

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)**

**Tatiana Rabachini**

**EFEITO DA RAPAMICINA EM CULTURAS  
ORGANOTÍPICAS DE QUERATINÓCITOS QUE  
EXPRESSAM ONCOPROTEÍNAS DE  
PAPILOMAVÍRUS HUMANO TIPO 16**

Tese de Doutorado

**São Paulo**  
**30/10/2007**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Tatiana Rabachini**

**EFEITO DA RAPAMICINA EM CULTURAS  
ORGANOTÍPICAS DE QUERATINÓCITOS QUE  
EXPRESSAM ONCOPROTEÍNAS DE  
PAPILOMAVÍRUS HUMANO TIPO 16**

**Tese apresentada ao Instituto de Química da  
Universidade de São Paulo para obtenção do  
Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)**

**Orientadora: Dra. Luisa Lina Villa**

**São Paulo  
2007**

## **DEDICATÓRIAS**

*Aos meus pais,  
Terezinha e Luiz,  
por me ensinarem que quem tem AMOR, tem TUDO !*

*...e ao meu querido Rogério,  
A MAIOR PROVA DISSO...*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por tudo !

Aos meus pais, Terezinha e Luiz, por terem me ensinado a nunca desistir. Sempre me emociono ao ouvir as histórias do dia em que nasci. Obrigada por não terem desistido de tentar mais uma vez. Mãezinha, com você aprendi o valor das palavras, do carinho e da dedicação aos filhos. Paizinho, com você aprendi o valor do trabalho, da coragem e do amor incondicional à família. Dizer obrigada é pouco perto da felicidade que sinto de ter pais maravilhosos como vocês.

Ao meu querido Rogério, por ser mais do que meu marido. Sua amizade, seu respeito, sua paciência e apoio me fazem ter certeza de que o amor é apenas um detalhe na nossa união. Como posso te agradecer por tudo de bom que temos. Nossos pequenos, nossa casinha, nossa vida...o que eu poderia querer mais ? Ter você ao meu lado é a minha maior riqueza.

À minha orientadora Dra. Luisa Lina Villa, por quem eu cultivo uma extensa admiração. Querida Dra. Luisa, em todos esses anos de convivência aprendi que existem várias formas de admirá-la. Seu árduo profissionalismo a transforma num exemplo para todos àqueles que tem a ciência como paixão. Sua alegria contagiante e generosidade a transformam num ser humano maravilhoso, que todos querem manter no coração. Obrigada pela oportunidade e por coisas que jamais esquecerei.

Aos meus irmãos Wagner, Tarcísio, Régis e Tais. Obrigada por torcerem, me ajudarem, me agüentarem e mais ainda, por me amarem. Também amo muito vocês... Ao meu cunhado Giovani e cunhadas Eliane, Luciana e Juliana, obrigada por fazerem meus irmãos mais felizes. Às minhas sobrinhas Bruna, Tamíris e Gabi, vocês serão sempre minhas macaquinhas queridas...

À minha nova família: Dona Iraci, Sr. Lázaro, Flávio, Heloíse, Heliane, Arthur, Luciane, Matheus e Heitor. Vocês fazem eu me sentir em casa. Muito obrigada por tudo.

Ao Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, na pessoa da Dra. Luisa Lina Villa, sua atual diretora, pela oportunidade de dispor do apoio desta instituição para realização desse trabalho.

À Dra. Denise Galloway, do Fred Hutchinson Cancer Research Center em Seattle, Estados Unidos, por gentilmente ceder os vetores retrovirais utilizados nesse trabalho.

À Sueli Nonogaki, a quem eu devo mais do que um simples obrigado. Su, tenho certeza de que se não fosse sua primorosa ajuda eu não teria conseguido. Você foi essencial para a conclusão dessa tese.

A minha grande “família” virologia, por serem mais do que grandes amigos. Cada um de vocês tem um significado especial na minha vida e tenho certeza de que as lembranças desses maravilhosos anos de convivência irão permanecer no meu coração e na minha memória pra sempre. Agradeço à Aline por ter me ensinado que os Rottweilers podem ser bonzinhos; à Ana “Lepique”, com quem eu aprendi que é possível ser boa cientista e boa mãe; à Andrea por ter arrumado a solução pros nossos problemas, ali pertinho, na Vila Mariana; à Antonieta, por me ensinar muitas receitas gostosas; à Carina, por sempre conhecer alguém que tem, ou que consegue, ou que vai ajudar; ao Enrique, que me agüentou todo esse tempo e sem perceber, eu acho, me ensinou muito mais do que ciência, me ensinou o verdadeiro valor da amizade; ao Joãozinho, que sempre traz algo que eu adoooro; à Lara, por ter me ensinado que maluquice é absolutamente normal; à Laura, que me ensinou tanta coisa, tanta coisa, tanta coisa, que nem seu cômico exagero poderia imaginar; à Laura Cardeal, pelo bolo de chocolate 10M; à Maria Cecília, por ser tão agradável, à Neide, por sempre ter notícias da Gabriella; à Zanith, por compartilhar a fé nas runas; e ao Zé, pela fortuna que certamente um dia teremos. Àqueles que convivem pouco

com a gente mas não deixam de fazer parte da grande família: Isa, Lenice e Raquel. Também gostaria de agradecer todos àqueles que fizeram parte da virologia e, da minha vida, de maneira muito especial. Meu muito obrigada à Carol, ao Paulinho, à Paty Thomann, à Katy, ao Rodrigo e especialmente à Paty Sávio, grande amiga e comadre.

À querida Stella, por fazer tão bem aquilo que a gente faz tão mau. Você faz tudo parecer mais simples. Obrigada !

Ao Carlinhos e ao Severino, por cortar os nossos rafts com tanta boa vontade.

Ao Dr. Roger Chammas, por nos ajudar na padronização das imunohistoquímicas ao nos ceder um pouco de seu kit Superpicture.

Ao Dr. Fernando Soares, pelo empréstimo do anticorpo anti-Rb.

À Evania, que torna a nossa vida na cultura mais fácil.

Ao pessoal do BCM, especialmente à Marilene e a Gláucia, que me ajudaram tanto, intelectualmente ou apenas torcendo...muito obrigada meninas.

À toda a família “Ludwigiana” pela convivência harmoniosa e super prestativa.

À todos os funcionários da secretaria de pós-graduação do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, pela super eficiência e boa vontade.

