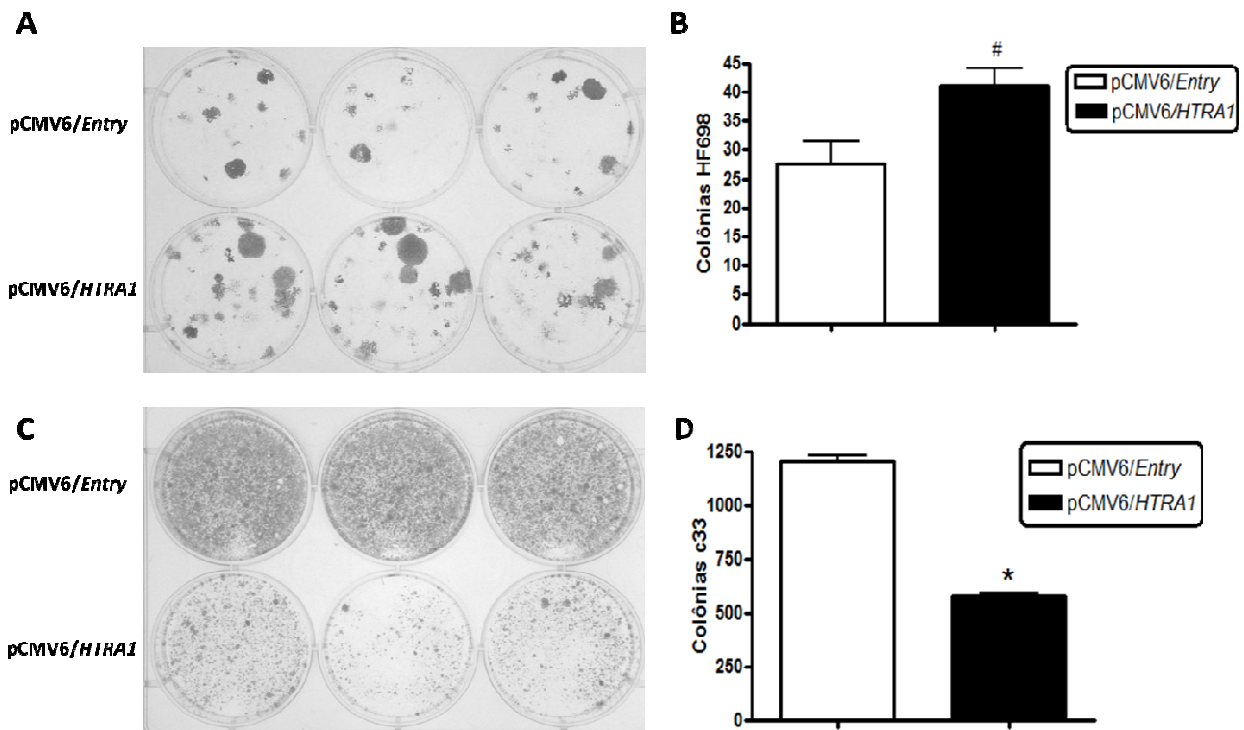


Figura 11. Ensaio de Formação de Colônia nas linhagens HF698 e C33. Número de colônias após superexpressão de HtrA1 ou transfecção com vetor vazio na linhagem HPV positiva, HF698 (A e B), e HPV negativa, C33 (C e D). # $P < 0,05$ vs pCMV6/Entry; * $P < 0,01$ vs pCMV6/Entry (*t*-student).

4.6.2. Linhagem estável de C33 contendo gene E6 de HPV 16

Após seleção com G418, a confirmação da expressão de E6 pela linhagem estável C33/pLXSN-E6 foi obtida por qPCR (Figura 12a). A expressão proteica de E6 foi confirmada indiretamente, devido à ausência de anticorpo comercial para E6, pela diminuição da expressão de p53 (Figura 12b). Com objetivo de confirmar se na presença de E6 e superexpressão de HtrA1 o número de células aumenta, como observado na linhagem HPV positiva, HF698, foi realizado

um ensaio de formação de colônia com as linhagens C33/pLXSN-E6 e C33/pLXSN, com e sem transfecção com pCMV6/*HTRA1*.

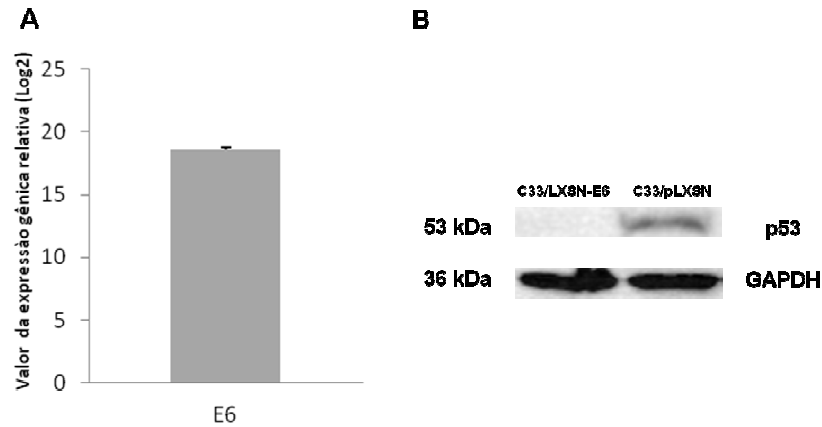


Figura 12. Valor da expressão relativa em Log2 do gene *E6* (A) e diminuição da expressão proteica de p53 (B) na linhagem C33 contendo *E6* de HPV 16 (C33/pLXSN-E6), comparado com a linhagem com vetor vazio (C33/pLXSN). Como controle da reação foi utilizado o anticorpo de camundongo anti-GAPDH para detecção da proteína endógena de 36 kDa.

Foi observado, em três eventos independentes, aumento no número de colônias nas células superexpressando *HtrA1* na linhagem C33/pLXSN-E6, comparado com C33/pLXSN (Figura 13a e b), assim como observado na linhagem HPV positiva, HF698. Nos grupos controles, C33/pLXSN-E6 e C33/pLXSN sem transfecção com *HTRA1*, não houve diferença no número de colônias, permitindo inferir que a presença de E6 não é suficiente para aumentar a formação de colônias (Figura 13c e d). Portanto, o aumento só é observado na linhagem C33 que possui vetores de expressão de *E6* e *HTRA1*.