À pró-reitoria de pós-graduação da Universidade de São Paulo, pelo apoio financeiro para participação de congressos.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

*"O importante não é vencer todos os dias, mas lutar sempre."  
Santo Agostinho*



## RESUMO

Rabachini, T. **Efeito da rapamicina em culturas organotípicas de queratinócitos que expressam oncoproteínas de Papilomavírus humano tipo 16.** 2007. 148p. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A infecção por HPV de alto risco é considerada um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento do carcinoma do colo uterino, um das neoplasias mais frequentes em mulheres de todo o mundo. As oncoproteínas E6 e E7 de HPV-16 são capazes de induzir a degradação dos genes supressores de tumor p53 e pRb, respectivamente. Mais do que isso, a expressão dessas oncoproteínas está relacionada a alterações na via de PI3K/AKT/mTOR. A proteína quinase mTOR apresenta importante papel no controle da tradução de proteínas e é considerada o principal mediador entre crescimento celular e proliferação. A ativação de mTOR é correlacionada à fosforilação das proteínas eIF4G1 e 4EBP1, aumentando assim a taxa de síntese de proteínas. A Rapamicina é um inibidor específico de mTOR e seus análogos apresentam potente atividade antiproliferativa em um grande número de células tumorais e tumores gerados em animais. Uma vez que as proteínas E6 e E7 são capazes de interagir com diversas proteínas da via que controla a atividade de mTOR optamos por investigar o efeito da rapamicina na proliferação de culturas organotípicas de queratinócitos expressando esses genes. Também avaliamos o efeito dos genes E6 e E7 na atividade de mTOR após o tratamento com essa droga. Para geração de culturas organotípicas de queratinócitos infectamos essas células com vetores retrovirais recombinantes contendo os genes E6 e E7 de HPV-16 em conjunto ou separadamente. Nós também avaliamos o papel da degradação de p53 e pRb na resposta à rapamicina através da utilização de mutantes de E6 e E7 incapazes de induzir a degradação dessas proteínas celulares. Após a infecção dos queratinócitos, os mesmos foram semeados em uma matriz de colágeno. Após 6 dias as culturas foram tratadas com 100ng/ml de rapamicina e permaneceram 60h em contato com a droga. Para análise por imunohistoquímica os tecidos foram fixados em formalina tamponada e emblocados em parafina. A reação de imunohistoquímica foi realizada utilizando os anticorpos contra BrdU, p-4EBP1 (ser 65), p-eIF4G1 (ser 1188) e pAKT (ser 473). Os resultados obtidos ilustram que a rapamicina apresenta efeito antiproliferativo em culturas de queratinócitos contendo o vetor vazio. Por outro lado, culturas contendo o gene E7 são resistentes ao efeito antiproliferativo dessa droga. Essa resistência parece estar relacionada à capacidade de E7 induzir a degradação da proteína pRb, uma vez que em queratinócitos expressando o mutante de E7, incapaz de induzir a degradação dessa proteína, não foi observada resistência. Além disso, a fosforilação de eIF4G e 4EBP1 indica que a expressão de E7 impede que a rapamicina seja capaz de inibir a atividade de mTOR. Esses resultados mostram, pela primeira vez, que o efeito antiproliferativo da rapamicina pode ser superado pela expressão de uma proteína viral, no caso a proteína E7 de HPV-16.

Palavras -chave: HPV, Rapamicina, mTOR, Cultura Organotípica, Oncogenes, Tradução.

## ABSTRACT

Rabachini, T. **Effect of rapamycin in organotypic cultures of keratinocytes expressing oncoproteins of Papillomavirus type 16.** 2007. 148p. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

High-risk HPV infection has a major etiologic role in development and progression of cervical cancer, one of the most frequent forms of cancer among women worldwide. HPV-16 E6 and E7 oncoproteins are able to induce degradation of p53 and pRb tumor suppressor proteins respectively. Moreover, the expression of these oncoproteins is related to alterations in the PI3K/AKT/mTOR pathway. The cellular kinase mammalian target of Rapamycin (mTOR) is an important regulator of the cellular protein synthesis machinery and has emerged as a principal mediator of cell growth and proliferation. mTOR activation has been shown to stimulate eIF4G1 and 4EBP1 phosphorylation, thus increasing the rate of protein synthesis. Rapamycin is a specific inhibitor of mTOR signaling pathway and its analogues have demonstrated impressive activity against a broad range of human cancer derived cell lines in culture and in human tumor xenograft models. Since E6 and E7 target several proteins controlling the mTOR pathway we aimed to investigate the effect of Rapamycin in the proliferation of organotypic raft cultures expressing these genes. We also evaluated the effect of E6 and E7 genes in mTOR activity after rapamycin treatment.

To generate organotypic culture of keratinocytes we infect these cells with recombinant retroviruses containing HPV-16 E6 and E7 together or separately. We also analyzed the role of p53 and pRb degradation in rapamycin responsiveness by using E6 and E7 mutants lacking the ability to inactivate these cellular proteins. After infection, keratinocytes were seeded on to a collagen matrix. After 6 days, these cultures were treated with 100ng/ml of Rapamycin for 60 hours. BrdU was added in the last 12 hours to evaluate proliferation. For immunohistochemistry analysis tissues were fixed in buffered formalin and embedded in paraffin. Immunohistochemistry reactions against BrdU, p-4EBP1 (ser 65), p-eIF4G1 (ser 1188) and p-AKT (ser 473) were performed

The results show that proliferation of organotypic cultures of keratinocytes transduced with empty vector is inhibited by Rapamycin. On the other hand, cultures generated with keratinocytes transduced with E7 gene were completely resistance to the antiproliferative effect of Rapamycin. Moreover, we found that this antiproliferative effect was dependent of Rb degradation since the cells transduced with E7 mutant unable to induce Rb degradation were sensitive. In addition, eIF4G and 4EBP1 phosphorylation indicates that E7 expression impairs mTOR inhibition by rapamycin. AKT phosphorylation indicates that rapamycin resistance could be dependent of Rb inactivation induced by E7 expression.

These results show for the first time that the Rapamycin antiproliferative effect is bypassed by the expression of a viral oncogene, in this case the HPV-16 E7. Moreover, E7 expression impairs rapamycin to inactivate mTOR.