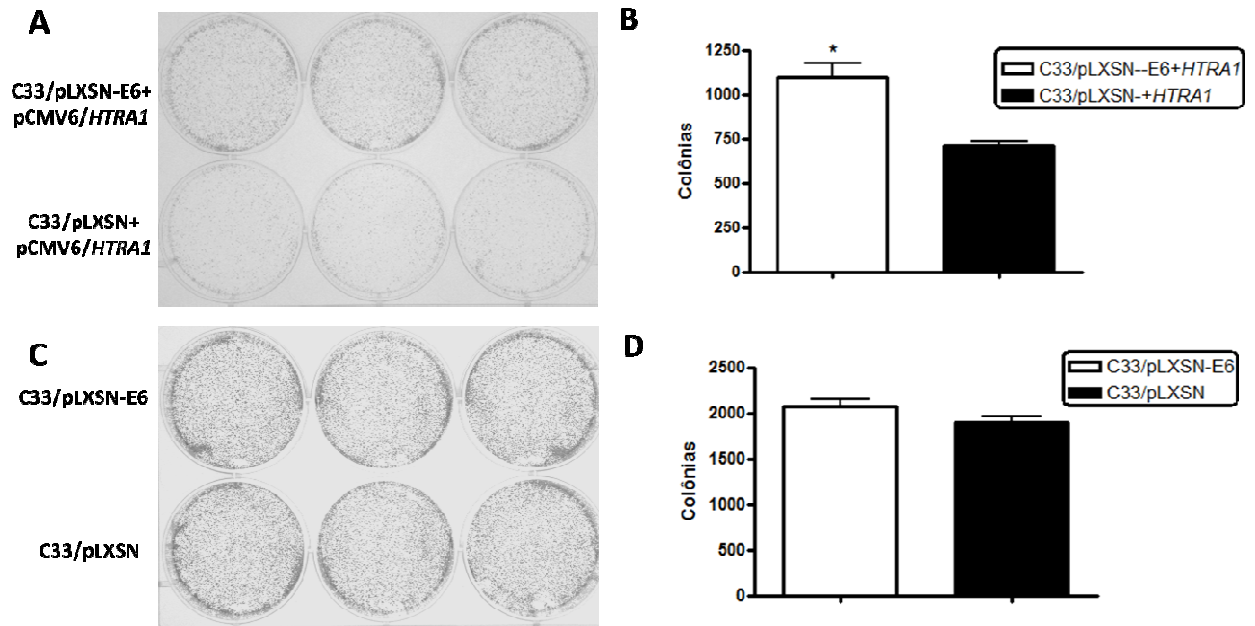


Figura 13. Ensaio de Formação de Colônia nas linhagens estáveis C33 contendo E6 de HPV 16 ou vetor vazio. Número de colônias após superexpressão (**A e B**) ou não (**C e D**) de *HTRA1* nas linhagens estáveis C33 contendo E6 de HPV 16 ou vetor vazio. * $P < 0,01$ vs C33/pLXSN+pCMV6/HTRA1 (*t-student*).

4.7. Ensaio de apoptose por Citometria de Fluxo

A capacidade da proteína HtrA1 induzir apoptose foi avaliada por meio do kit FITC Annexin V Apoptosis Detection II (BD) em citômetro de fluxo. A análise da apoptose foi realizada 24, 48 e 72 horas após a transfecção com os vetores pCMV6/Entry e pCMV6/*HTRA1* nas linhagens HPV positiva (HF698) e HPV negativa (C33).

Não foi observado diferença, em nenhuma das linhagens celulares, na porcentagem de células apoptóticas entre as células transfectadas com vetor contendo a ORF de *HTRA1* ou vetor vazio, em todos os tempos analisados ($p > 0,05$) (Figura 14).

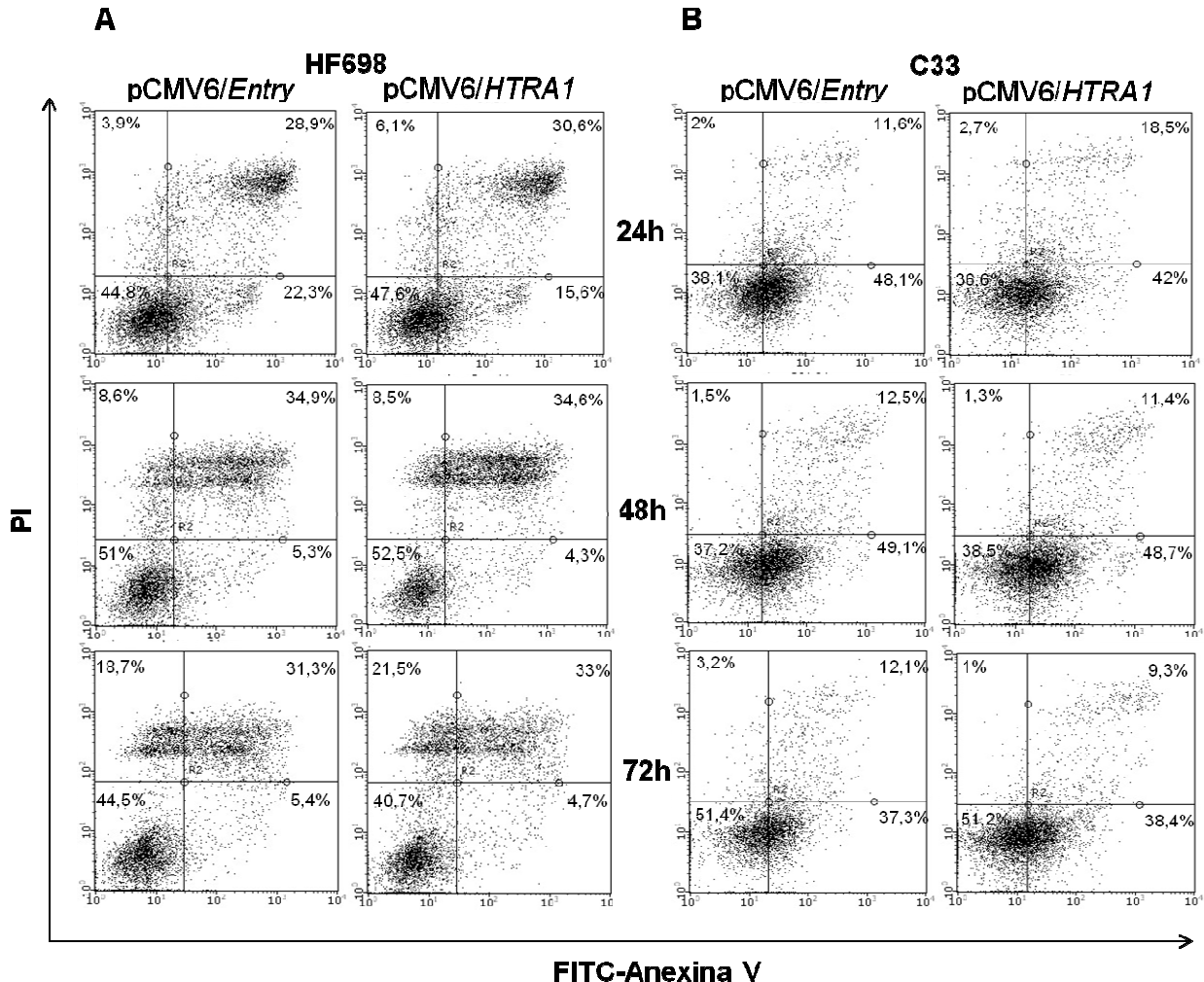


Figura 14. Ensaio de apoptose. Análise da Apoptose 24, 48 e 72 horas após a transfecção com pCMV6/Entry e pCMV6/HTRA1 nas células HF698 (A) e C33 (B). Na população duplo negativo (FITC-Anexina V - /PI -) estão as células viáveis, na população de células positivas somente para FITC-Anexina V (FITC-Anexina V + /PI -) estão as células em apoptose inicial, enquanto na população de células positivas para iodeto de propídeo estão as células necróticas (FITC-Anexina V - /PI +). A população de células duplo positivo estão em apoptose tardia ou processo de necrose (FICT-Anexina V + /PI +).

4.8. Ensaio de ciclo celular por Citometria de Fluxo

Para avaliar se HtrA1 altera a progressão do ciclo celular nas linhagens HF698 e C33, as fases do ciclo celular foram analisadas por citometria de fluxo após 24, 48 e 72 horas de transfecção com os vetores pCMV6/Entry e pCMV6/HTRA1.

Na linhagem HPV positiva a superexpressão de HtrA1 desencadeou progressão do ciclo celular. Havia uma maior porcentagem de células transfectadas com pCMV6/HTRA1 na fase G2/M comparado com as transfectadas com vetor vazio. Além disso, a população de células

superexpressando *HtrA1* possuía um número significativamente menor de células em G0/G1, indicando crescimento celular (Figura 15a).

Na linhagem HPV negativa, C33, não foi observada diferença significativa na porcentagem de células em cada etapa do ciclo celular entre as células transfectadas com *HTRA1* ou vetor vazio (Figura 15b).

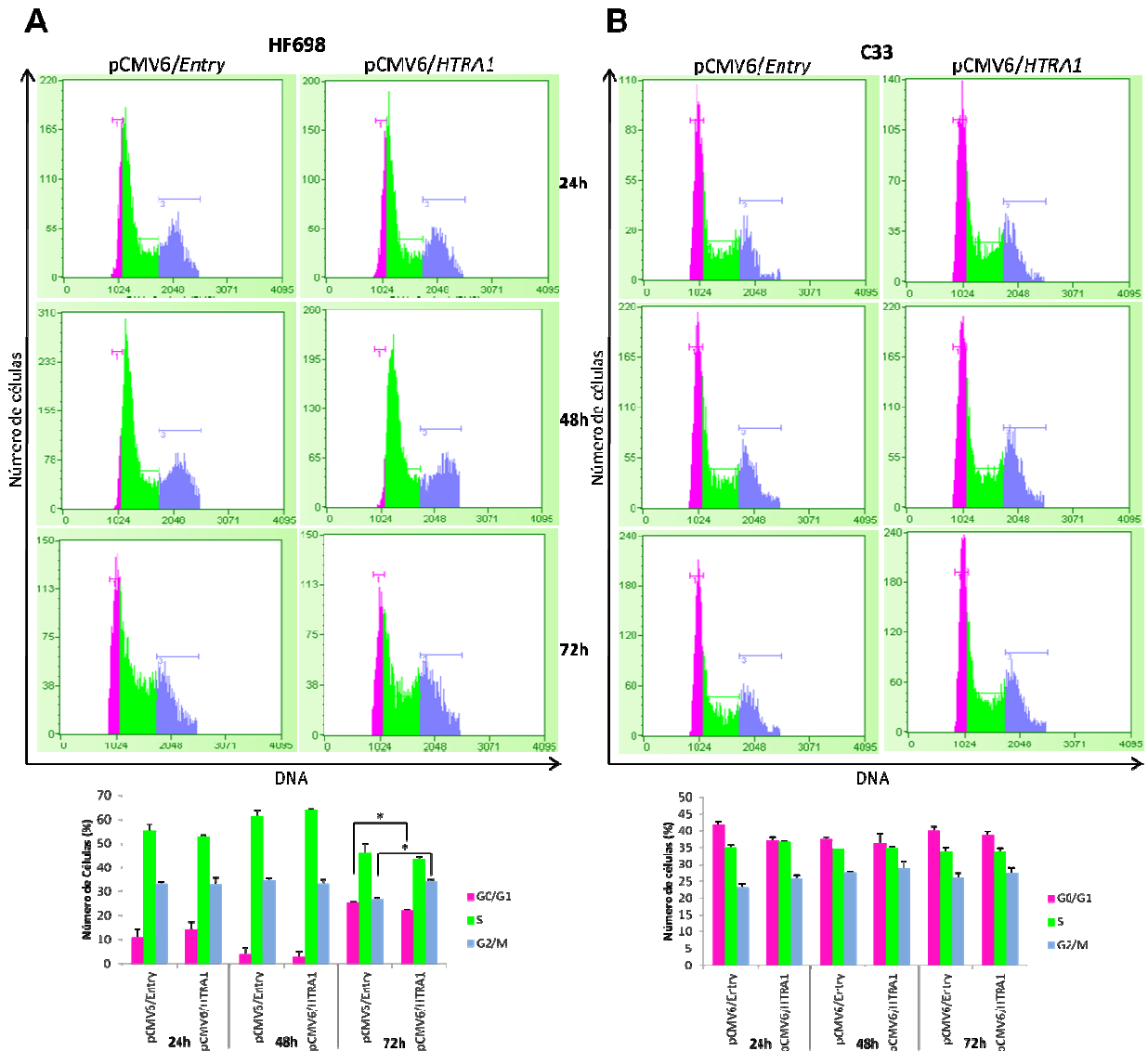


Figura 15. Análise do ciclo celular. Histogramas e representação gráfica do ciclo celular da linhagem HF698 (A) e C33 (B) após 72 horas de superexpressão do gene *HTRA1* (pCMV6/*HTRA1*) ou transfecção com vetor vazio. $P^* < 0,01$ (*t-student*).

4.9. Silenciamento transcricional de E6 com dsRNA

Para avaliar se a oncoproteína E6 exerce controle, em nível transcricional, na expressão de *HTRAI* utilizamos três diferentes dsRNAs nas concentrações de 1 nM e 3 nM com a finalidade de silenciar E6. Entretanto, somente o dsRNA HPV16 E6(3) na concentração de 3 nM foi capaz de inibir 60% da expressão deste oncogene (Figura 16a).