**Keywords:** HPV, Rapamycin, mTOR, Organotypic Cultures, Oncogenes, Translation.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática do capsídeo e do genoma viral do HPV-16. **A** - partícula icosaédrica não envelopada de simetria pentagonal composta de 72 capsômeros (<http://microbiologybytes.wordpress.com/2006/10/23/>). **B** – Representação esquemática do genoma do HPV 16, evidenciando genes da região precoce (E), genes da região tardia (L) e a LCR, correspondente a região regulatória. As setas vermelhas correspondem aos promotores responsáveis pela regulação da transcrição dos genes da região E e L (modificado de Villa, 1997).....19
- Figura 2.** O ciclo de vida do papilomavírus humano. Para que a infecção seja produtiva, o vírus precisa infectar células da camada basal do epitélio. Isso normalmente ocorre através de microlesões, na pele ou na mucosa. As células infectadas dividem e se espalham lateralmente. Algumas dessas células progenitoras migram para as camadas diferenciadas suprabasais, onde genes virais serão ativados, o DNA do vírus será replicado e as proteínas do capsômero serão formadas. As partículas virais surgem e são liberadas na superfície da mucosa onde podem infectar outras células (modificado de zur Hausen, 2002).....21
- Figura 3.** Proteínas celulares que apresentam sua atividade modificada pela expressão das oncoproteínas E6 e E7.....31
- Figura 4.** Complexo formado pela ligação da rapamicina à FKBP-12 e mTOR. Uma vez formado, este complexo impede que a proteína mTOR exerça sua atividade (modificado de <http://www.ch.ic.ac.uk/local/projects/russell/binding.html>).....40
- Figura 5.** Representação esquemática do controle de ativação da proteína mTOR (modificado de Corradetti & Guan, 2006).....43
- Figura 6.** Montagem do complexo de início da tradução na extremidade 5' do RNAm. (A) eIF4E, componente do complexo eIF4F, liga-se ao cap do transcrito. eIF4G liga-se à eIF3 que é capaz de recrutar a subunidade ribossomal 40S juntamente com o complexo ternário (eIF2, Met-tRNA, GTP) e dar início da tradução. (B) A proteína 4EBP liga-se a eIF4E e previne sua interação com eIF4G. Essa ligação impede que o complexo eIF4F seja formado e dê início a tradução do RNAm. A proteína mTOR é capaz de controlar a tradução por induzir a fosforilação de 4EBP e promover seu desligamento de eIF4E e por induzir a fosforilação de eIF4G (modificado de HAY & SONENBERG, 2004).....46
- Figura 7.** Esquema que representa a montagem das culturas organotípicas. Os queratinócitos são semeados sobre o equivalente dérmico. No dia seguinte a cultura foi transferida para grade de aço, onde permaneceu por 9 dias em interface meio-ar. Durante este período ocorre a diferenciação dos queratinócitos de maneira semelhante ao que é observado em um epitélio estratificado escamoso.....61

**Figura 8.** Imagem de um corte transversal de uma cultura organotípica de QPH normais após a coloração com hematoxilina-eosina evidenciando as diferentes camadas do epitélio.....66

**Figura 9.** Imagem de cortes transversais de culturas organotípicas de QPH normais e QPH infectado com partículas retrovirais contendo o vetor vazio pLXSN tratados com DMSO ou rapamicina. Coloração: hematoxilina-eosina.....66

**Figura 10.** Imagem de cortes transversais de culturas organotípicas de QPH contendo o vetor vazio pLXSN ou expressando as oncoproteínas de HPV-16 tratados com DMSO ou Rapamicina. Coloração: hematoxilina-eosina. As setas indicam células em mitose. Aumento de 400X.....68

**Figura 11.** Imagem de cortes transversais de culturas organotípicas de QPH contendo o vetor vazio pLXSN ou expressando a oncoproteína E6 de HPV-16 e sua forma mutada E6 $\Delta$ 9-13 (incapaz de induzir a degradação de p53) tratados com DMSO ou Rapamicina. Coloração: hematoxilina-eosina. Aumento de 400X.....70

**Figura 12.** Imagem de cortes transversais de culturas organotípicas de QPH contendo o vetor vazio pLXSN ou expressando a oncoproteína E7 de HPV-16 e suas formas mutadas E7E26G (incapaz de induzir a degradação de pRb) e CVQ68-70AAA (capaz de induzir a degradação de pRb e incapaz de induzir proliferação em resposta a sinais de parada do ciclo celular, tratados com DMSO ou Rapamicina. Coloração: hematoxilina-eosina. Aumento de 400X.....71

**Figura 13.** Imagem de cortes transversais de culturas organotípicas de QPH contendo o vetor vazio pLXSN ou expressando as oncoproteínas de HPV-16 tratados com DMSO ou rapamicina. A marcação nuclear observada corresponde à proteína p53 detectada por Imunohistoquímica. Aumento de 400X.....74

**Figura 14.** Imagem de cortes transversais de culturas organotípicas de QPH contendo o vetor vazio pLXSN ou expressando a oncoproteína E6 de HPV-16 e sua forma mutada E6 $\Delta$ 9-13 (incapaz de induzir a degradação de p53) tratados com DMSO ou rapamicina. A marcação nuclear observada corresponde à proteína p53 detectada por Imunohistoquímica. Aumento de 400X.....76

**Figura 15.** Imagem de cortes transversais de culturas organotípicas de QPH contendo o vetor vazio pLXSN ou expressando a oncoproteína E7 de HPV-16 e suas formas mutadas E7E26G (incapaz de induzir a degradação de pRb) e CVQ68-70AAA (capaz de induzir a degradação de pRb e incapaz de induzir proliferação em resposta a sinais de parada do ciclo celular). A marcação nuclear observada corresponde à proteína p53 detectada por Imunohistoquímica. Aumento de 400X.....78

**Figura 16.** Imagem de cortes transversais de culturas organotípicas de QPH contendo o vetor vazio pLXSN ou expressando as oncoproteínas de HPV-16 tratados com DMSO ou rapamicina. A marcação nuclear observada corresponde à proteína pRb detectada por Imunohistoquímica. Aumento de 400X.....80

**Figura 17.** Imagem de cortes transversais de culturas organotípicas de QPH contendo o vetor vazio pLXSN ou expressando a oncoproteína E7 de HPV-16 e suas formas mutadas E7E26G (incapaz de induzir a degradação de pRb) e CVQ68-70AAA (capaz de induzir a degradação de pRb e incapaz de induzir proliferação em resposta a sinais de parada do ciclo celular). A marcação nuclear observada corresponde à proteína pRb detectada por Imunohistoquímica. Aumento de 400X.....83

**Figura 18.** Imagem de cortes transversais de culturas organotípicas de QPH contendo o vetor vazio pLXSN ou expressando as oncoproteínas de HPV-16 tratados com DMSO ou rapamicina. As setas indicam células que incorporaram BrdU, detectadas por Imunohistoquímica. Aumento de 400X.....85

**Figura 19.** Quantificação da proliferação de culturas organotípicas de QPH infectados com os vetores retrovirais pLXSN contendo ou não as oncoproteínas de HPV-16 (E6, E7 e E6E7), bem com suas formas mutadas E6Δ9-13 (incapaz de induzir a degradação de p53), E7E26G (incapaz de induzir a degradação de pRb) e E7CVQ68-70AAA (incapaz de induzir proliferação em resposta à sinais de parada do ciclo celular).....86

**Figura 20.** Imagem de cortes transversais de culturas organotípicas de queratinócitos normais e infectados com os vetores que expressam E6 e sua forma mutada (E6Δ9-13) tratados com DMSO ou rapamicina. As setas indicam células que incorporaram BrdU, detectadas por Imunohistoquímica. Aumento de 400X.....89

**Figura 21.** Imagem de cortes transversais de culturas organotípicas de QPH contendo o vetor vazio pLXSN ou expressando a oncoproteína E7 de HPV-16 e suas formas mutadas E7E26G (incapaz de induzir a degradação de pRb) e CVQ68-70AAA (capaz de induzir a degradação de pRb e incapaz de induzir proliferação em resposta a sinais de parada do ciclo celular). As setas indicam células que incorporaram BrdU, detectadas por Imunohistoquímica. Aumento de 400X.....21

**Figura 22.** Avaliação de proliferação através de incorporação de timidina tritiada em QPH infectados com os vetores retrovirais pLXSN contendo ou não as oncoproteínas de HPV-16 (E6, E7 e E6E7), bem com suas formas mutadas E6Δ9-13 (incapaz de induzir a degradação de p53), E7E26G (incapaz de induzir a degradação de pRb) e E7CVQ68-70AAA (incapaz de induzir proliferação em resposta à sinais de parada do ciclo celular).....94

**Figura 23.** Imagem de cortes transversais de culturas organotípicas de QPH contendo o vetor vazio pLXSN ou expressando as oncoproteínas de HPV-16 tratados com DMSO ou rapamicina. As setas indicam células com marcação positiva para a proteína 4EBP1 fosforilada (ser 65), detectadas por Imunohistoquímica. A figura A apresenta em detalhe uma célula com marcação para a proteína 4EBP1 fosforilada identificada por imunofluorescência. Contracoloração: Dapi. Aumento de 400X.....96

**Figura 24.** Imagem de cortes transversais de culturas organotípicas de QPH contendo o vetor vazio pLXSN ou expressando a oncoproteína E7 de HPV-16 e suas formas mutadas E7E26G (incapaz de induzir a degradação de pRb) e CVQ68-70AAA (capaz de induzir a degradação de pRb e incapaz de induzir proliferação em resposta a sinais de parada do ciclo celular, tratados com DMSO ou Rapamicina. As setas indicam células com marcação positiva para a proteína 4EBP1 fosforilada (ser 65), detectadas por Imunohistoquímica. Aumento de 400X.....98

**Figura 25.** Imagem de cortes transversais de culturas organotípicas de QPH contendo o vetor vazio pLXSN ou expressando as oncoproteínas de HPV-16 tratados com DMSO ou rapamicina. A marcação citoplasmática representa células onde a proteína eIF4G1 (ser1188) foi detectada por imunohistoquímica. Aumento de 400X.....99

**Figura 26.** Imagem de cortes transversais de culturas organotípicas de QPH contendo o vetor vazio pLXSN ou expressando a oncoproteína E7 de HPV-16 e suas formas mutadas E7E26G (incapaz de induzir a degradação de pRb) e CVQ68-70AAA (capaz de induzir a degradação de pRb e incapaz de induzir proliferação em resposta a sinais de parada do ciclo celular, tratados com DMSO ou Rapamicina. A marcação citoplasmática representa células onde a proteína eIF4G1 (ser1188) foi detectada por imunohistoquímica. Aumento de 400X.....101

**Figura 27.** Imagem de cortes transversais de culturas organotípicas de QPH contendo o vetor vazio pLXSN ou expressando a oncoproteína E6 de HPV-16 tratados com DMSO ou rapamicina. A marcação observada representa células onde a proteína AKT total ou AKT (ser473) foi detectada por imunohistoquímica. Aumento de 400X.....103

**Figura 28.** Imagem de cortes transversais de culturas organotípicas de QPH expressando a oncoproteína E7 de HPV-16 sozinha ou em conjunto com a oncoproteína E6, tratados com DMSO ou Rapamicina. A marcação observada representa células onde a proteína AKT total ou AKT (ser473) foi detectada por imunohistoquímica. Aumento de 400X.....105

**Figura 29.** Imagem de cortes transversais de culturas organotípicas de QPH expressando as formas mutadas de E7: E7E26G (incapaz de induzir a degradação de pRb) e CVQ68-70AAA (capaz de induzir a degradação de pRb e incapaz de induzir proliferação em resposta a sinais de parada do ciclo celular, tratados com DMSO ou Rapamicina. A marcação observada representa células onde a proteína AKT total ou AKT (ser473) foi detectada por imunohistoquímica. Aumento de 400X.....106

**Figura 30.** Imagem de cortes transversais de culturas organotípicas de QPH contendo o vetor vazio pLXSN ou expressando as oncoproteínas de HPV-16 tratados com DMSO ou rapamicina. A marcação observada representa células onde a proteína 4EBP1 total foi detectada por imunohistoquímica. Aumento de 400X.....108

**Figura 31.** Imagem de cortes transversais de culturas organotípicas de QPH contendo o vetor vazio pLXSN ou expressando as oncoproteínas de HPV-16 tratados com DMSO ou rapamicina. A marcação observada representa células onde a proteína eIF4E total foi detectada por imunohistoquímica. Aumento de 400X.....110

**Figura 32.** Imagem de cortes transversais de culturas organotípicas de QPH contendo o vetor vazio pLXSN ou expressando as oncoproteínas de HPV-16 tratados com DMSO ou rapamicina. A marcação observada representa células onde a proteína eIF4G1 total foi detectada por imunohistoquímica. Aumento de 400X.....112

**Figura 33.** Imagem de cortes transversais de culturas organotípicas de QPH contendo o vetor vazio pLXSN ou expressando as oncoproteínas de HPV-16 tratados com DMSO ou rapamicina. As setas indicam células com marcação positiva para a forma ativada da proteína caspase-3, detectadas por Imunohistoquímica. Aumento de 400X.....115

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1.** Descrição dos vetores retrovirais utilizados para infecção de QPH.....52

**Tabela 2.** Lista de Anticorpos utilizados nas reações de imunohistoquímica.....63



# SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
 1. O PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) .....	 16
1.1. Biologia .....	18
1.2. Proteínas .....	22
1.3. Potencial Oncogênico .....	32
 2. A RAPAMICINA .....	 34
2.1. Descoberta e características.....	34
2.2. Atividade anti-tumoral.....	35
2.3. Mecanismo de ação.....	39
 3. AS ONCOPROTEÍNAS E6 E E7 E A VIA DE mTOR .....	 48
 4. CULTURAS ORGANOTÍPICAS DE QUERATINÓCITOS PRIMÁRIOS HUMANOS .....	 50
 <b>OBJETIVOS .....</b>	 <b>51</b>
 <b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	 <b>52</b>
 1. VETORES RETROVIRAIS .....	 52
2. CLONAGEM EM LARGA ESCALA E EXTRAÇÃO DO DNA PLAMIDIAL ..	53
3. PURIFICAÇÃO POR GRADIENTE DE CLORETO DE CÉSIO .....	55
4. GERAÇÃO DE PARTÍCULAS RETROVIRAIS.....	56
5. TITULAÇÃO DAS PARTÍCULAS RETROVIRAIS.....	57
6. INFECÇÃO DE QUERATINÓCITOS PRIMÁRIOS HUMANOS.....	58
7. CULTURAS ORGANOTÍPICAS.....	59
7.1. Geração.....	59
7.2. Tratamentos .....	60
7.3. Processamento.....	62