O cDNA das amostras em que E6 teve sua expressão silenciada em 60% foi utilizado para avaliar, por PCR quantitativo, a expressão do gene *HTRAI*. Observou-se que o silenciamento de E6 não altera o nível de expressão de *HTRAI*, portanto, E6 não exerce efeito transcricional sobre *HTRAI* (Figura 16b).

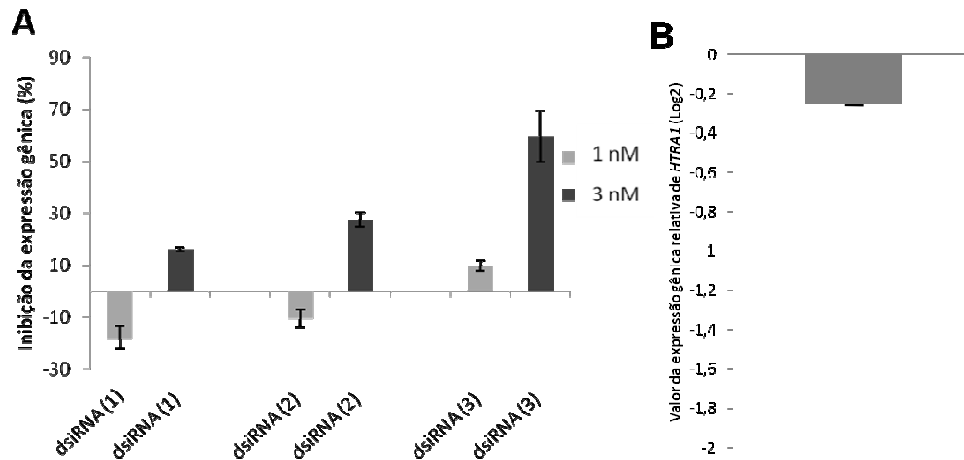


Figura 16. Silenciamento de E6 com dsRNAs. **(A)** Efeito da transfecção de três dsRNAs construídos para diferentes regiões de E6, a 1 nM e 3 nM, na inibição da expressão deste oncogene na linhagem HF698. **(B)** Valor da expressão gênica relativa em Log2 do gene *HTRAI* em linhagem HF698 após inibição de cerca de 60% da expressão de E6 pelo dsRNA(3) a 3 nM, comparado com amostra transfectada com dsRNA controle (NC1) (amostra referência).

5. DISCUSSÃO

A infecção por Papilomavírus humano (HPV) é muito comum e está associada a diversas doenças malignas (EINSTEN et al., 2009). Entre as proteínas virais, E6 e E7 são as que atraem maior atenção em decorrência de sua capacidade de transformar e imortalizar células. Alguns dos mecanismos usados na transformação celular pela proteína E6 consiste no controle transcricional de genes, como a inibição do supressor de tumor BTG2 (CULLMAN et al., 2009) e de p21^{WAF1} (PARROCHE et al., 2011); e na interação de sua região carboxi-terminal com domínios PDZs de proteínas celulares, levando-as a degradação. Entre estas proteínas estão a DLG, um supressor de tumor (LEE et al., 1997; GARDIOL et al., 1999); MAGI-1 (GLAUNSINGER et al., 2000) e PATJ (LATORRE et al., 2005), proteínas relacionadas a formação das junções celulares; MUPP1, um transdutor de sinal (LEE et al., 2000) e hScrib, uma proteína importante na manutenção da polaridade celular (NICOLAIDES et al., 2011).

O domínio PDZ está presente somente em E6 de HPVs de alto risco, sugerindo que a presença dessa região carboxi-terminal e a interação com proteínas celulares são importantes para o potencial oncogênico (KIYONO et al., 1997; NGUYEN et al., 2003; NAGASAKA et al., 2013). Spanos e colaboradores (2008a) confirmaram a contribuição do domínio carboxi-terminal de E6 de HPV 16 na imortalização de queratinócitos, uma vez que células expressando E6 com PDZ mutado não desenvolvem essa característica. Da mesma forma, Spanos e colaboradores (2008b) observaram em queratinócitos que a interação do domínio PDZ de E6 (HPV 16) com PTPN13, uma proteína relacionada à sobrevivência celular, induz perda de PTPN13, ativação do oncogene Ras e consequente crescimento independente de ancoragem e invasividade. Em células epiteliais do sistema respiratório, James e colaboradores (2006) observaram que E6 depende do domínio PDZ para ativar NF- κ B e inibir apoptose induzida por TNF.

No presente estudo foi selecionada uma proteína que poderia interagir com a oncoproteína E6 de HPV de alto risco. O gene *HTRAI* foi escolhido a partir de um resultado de microarray, obtido pelo grupo da Dra. Luísa Lina Villa, que indicou baixa expressão desse gene na linhagem HF698 (TERMINI et al., 2008). Além disso, resultados obtidos em nosso laboratório por PCR quantitativo também mostraram baixa expressão de *HTRAI* em queratinócitos imortalizados por HPV 16 (HF698), em linhagem celular de carcinoma cervical HPV negativa (C33) e em 70% das amostras analisadas de tumor de pênis positivas para HPV, quando comparados com amostras de pênis normal. A proteína codificada por este gene possui funções diversas e apresenta em sua

estrutura um domínio PDZ na região C-terminal, assim como proteínas reconhecidas pela proteína viral E6 de HPV de alto risco (MALET et al., 2012).

A família de enzimas HtrA são serino-proteases conservadas de procariotos (DegP) a humanos, responsáveis por reconhecer proteínas com conformação incorreta e destiná-las ao redobramento ou degradação (TURUNEN et al., 2011; PAGE, DI CERA, 2008). HtrA1 foi a primeira serino-protease humana descrita desta família (ZUMBRUNN, TRUEB, 1996; HU et al., 1998). O papel específico do domínio PDZ de HtrA1 não é claro, entretanto, Karring e colaboradores (2012) mostrou que HtrA1 é capaz de reconhecer sequências C-terminais e internas de caráter hidrofóbico de outras proteínas, e realizar processamento proteolítico, como observado com a proteína TGFBIp, presente em amostras de depósitos córneos.

HtrA1 é uma proteína expressa em vários tecidos e com uma variedade de alvos, sendo a maioria proteínas da matriz extracelular, como colágeno tipo III, fibronectina e certos componentes da cartilagem, sugerindo um papel em promover a degeneração dos componentes da matriz extracelular (MURWANTOKO et al., 2004; GRAU et al., 2006; TSUCHIYA et al., 2005). Entretanto, alguns substratos intracelulares já foram descritos, entre eles a proteína TSC2 (*Tuberous Schlerosis Complex 2 Protein*), relacionada com crescimento e divisão celular (CAMPIONI et al., 2010) e a proteína XIAP, um inibidor da cascata das caspases (HE et al., 2012).