7.4. Imunohistoquímica.....	62
8. CULTURAS EM MONOCAMADA.....	64
8.1. Incorporação de Timidina Triteriada.....	64
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>65</b>
1. A Rapamicina não promove alterações na organização geral do epitélio de culturas organotípicas de queratinócitos normais e que expressam as oncoproteínas de HPV-16.....	65
2. A Rapamicina não impede que a proteína E6 de HPV-16 induza a degradação de p53 e promove alterações no padrão de distribuição dessa proteína em culturas organotípicas de queratinócitos que expressam o oncogene E7.....	73
3. A rapamicina não promove alterações nos níveis da proteína pRb em culturas organotípicas de queratinócitos normais e que expressam a oncoproteínas E6 de HPV-16 e não impede que E7 seja capaz de degradar a proteína pRb.....	79
4. A expressão da oncoproteína E7 de HPV-16 confere resistência ao efeito antiproliferativo da Rapamicina em culturas organotípicas de queratinócitos e em monocamada.....	84
5. A expressão da oncoproteína E7 de HPV-16 impede que a proteína mTOR tenha sua atividade inibida por ação da Rapamicina.....	95
6. A oncoproteína E7 pode conferir resistência ao efeito antiproliferativo da rapamicina por interferir na fosforilação da proteína AKT.....	102
7. A expressão das oncoproteínas de HPV-16 não altera os níveis totais das proteínas 4EBP1, eIF4E e eIF4G1 e em culturas organotípicas de queratinócitos.....	107

8. A Rapamicina não é capaz de induzir apoptose em queratinócitos de culturas organotípicas que expressam oncogenes de HPV-16. ....	113
---	-----

<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>116</b>
-----------------------	------------

<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>130</b>
-----------------------	------------

<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>131</b>
---	------------

## INTRODUÇÃO

### 1. O PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

A família dos papilomavírus compreende um grupo heterogêneo de vírus que apresentam tropismo por células dos epitélios escamosos e glandulares. As patologias geralmente associadas à infecção por estes vírus incluem lesões de pele ou de mucosa. De acordo com o sítio preferencial de infecção, os diferentes tipos de HPV podem ser classificados em genitais, não genitais e associados à epidermodisplasia verruciforme. A infecção por tipos genitais está associada ao aparecimento de lesões benignas e malignas na região ano-genital. Os tipos não genitais estão associados ao aparecimento de verrugas comuns e verrugas plantares. Os tipos relacionados à epidermodisplasia verruciforme estão associados apenas à lesões verrucosas características desta doença autossômica de caráter recessivo (VILLA, 1997).

A infecção por tipos genitais de HPV é considerada a doença sexualmente transmissível mais comumente diagnosticada (TROTIER & FRANCO, 2006). Até o momento mais de 120 tipos diferentes de papilomavírus humano foram descritos. Destes aproximadamente 40 infectam especificamente o trato anogenital (de VILLIERS, 2004). Estimativas recentes apontam que o DNA viral pode ser detectado na cérvix uterina de mais de 290 milhões de mulheres em todo o mundo (de SANJOSÉ *et al.*, 2007).

Apesar da alta prevalência, a maior parte das infecções não leva ao desenvolvimento de sintomas e ao aparecimento de lesões visíveis. De fato, a maioria das infecções é eliminada em um curto período de tempo pelo sistema imune (IARC WORKING GROUP, 1995). Contudo, em um pequeno número de mulheres as infecções pelo vírus não são eliminadas, podendo permanecer por anos. A infecção persistente por determinados tipos de HPV é

considerada o principal fator de risco para o desenvolvimento de lesões precursoras do carcinoma do colo uterino (SCHLECHT *et al.*, 2001).

Os tipos de HPV que infectam o trato anogenital podem ser classificados segundo o risco de estarem associados ao desenvolvimento de lesões neoplásicas (LOWY *et al.*, 1994): Esta classificação os agrupa em:

- 1) *Tipos de baixo risco oncogênico* – (HPV 6, 11, 42, 43 e 44 entre outros) associados às lesões benignas do colo uterino e às verrugas genitais
- 2) *Tipos de alto risco oncogênico* – (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 45 e 58 entre outros) associados às lesões intraepiteliais de alto grau, especialmente carcinomas invasivos do colo uterino.

O HPV-16 é o tipo mais prevalente sendo encontrado em aproximadamente 3 a 5% das mulheres infectadas com citologia normal (VAN DEN BRULE *et al.*, 1990; BAUER *et al.*, 1991). Além disso, este tipo viral é encontrado em 50% de todos os cânceres de colo uterino e lesões intraepiteliais de alto grau (BOSCH *et al.*, 1995; KULASINGAM *et al.*, 2002) e 25% das lesões intraepiteliais de baixo grau (ALTS GROUP, 2000).

As evidências acumuladas nos últimos anos levaram a Organização Mundial da Saúde (OMS) deliberar que existem evidências suficientes, tanto do ponto de vista biológico como epidemiológico para considerar carcinogênicos em humanos os tipos de HPV de alto risco oncogênico (VILLA, 1997; IARC WORKING GROUP, 2006). De fato, atualmente o HPV é considerado o principal agente etiológico do carcinoma do colo uterino, uma doença com 471.000 novos casos diagnosticados e aproximadamente 230.000 mortes registradas a cada ano (PARKIN *et al.*, 2001; PISANI *et al.*, 2002). No Brasil o câncer do colo do útero é a terceira neoplasia maligna mais comum entre as mulheres. Para 2006, as estimativas sobre incidência previram o aparecimento de 19.260 novos casos (INCA, 2006).