Diferentes trabalhos demonstram o envolvimento de HtrA1 na sinalização de TGF β (OKA et al., 2004), na resistência a quimioterapia (CHIEN et al., 2006) e com desenvolvimento de várias doenças como artrite (MILNER et al., 2008), isquemia de pequenos vasos cerebrais (HARA et al., 2009) e degeneração macular (COLEMAN et al., 2008). Além disso, a diminuição da expressão de HtrA1 em vários cânceres, como melanomas, câncer de pulmão e ovário, e a redução da proliferação celular após aumento de sua expressão, sugerem um papel supressor de tumor dessa proteína (BALDI et al., 2002; ESPOSITO et al., 2006; CHIEN et al., 2009).

Neste estudo utilizamos linhagens celulares, HPV positiva (HF698) e HPV negativa (C33), com baixa expressão de *HTRA1* previamente confirmada. Com a finalidade de avaliar a função deste gene nas linhagens HF698 e C33, as células foram transfectadas com vetor de expressão contendo a ORF de *HTRA1*. Após estabelecida a transfecção com pCMV6/*HTRA1*, a superexpressão de *HTRA1* foi confirmada por qPCR e por imunocitoquímica, o que permitiu o desenvolvimento dos estudos funcionais propostos.

Na linhagem de carcinoma cervical (C33) as células superexpressando HtrA1 apresentaram redução de cerca de 50% no número de colônias formadas. Essas células também apresentaram redução significativa na viabilidade celular, em todos os tempos experimentais, comparado com as células com baixa expressão dessa proteína. Outros trabalhos também observaram que a superexpressão de HtrA1 desencadeia diminuição de viabilidade em ensaio de MTT (HE et al., 2010; CHIEN et al., 2006) e diminuição no número de colônias em matriz de soft ágar (HE et al., 2010).

Diferentemente, na linhagem de queratinócitos imortalizados por HPV de alto risco (HF698), as células superexpressando HtrA1 apresentaram aumento significativo de colônias. Entretanto, não apresentaram diferença na viabilidade celular, em todos os tempos experimentais, em relação às células com baixa expressão de HtrA1. No ensaio de formação de colônia, o aumento no número de células no grupo superexpressando HtrA1 foi observado a partir de cerca do décimo dia de seleção. Portanto, no ensaio de MTT, provavelmente não houve diferença na viabilidade celular da HF698 entre os grupos, pois os tempos experimentais foram muito curtos (24hrs, 48hrs e 72hrs) para observar tal efeito.

He e colaboradores (2010) demonstraram que a superexpressão de HtrA1 em células de câncer de ovário induz apoptose *in vitro* e *in vivo*. Além disso, o silenciamento de *HTRA1* com shRNA promove aumento da sobrevivência celular em ensaio de apoptose e de viabilidade celular, e redução nos níveis de caspase-3, confirmando o papel pró-apoptótico de *HTRA1* em células de câncer de ovário. Um dos mecanismos que HtrA1 desencadeia morte celular programada, em células de câncer de ovário, é através da degradação de uma proteína inibidora de apoptose, a XIAP (HE et al., 2012). A elevação dos níveis de HtrA1 também induz apoptose e redução de invasão celular, acompanhada de aumento da atividade da caspase-3 e diminuição de MMP-9, uma metaloproteinase que degrada matriz extracelular, em carcinoma epidermóide de esôfago (XIA et al., 2013). Embora em alguns cânceres (HE et al., 2012; XIA et al., 2013) HtrA1 possua um papel pró-apoptótico, no presente trabalho HtrA1 não alterou a taxa de morte celular programada nas linhagens C33 e HF698.

Além de apoptose, alguns trabalhos descreveram um papel de HtrA1 na inibição de proliferação celular. Xia e colaboradores (2013) observaram inibição da proliferação celular de células de carcinoma epidermóide de esôfago *in vitro* e *in vivo* após superexpressão de HtrA1, juntamente com diminuição dos níveis de Ki-67, um marcador de proliferação. Em linhagens de

câncer de endométrio também foi observado que a supressão da proteína HtrA1 aumenta a migração celular, evidenciando que a ausência HtrA1 contribui para o fenótipo metastático (MULLANY et al., 2011).

Considerando que HtrA1 não alterou a taxa de apoptose nas linhagens celulares estudadas, avaliamos o efeito desta proteína nas etapas do ciclo celular. Na linhagem C33, a superexpressão de HtrA1 não desencadeou alteração no ciclo celular. Dessa forma, novos estudos são necessários para entendimento do mecanismo envolvido na redução do número de células nesta linhagem após superexpressão de HtrA1. Já na linhagem positiva para HPV de alto risco, observamos que a superexpressão de HtrA1 desencadeia a progressão do ciclo celular a partir de 72 horas de transfecção, através do aumento da porcentagem de células nas fases G2/M e redução das células em G0/G1.

Nossos resultados com a linhagem HF698 diferem de estudos funcionais para o gene *HTRA1* descritos na literatura, que comprovam que HtrA1 possui papel pró-apoptótico, inibidor de proliferação e de invasão celular, que desencadeiam redução no número de células (BALDI et al., 2002; CHIEN et al., 2006; ESPOSITO et al., 2006; CHIEN et al., 2009; MULLANY et al., 2011; HE et al., 2010; XIA et al., 2013). Entretanto, nenhum desses estudos utilizou células HPV positivas. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que os diferentes padrões de número e viabilidade celular nas duas linhagens estudadas devem ser decorrentes da presença (HF698) ou ausência (C33) do genoma do HPV. As proteínas do Papilomavírus humano, provavelmente, influenciam na atividade de HtrA1. Com objetivo de confirmar esta hipótese, avaliamos se a expressão de E6 na linhagem C33 altera o número de colônias após superexpressão de HtrA1 e ensaio de formação de colônia, em relação a linhagem C33 sem E6. Foi observado aumento no número de colônias nas células C33 expressando a oncoproteína E6 e HtrA1, com padrão semelhante à linhagem HF698 com superexpressão de HtrA1, o que sugere interação entre essas duas proteínas.

A interação entre a proteína HtrA1 e as oncoproteínas E6 e E7 do HPV foi observada, por Clawson e colaboradores (2008), através de imunoprecipitação. Além disso, alguns trabalhos sugerem que a interação de E6 com domínios PDZs de proteínas celulares aumenta a estabilidade da proteína viral, o que permite um nível suficiente dessa oncoproteína e contribui para manutenção do genoma do HPV nas células hospedeiras (LEE, LAIMINS, 2004; NICOLAIDES et al., 2011).

Nicolaides e colaboradores (2011) observaram que a interação entre E6 e o domínio PDZ das proteínas celulares hScrib e MAGI, responsáveis por regular a polaridade da célula, aumenta significativamente os níveis da oncoproteína E6 em queratinócitos imortalizados (NIKS), provavelmente, por evitar sua degradação proteossomal. Além disso, demonstraram que as células NIKS tranfectadas com genoma de HPV 16 mutado na região carboxi-terminal apresentam baixos níveis de E6 e o genoma viral é incapaz de se manter na forma episomal, sendo degradado ou integrado no genoma da célula hospedeira. Em HPV 31, a perda do domínio PDZ de E6 desencadeia redução no número de cópias virais na célula e diminuição nas taxas de crescimento celular em queratinócitos de prepúcio humano (HFk), evidenciando a importância desse domínio em estabilizar o genoma viral (LEE, LAIMINS, 2004).

Além da função de HtrA1 nas linhagens HF698 e C33, avaliamos se E6 exerce controle transcricional sobre *HTRAI*, através do silenciamento deste oncogene viral. Diferentemente do observado para alguns genes, como BTG2 (CULLMAN et al., 2009) e p21^{WAF1} (PARROCHE et al., 2011) que são transcionalmente inibidos por E6 através de mecanismos dependente e independente de p53, respectivamente, a supressão de E6 não altera a expressão de *HTRAI*. Da mesma forma, a superexpressão de HtrA1 não altera a expressão dos oncogenes virais E6 e E7. Este e os demais resultados com a linhagem HF698 sugerem que E6 regula atividade de *HTRAI* somente em nível proteico e não exerce efeito transcricional sobre este gene.

Os resultados deste trabalho mostram que HtrA1 reduz o número de células em linhagem HPV negativa, assim como descrito na literatura (BALDI et al., 2002; CHIEN et al., 2006; ESPOSITO et al., 2006; CHIEN et al., 2009; MULLANY et al., 2011; HE et al., 2010; XIA et al., 2013), entretanto, HtrA1 aumenta o crescimento celular em linhagens HPV positivas. Além disso, sugerem que o efeito observado na linhagem HF698 é decorrente da interação de HtrA1 com a proteína E6 de HPV de alto risco, já que na linhagem estável C33 superexpressando a oncoproteína E6 e HtrA1 a proporção de colônias foi semelhante à linhagem HF698 tranfectada com *HTRAI*. A interação de E6 com domínio PDZ de HtrA1 poderia aumentar a estabilidade dessa oncoproteína, favorecendo a manutenção do genoma viral na célula e potencializando sua atividade de transformação celular.

6. CONCLUSÕES

- A transfecção com pCMV6/*HTRA1* é eficiente em induzir a superexpressão de HtrA1 nas linhagens celulares estudadas.
- A expressão de HtrA1 não altera a expressão dos oncogenes E6 e E7 de HPV 16.
- O silenciamento de E6 não altera a expressão de *HTRA1*.
- A superexpressão de HtrA1 desencadeia redução no número de células na linhagem HPV negativa (C33).
- A superexpressão de HtrA1 na linhagem celular HPV positiva (HF698) desencadeia aumento no número de células, através da indução das fases G2/M do ciclo celular, desencadeando divisão celular.
- A superexpressão simultânea de *E6* e *HTRA1* na linhagem C33/pLXSN-E6 desencadeia aumento no número de colônias.
- O aumento no número de células nas linhagens HPV positivas (HF698 e C33/pLXSN-E6) transfectadas com pCMV6/*HTRA1* pode ser decorrente da interação de E6 de HPV de alto risco com a protease HtrA1.
- Estudos adicionais são necessários para desvendar o mecanismo envolvido na redução do número de células na linhagem C33 após superexpressão de HtrA1.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARBYN, M. et al. Worldwide burden of cervical cancer in 2008. **Ann. Oncol.**, v. 22, p. 2675–2686, 2011.
- BAKER, C.C.; PHELPS, W.C.; LINDGREN, V.; BRAUN, M.J.; GONDA, M.A.; HOWLEY, P.M. Structural and translational analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. **Journal of Virology**, v. 61, p. 962–971, 1987.
- BALDI, D.L.A. et al. The *HtrA1* serine protease is down-regulated during human melanoma progression and represses growth of metastatic melanoma cells. **Oncogene**, v. 21, n. 43, p. 6684–6688, 2002.
- BERNARD, H.U.; BURK, R.D.; CHEN, Z.; VAN DOORSLAER, K.; HAUSEN, H.; DE VILLIERS E.M. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**, v. 401, n.1, p. 70-79, 2010.
- BUCK, C.B.; DAY, P.M.; TRUS, B.L. The papillomavirus major capsid protein L1. **Virology**, v. 445, p. 169–174, 2013.
- CAMPIONI, M. The serine protease *HtrA1* specifically interacts and degrades the tuberous sclerosis complex 2 protein. **Mol Cancer Res.**, v. 8, n. 9, p. 1248-1260, 2010.
- CHIEN, J. Serine protease *HtrA1* modulates chemotherapy-induced cytotoxicity. **J Clin Invest**, v. 116, p. 1994–2004, 2006.
- CHIEN, J.; CAMPIONI, M.; SHRIDHAR, V.; BALDI, A. HtrA serine proteases as potential therapeutic targets in cancer. **Curr Cancer Drug Targets.**, v. 9, n. 4, p. 451-468, 2009.
- CLAUSEN, T.; SOUTHAN, C.; EHRMANN, M. The HtrA family of proteases: implications for protein composition and cell fate. **Mol. Cell.**, v. 10, p. 443–455, 2002.
- CLAWSON, G.A.; BUI, V.; XIN, P.; WANG, N.; PAN, W. Intracellular Localization of the Tumor Suppressor *HtrA1/Prss11* and its Association With HPV16 E6 and E7 Proteins. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 105, p. 81–88, 2008.
- COGLIANO, V.; BAAN, R.; STRAIF, K.; GROSSE, Y.; SECRETAN, B.; EL GHISSASSI, F. Carcinogenicity of human papillomaviruses. **Lancet Oncol**, v. 6, p. 204, 2005.
- COLEMAN, H.R.; CHAN, C.C.; FERRIS, F.L.; CHEW, E.Y. Age-related macular degeneration. **Lancet.**, v. 22, n. 372, p. 1835-1845, 2008.
- CULLMANN, C. et al. Oncogenic human papillomaviruses block expression of the B-cell translocation gene-2 tumor suppressor gene. **Int. J. Cancer**, v. 125, p. 2014–2020, 2009.

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

EINSTEIN, M.H. et al. Clinician's guide to human papillomavirus immunology: knowns and unknowns. **Lancet Infect Dis**, v. 9, n. 6, p. 347–356, 2009.

ESPOSITO V. et al. Analysis of *HtrA1* serine protease expression in human lung cancer. **Anticancer Res.**, v. 26, n. 5A, p. 3455-9, 2006.