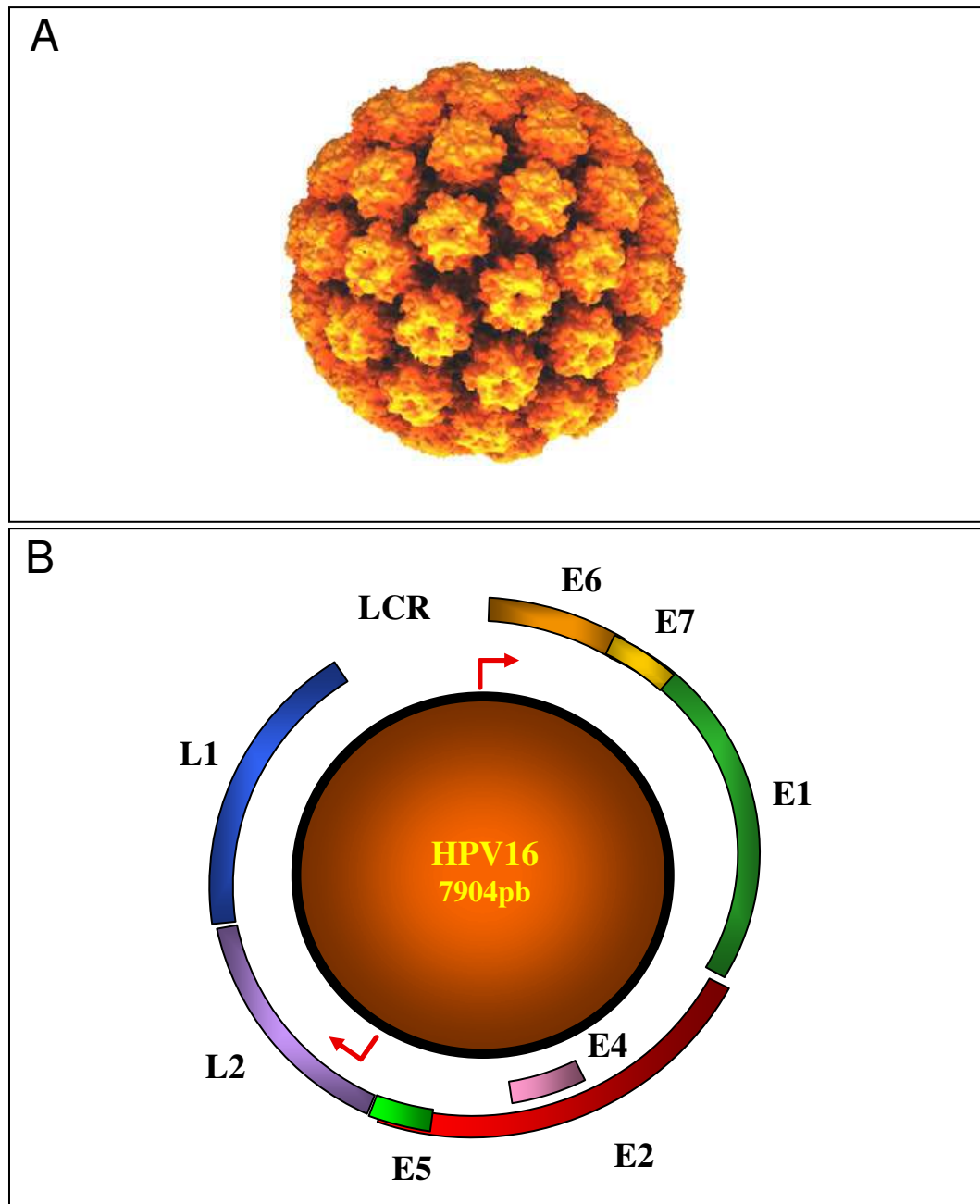
### 1.1. Biologia

Os HPV são vírus de DNA pertencentes à família Papillomaviridae. O HPV-16 pertence ao gênero *Alfa-papilomavírus* (de VILLIERS *et al.*, 2004). Suas partículas virais têm diâmetro de 55 a 60nm, apresentado sob a forma de partículas icosaédricas não envelopadas de simetria pentagonal, constituída por 72 unidades denominadas capsômeros (Figura 1a) (ZHOU & FRAZER, 1996).

Os diferentes tipos de HPV possuem uma organização genômica geral bem conservada. O genoma dupla-fita destes vírus tem aproximadamente 8000 pares de nucleotídeos e pode ser dividido em três regiões funcionalmente diferentes: uma região controladora denominada LCR (*Long Control Region*), uma região precoce ou região E (*Early*) e uma região tardia ou L (*Late*) (Figura 1b).

A LCR encontra-se entre os genes L1 e E6 e apresenta por volta de 900 pares de bases (CHAN *et al.*, 1989). Essa região contém a origem de replicação de DNA, o promotor para a síntese de RNAm e seqüências reguladoras da transcrição (BROKER, 1987; BROWN e FIFE, 1990). O produto de transcrição viral é um RNAm policistrônico que pode ou não ser processado em transcritos alternativos (ARENDS *et al.*, 1990).

Os genes da região L (L1 e L2) codificam para proteínas estruturais do capsídeo, enquanto que os genes E (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) codificam para proteínas com diversas funções reguladoras envolvidas na persistência genômica, replicação do DNA viral, transcrição de genes virais e proliferação celular (HOWLEY, 1996; McMURRAY *et al.*, 2001).

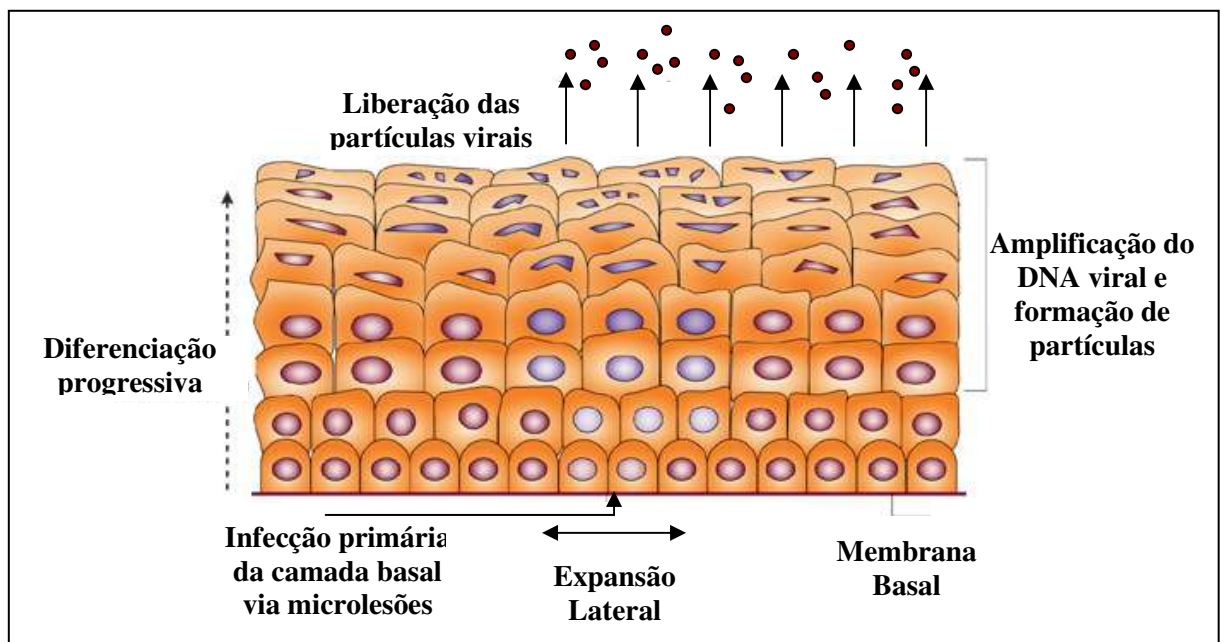


**Figura 1.** Representação esquemática do capsídeo e do genoma viral do HPV-16. **A** - partícula icosaédrica não envelopada de simetria pentagonal composta de 72 capsômeros (<http://microbiologybytes.wordpress.com/2006/10/23/>). **B** - Representação esquemática do genoma do HPV-16, genes da região precoce (E), genes da região tardia (L) e a LCR, correspondente a região regulatória. As setas vermelhas correspondem aos promotores responsáveis pela regulação da transcrição dos genes da região E e L (modificado de Villa, 1997).

O ciclo de vida do HPV é intimamente ligado à diferenciação epitelial (Figura 2). No epitélio escamoso o crescimento ocorre em camadas estratificadas onde, apenas as células da camada basal são capazes de se dividir ativamente. Após deixar a camada basal, as células filhas geradas deixam de se dividir e começam a se diferenciar produzindo quantidades variáveis de tipos específicos de queratina. Enquanto a diferenciação progride, a queratina acumula na célula e o envelope nuclear se fragmenta. Nas camadas mais diferenciadas do epitélio, as células não possuem atividade metabólica e apresentam-se apenas como pacotes de queratina (WATT, 1998).

Durante a infecção pelo HPV, as proteínas virais fazem com que as células não parem de se dividir em resposta ao início da diferenciação. Isso é necessário para que a progênie viral seja produzida. Para que a infecção pelo HPV persista é necessário que o vírion infecte a camada basal do epitélio, o que ocorre normalmente através de microlesões. Uma vez no núcleo, o genoma viral permanece na forma epissomal e o promotor que ativa a transcrição dos genes precoces é ativado. Nas células infectadas o DNA viral se replica e é possível encontrar 50 a 100 cópias de DNA epissomal por célula. Quando ocorre a divisão celular o genoma viral é dividido entre as células filhas, que ao migrarem para as camadas superiores do epitélio durante o processo de diferenciação, continuam com o ciclo celular ativo (FEHRMANN & LAIMINS, 2003). À medida que as células infectadas diferenciam, o promotor que ativa a transcrição dos genes tardios é ativada. Isso indica o início da fase produtiva do ciclo de vida do HPV, marcada principalmente por um aumento da amplificação do genoma do vírus. Nas camadas mais diferenciadas do epitélio, o DNA viral é empacotado em novos capsídeos e a progênie do vírus é liberada da célula (HEBNER & LAIMINS, 2006).





**Figura 2.** O ciclo viral do papilomavírus humano. Através de microlesões o HPV é capaz de infectar células da camada basal do epitélio. Ao migrar para as camadas suprabasais, os genes virais são ativados, o DNA do vírus é replicado e as proteínas do capsômero são sintetizadas. As partículas virais formadas são liberadas na superfície da mucosa onde podem infectar outras células (modificado de zur Hausen, 2002).

## 1.2. Proteínas

Dentre as primeiras proteínas expressas após a infecção viral encontram-se E1 e E2. Estas proteínas estão envolvidas na replicação viral e formam um complexo que se liga à origem de replicação viral no controle das polimerases e proteínas acessórias que auxiliam esse processo (MOHR *et al.*, 1990; FRATTINI & LAIMINS, 1997; CONGER *et al.*, 1999). A proteína E1 também possui atividade de helicase, permitindo a separação das fitas do DNA viral a medida que a replicação ocorre (HUGHES & ROMANOS, 1993). A proteína E2, além de contribuir com E1 para o recrutamento da maquinaria de replicação celular, também apresenta a capacidade de regular a transcrição dos genes virais precoces por se ligar à sítios específicos na LCR viral (CRIPE *et al.*, 1987). Os sítios de ligação da proteína E2 na LCR são adjacentes aos sítios de ligação de fatores celulares que transativam a transcrição dos genes precoces (STUBENRAUCH *et al.*, 1998). Em baixos níveis E2 se liga a estes sítios e ativa a transcrição dos genes adjacentes. Em altos níveis, contudo, esta proteína ocupa os sítios de ligação dos fatores de transcrição celulares, inibindo a transcrição dos genes da região precoce (STEGGER *et al.*, 1997). Uma vez que os fatores de replicação E1 e E2 também são expressos como genes precoces, a habilidade de E2 de ativar ou reprimir a expressão contribui para o controle do número de cópias virais nas células não diferenciadas (LONGWORTH & LAIMINS, 2004).

O papel da proteína E4 no ciclo de vida do HPV ainda não está esclarecido. Esta proteína parece ser incorretamente classificada como um produto gênico precoce, uma vez que sua detecção foi possível somente nas camadas mais diferenciadas do epitélio associada ao citoesqueleto de queratina. Esta proteína não é requerida para a transformação ou para a persistência episomal do genoma viral. A proteína E4 parece estar envolvida na maturação e na liberação das partículas virais para o meio extracelular (HEBNER & LAIMINS, 2006).

A proteína E5 encontra-se predominantemente no complexo de Golgi. Esta é a principal proteína transformante de BPV-1 (papilomavírus bovino) (SCHILLER *et al.*, 1986). Por outro lado, em HPV, a proteína E5 apresenta baixa atividade transformante. A proteína E5 pode causar transformação de queratinócitos de camundongos, levar ao crescimento independente de ancoragem em fibroblastos de camundongo, além de estimular o crescimento de células epiteliais primárias de fígado de camundongo em cooperação com E7. Nas células infectadas por HPV foi observado que esta proteína amplifica o sinal mitogênico do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF). Além disso, a proteína E5 de HPV-16 é capaz de diminuir a expressão de moléculas de HLA de classe I (ASHRAFI *et al.*, 2005). O gene E5 está freqüentemente deletado nos tumores da região anogenital. Entretanto, altos níveis de RNAm e proteína são detectados em lesões intra-epiteliais precursoras de baixo grau (ZUR HAUSEN, 2000).

As proteínas que compõem o capsídeo viral, L1 e L2, são expressas tardiamente no ciclo de vida viral, nas camadas mais diferenciadas do epitélio. A proteína L1 é a principal constituinte do capsídeo do papilomavírus e a proteína viral mais abundante, constituindo cerca de 80% do total das proteínas virais (HOWLEY, 1996). Essa proteína parece abrigar epítomos tipo-específicos e ser altamente imunogênica (ZUR HAUSEN, 1996). A proteína L2, por sua vez, é a proteína viral menos abundante e, embora seja um componente estrutural adicional do capsídeo viral, associada a L1, parece ter um papel importante na incorporação do DNA viral dentro do vírion (ZHOU e FRAZER, 1996). Através da expressão destas duas proteínas em sistemas heterólogos é possível a obtenção de partículas virais vazias, denominadas VLP (*Virus Like Particles* ou partículas semelhantes a vírus) (KIRNBAUER *et al.*, 1992). Atualmente as VLP são a base das vacinas que previnem infecções tanto por HPV de alto risco (16 e 18) quanto por HPV de baixo risco (6 e 11) (KOUTSKY *et al.*, 2002; VILLA *et al.*, 2006).