FAUQUET, C. M.; DESSELBERGER, U.; MANILOFF, J.; MAYO, M.A.; BALL, L.A. **Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. Elsevier, 2 ed., 2005.

GARDIOL, D. et al. Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the discs large tumour suppressor for proteasome-mediated degradation. **Oncogene**, v. 18, n. 40, p. 5487–5496, 1999.

GIULIANO, A.R. The human papillomavirus infection in men study: human papillomavirus prevalence and type distribution among men residing in Brazil, Mexico, and the United States, **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 17, n. 8, p. 2036–2043, 2008.

GLAUNSINGER, B.A. et al. Interactions of the PDZ-protein MAGI-1 with adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus E6 oncoproteins. **Oncogene**, v. 19, p. 5270–5280, 2000.

GRAU, S. et al. The role of human *HtrA1* in arthritic disease. **J Biol Chem.**, v. 281, n. 10, p. 6124-6129, 2006.

HARA, K. et al. Association of *HTRAI* Mutations and Familial Ischemic Cerebral Small-Vessel Disease. **N. Engl. J. Med**, v. 360, p. 1729-1739, 2009.

HAWLEY-NELSON, P.; VOUSDEN, K. H.; HUBBERT, N. L.; LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T. HPV 16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. **EMBO J.**, v. 8, p. 3905–3910, 1989.

HE, X.; OTA, T.; LIU, P.; SU, C.; CHIEN, J.; SHRIDHAR, V. Downregulation of HtrA1 promotes resistance to anoikis and peritoneal dissemination of ovarian cancer cells. **Cancer Res.**, v. 70, n. 8, p. 3109–3118, 2010.

HE, X.; KHURANA, A.; MAGUIRE, J.L.; CHIEN, J.; SHRIDHAR, V. HtrA1 sensitizes ovarian cancer cells to cisplatin-induced cytotoxicity by targeting XIAP for degradation. **Int J Cancer.**, v. 130, n. 5, p. 1029-1035, 2012.

HSU, C.H. et al. The HPV E6 oncoprotein targets histone methyltransferases for modulating specific gene transcription. **Oncogene**, p. 1-15, 2011.

HU, S.I; CAROZZA, M.; KLEIN, M.; NANTERMET, P.; LUK, D.; CROWL, R.M. Human HtrA, an Evolutionarily Conserved Serine Protease Identified as a Differentially Expressed Gene Product in Osteoarthritic Cartilage. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p.34406–34412, 1998.

HUESGEN, P.F.; SCHUHMANN, H.; ADAMSKA, I. Deg/HtrA proteases as components of a network for photosystem II quality control in chloroplasts and cyanobacteria. **Res Microbiol.**, v. 160, p. 726–732, 2009.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Câncer de colo de útero.<
http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo_uterio/definicao>.
 Acesso em 07 de outubro de 2013.

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, p. 5301–5307, 2006.

JEON, S; LAMBERT, P.F. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. **Proc Natl Acad Sci**, v. 92, n. 5, p. 1654-1658, 1995.

JONES, D.L.; THOMPSON, D.A.; MUNGER, K. Destabilization of the RB tumor suppressor protein and stabilization of p53 contribute to HPV type 16 E7-induced apoptosis. **Virology**, v. 239, n. 1, p. 97–107, 1997.

KARRING, H.; RUNAGER, K.; THOGERSEN, I.B.; KLINTWORTH, G.K.; HOJRUP, P.; ENGHILD, J.J. Composition and proteolytic processing of corneal deposits associated with mutations in the TGFBI gene. **Experimental Eye Research**, 2012.

KIYONO, T.; HIRAIWA, A.; FUJITA, M.; HAYASHI, Y.; AKIYAMA, T.; ISHIBASHI, M. Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.94, n.21, p. 11612–11616, 1997.

KRAUS, I. et al. The majority of viral-cellular fusion transcripts in cervical carcinomas cotranscribe cellular sequences of known or predicted genes. **Cancer Res**, v. 68, p. 2514-2522, 2008.

KUMARASWAMY, K.L.; VUDHYA, M. Human papilloma virus and oral infections: An update. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 7, n. 2, 2011.

LATORRE, I. J. et al. Viral oncoprotein-induced mislocalization of select PDZ proteins disrupts tight junctions and causes polarity defects in epithelial cells. **J. Cell Sci.**, v. 118, n. 18, p. 4283–4293, 2005).

LEE, S. S.; WEISS, R.S.; JAVIER, R.T. Binding of human virus oncoproteins to hDlg/SAP97, a mammalian homolog of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 94, p. 6670–6675, 1997.

LEE, S.S. et al. Multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cellular target for both adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus type 18 E6 oncoproteins. **J. Virol.**, v. 74, p. 9680–9693, 2000.

LEE, C.; LAIMINS, L.A. Role of the PDZ domain-binding motif of the oncoprotein E6 in the pathogenesis of human papillomavirus type 31. **Journal of Virology**, v.78, n.22, p.12366–12377, 2004.

LEHOUX, M.; FRADET-TURCOTTE, A.; LUSSIER-PRICE, M.; OMICHINSK, J.G.; ARCHAMBAULT, J. Inhibition of human papillomavirus DNA replication by an E1-derived p80/UAF1-binding peptide. **Journal of Virology**, 2012.

MALET, H. et al. Newly folded substrates inside the molecular cage of the HtrA chaperone DegQ. **Nat Struct Mol Biol.**, v. 19, n. 2, p. 152- 157, 2012.

MELTZER, M., et al. Structure, function and regulation of the conserved serine proteases DegP and DegS of Escherichia coli. **Res. Microbiol.**, v. 160, p. 660-666, 2009.

MILNER, J.M.; PATEL, A.; ROWAN, A.D. Emerging roles of serine proteinases in tissue turnover in arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 58, n. 12, p. 3644-56, 2008.

MULLANY et al. Expression and Functional Significance of HtrA1 Loss in Endometrial Cancer. Clin Cancer Res., v. 17, n. 3, p. 427–436, 2011.

MURWANTOKO, Y.M.; UETA, Y.; MURASAKI, A.; KANDA, H.; OKA, C.; KAWAICHI, M. Binding of proteins to the PDZ domain regulates proteolytic activity of HtrA1 serine protease. Biochem. J., v. 381, n. 3, p. 895-904, 2004.

NAGASAKA, K.; KAWANA, K.; OSUGA, Y.; FUJII, T. PDZ Domains and Viral Infection: Versatile Potentials of HPV-PDZ Interactions in relation to Malignancy. **BioMed Research International**, p.1-9, 2013.

NICOLAIDES, L.; DAVY, C.; RAJ, K.; KRANJEC, C.; BANKS, L.; DOORBAR, J. Stabilization of HPV16 E6 protein by PDZ proteins, and potential implications for genome maintenance. **Virology**, v. 414, p. 137–145, 2011.

NGUYEN, M.L.; NGUYEN, M.M.; LEE, D.; GRIEP, A.E.; LAMBERT, P.F. The PDZ ligand domain of the human papillomavirus type 16 E6 protein is required for E6's induction of epithelial hyperplasia in vivo. **Journal of Virology**, v.77, n.12, p.6957–6964, 2003.

OKA, C. et al. *HtrA1* serine protease inhibits signaling mediated by Tgf beta family proteins. **Development**, v. 131, n. 5, p. 1041–1053, 2004.

PAGE, M. J.; DI CERA, E. Evolution of peptidase diversity. **J. Biol. Chem.**, v. 283, p. 30010–30014, 2008.

PALEFSKY, J.M.; HOLLY, E.A. Molecular virology and epidemiology of human papillomavirus and cervical cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 4, p. 415-28, 1995.

PARROCHE, P. et al. Human papillomavirus type 16 E6 inhibits p21^{WAF1} transcription independently of p53 by inactivating p150^{Sal2}. **Virology**, v. 417, p. 443–448, 2011.

PFÄFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res.** v. 29, p. 2003 – 2007, 2001.

POLUR, I.; LEE, P.L.; SERVAIS, J.M.; XU, L.; LI, Y. Role of *HTRA1*, a serine protease, in the progression of articular cartilage degeneration. **Histol Histopathol.**, v. 25, n. 5, p. 599-608, 2010.

PYEON, D.; PEARCE, S.M.; LANK, S.M.; AHLQUIST, P.; LAMBERT, P.F. Establishment of Human Papillomavirus Infection Requires Cell Cycle Progression. **Plos Pathogens**, v. 5, n.2, 2009.

RAUTAVA, J.; SYRJÄNEN, S. Human papillomavirus infections in the oral mucosa. **J Am Dent Assoc**, v. 142, p. 905-914, 2011.

SCHEFFNER, M.; HUIBREGTSE, J.M.; VIERSTRA, R.D.; HOWLEY, P.M. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin–protein ligase in the ubiquitination of p53. **Cell**, v. 75, p. 495–505, 1993.

SCHLEGEL, R.; PHELPS, W. C.; ZHANG, Y. L.; BARBOSA, M. S. Quantitative keratinocyte assay detects two biological activities on human papillomavirus DNA and identifies viral types associated with cervical carcinomas. **EMBO J.**, v. 7, p. 3181-3187, 1988.

SCHMITZ, M.; DRIESCH, C.; BEER-GRONDKE, K.; JANSEN, L.; RUNNEBAUM, I.B.; DURST, M. Loss of gene function as a consequence of human papillomavirus DNA integration. **Int J Cancer**, 2012.

SPANOS, W. C. et al. Deletion of the PDZ motif of HPV16 E6 preventing immortalization and anchorage-independent growth in human tonsil epithelial cells. **Head Neck**, v. 30, p. 139–147, 2008a.

SPANOS, W. C. et al. The PDZ binding motif of human papillomavirus type 16 E6 induces PTPN13 loss, which allows anchorage-independent growth and synergizes with Ras for invasive growth. **J Virol.**, v. 82, n. 5, p. 2493-500, 2008b.

SUZUKI, Y.; TAKAHASHI-NIKI, K.; AKAGI, T.; HASHIKAWA, T.; TAKAHASHI, R. Mitochondrial protease Omi/HtrA2 enhances caspase activation through multiple pathways. **Cell Death Differ.**, v. 11, p. 208–216, 2004.

SYRJÄNEN K.; SYRJÄNEN, S. Papillomavirus Infections in Human Pathology. New York City: Wiley; 2000.

TANG, W. K. Oncogenic Human Papillomavirus Infection: Epidemiology in Local High-Risk Women. **Hong Kong Dermatology & Venereology Bulletin**, v. 10, n. 4, 2002.

TERMINI, L. et al. Characterization of global transcription profile of normal and HPV-immortalized keratinocytes and their response to TNF treatment. **BMC Medical Genomics**, v. 1, p. 29, 2008.

TRUEBESTEIN, L. Substrate-induced remodeling of the active site regulates human *HTRA1* activity. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, v. 18, p. 386–388, 2011.

TSUCHIYA, A. et al. Expression of mouse *Htra1* serine protease in normal bone and cartilage and its upregulation in joint cartilage damaged by experimental arthritis. **Bone**, v. 37, n. 3, p. 323–336, 2005.

TURUNEN, M. et al. No association between high temperature requirement 1 (*HTRA1*) gene polymorphisms and Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**, v. 32, n. 3, p. 547.e – 547.e-9., 2011.

TYRING, S.K. Human papillomavirus infections: epidemiology, pathogenesis, and host immune response. **J Am Acad Dermatol**, v. 43, p. 518-526, 2000.

VANDERMARK, E. R. et al. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins alter NF-κB in cultured cervical epithelial cells and inhibition of NF-κB promotes cell growth and immortalization. **Virology**, v. 425, p. 53–60, 2012.

VELDMAN, T.; HORIKAWA, I.; BARRETT, J. C.; SCHLEGEL, R. Transcriptional Activation of the Telomerase hTERT Gene by Human Papillomavirus Type 16 E6 Oncoprotein. **Journal of Virology**, v. 75, n. 9, p. 4467-4472, 2001.

VILLA, L.L. Vaccines against papillomavirus infections and disease. **Salud Publica Mex**, v. 45, p. 443–448, 2003.

XIA, J.; WANG, F.; WANG, L.; FAN, Q. Elevated serine protease HtrA1 inhibits cell proliferation, reduces invasion, and induces apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma by blocking the nuclear factor-κB signaling pathway. **Tumour Biol.**, v. 34, n. 1, p. 317-328, 2013.

ZIEGERT, C. et al. A comprehensive analysis of HPV integration loci in anogenital lesions combining transcript and genome-based amplification techniques. **Oncogene**, v. 22, n. 25, p. 3977–3984, 2003.

ZUMBRUNN, J.; TRUEB, B. Primary structure of a putative serine protease specific for IGF-binding proteins. **FEBS Lett.**, v. 398, n 2-3, p. 187–192, 1996.

ZURAWA-JANICKA, D.; SKORKO-GLONEK, J.; LIPINSKA, B. HtrA proteins as targets in therapy of cancer and other diseases. **Expert Opin. Ther. Targets.**, v. 14, n. 7, p. 665-679, 2010.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses in the causation of human cancers – a brief historical account. **Virology**, v. 384, p. 260–265, 2009.

WANG, H.K.; DUFFY, A.A.; BROKER, T.R.; et al. Robust production and passaging of infectious HPV in squamous epithelium of primary human keratinocytes. **Genes Dev**, v. 23, p. 181 – 194, 2009.