A replicação do DNA viral é, em grande parte, dependente da maquinaria de replicação celular. O fato do ciclo de vida viral estar intimamente ligado à diferenciação epitelial implica que a síntese de DNA nas camadas mais diferenciadas do epitélio deve permanecer ativa ou ser reativada. O HPV evita que as células em processo de diferenciação parem de proliferar através da expressão da oncoproteína E7 (CHENG *et al.*, 1995). Nesta situação as células reiniciam a síntese de DNA após o início da diferenciação ativando a expressão de fatores celulares necessários à replicação viral. A presença de E7 leva a retenção do núcleo nas camadas mais diferenciadas, situação incomum ao epitélio normal (LONGWORTH & LAIMINS, 2004). Além disso, a expressão de E7 também parece ser necessária para a manutenção da forma extracromossomal do vírus nas células da camada basal (THOMAS *et al.*, 1999), função compartilhada por outra oncoproteína viral, E6. Apesar do papel de E6 no ciclo de vida produtivo do HPV ainda não ter sido bem estabelecido, estudos demonstram que a expressão desta proteína é necessária para manter o genoma de HPV-31 e HPV-11 em uma forma estável e passível de replicação (THOMAS *et al.*, 1999; OH *et al.*, 2001). O fato desta função ser compartilhada por HPV de alto e baixo risco pode indicar um mecanismo importante para prevenir a eliminação de um genoma extracromossomal pela célula hospedeira (LONGWORTH & LAIMINS, 2004).

A forma epissomal do HPV é normalmente encontrada em lesões intra-epiteliais de baixo grau no colo uterino. Contudo, em lesões de alto grau e no carcinoma da cérvix uterina o genoma viral encontra-se predominantemente integrado ao genoma do hospedeiro (STOLER *et al.*, 1992). A forma de integração mais comumente encontrada nas lesões malignas é aquela onde o gene E2 encontra-se interrompido. Este tipo de integração elimina o controle que E2 exerce sobre o promotor que controla a transcrição de E6 e E7. Sem controle, a expressão destes oncogenes passa a ser constitutiva e se torna um dos eventos centrais na

promoção da carcinogênese induzida por HPV (SMOTKIN & WETTSTEIN, 1986; BANKS *et al.*, 1987).

A possibilidade de uma infecção por HPV progredir para uma lesão maligna é freqüentemente atribuída à habilidade das oncoproteínas E6 e E7 manipularem a expressão de reguladores do ciclo celular. A expressão de E6 e E7 de HPV de alto risco é suficiente para induzir a imortalização de queratinócitos primários humanos (QPH) em sistemas de cultura de células (HAWLEY-NELSON *et al.*, 1989; MÜNGER *et al.*, 1989; HUDSON *et al.*, 1990). Entretanto, estas linhagens celulares não são tumorigênicas em camundongos atímicos e necessitam eventos adicionais como a presença do oncogene *ras* ativado (HURLIN *et al.*, 1991) ou serem cultivada por dezenas de passagens para se tornarem completamente transformadas (DiPAOLO *et al.*, 1989; DÜRST *et al.*, 1989). Estas observações comumente mimetizam os múltiplos passos necessários para a progressão de uma infecção inicial por HPV para uma lesão maligna. Vale ressaltar que os genes E6 e E7 são os únicos genes do HPV expressos de forma constitutiva nas linhagens celulares derivadas de carcinomas da cérvix uterina. Além disso, a expressão destes genes é necessária para a manutenção do fenótipo transformado de linhagens celulares derivadas de tumores cervicais uma vez que sua inibição tem como resultado a reativação de vias de sinalização mediadas por genes supressores de tumor e a diminuição da proliferação celular (GOODWIN & DiMAIO, 2000; FRANCIS *et al.*, 2000).

O gene E6 é um dos primeiros a ser expresso durante a infecção por HPV (OZBUN, 2002) e desempenha um importante papel na imortalização celular. Enquanto E6 sozinho não é capaz de imortalizar QPH, ele atua em conjunto com E7 para induzir alterações que levam a imortalização (LIU *et al.*, 1999). A proteína E6 não apresenta atividade enzimática intrínseca e exerce suas funções através da interação com proteínas celulares. Dentre estas interações destaca-se a capacidade da proteína E6 de unir-se à proteína supressora de tumor p53

(SCHEFFNER *et al.*, 1990; CROOK *et al.*, 1991; LECHNER *et al.*, 1992; KESSIS *et al.*, 1993). O produto do gene p53 é uma proteína supressora de tumor induzida por danos ao DNA ou por estímulos mitogênicos inapropriados. A importância deste fator nos mecanismos de tumorigênese é ressaltada pelo fato deste gene encontrar-se mutado em mais de 50% dos cânceres humanos. Em resposta a danos no DNA p53 é ativado e é capaz de induzir um aumento na expressão da proteína p21<sup>cip1</sup>. Esta proteína apresenta-se como um inibidor dos complexos de ciclinas/quinasas dependentes de ciclinas e o aumento de sua expressão está associado tanto a parada do ciclo celular quanto a apoptose (KO & PRIVES, 1996).

Muitos vírus apresentam a habilidade de evitar que a célula hospedeira entre em apoptose. Contudo, em alguns casos, essa habilidade pode permitir o surgimento de neoplasias. Para evitar a atividade pró-apoptótica de p53 e permitir a progressão do ciclo celular, E6 se liga a p53 e a uma proteína ubiquitina-ligase conhecida como E6AP (HUIBREGSTE *et al.*, 1991). A formação deste complexo resulta na ubiquitinação de p53 e sua subsequente degradação. Isso leva a uma redução da meia vida de p53 de muitas horas para menos de 20 minutos em queratinócitos (HUBBERT *et al.*, 1992; HUIBREGSTE *et al.*, 1993). O produto do gene E6 também pode regular negativamente a atividade de p53 por se ligar ao seu co-ativador transcricional p300/CBP (LECHNER & LAIMINS, 1994; ZIMMERMANN *et al.*, 1999). Uma vez que p53 regula tanto a transição G1/S quanto a transição G2/M do ciclo celular, sua inativação pode induzir duplicações cromossômicas e anormalidades centrossômicas (THOMPSON *et al.*, 1997).

Além da bem descrita interação de E6 com p53, estudos apontam que mesmo sendo incapaz de induzir a degradação desta proteína, E6 ainda é capaz de induzir a imortalização de células epiteliais de mama (KIYONO *et al.*, 1998; LIU *et al.*, 1999). Um dos possíveis mecanismos envolvidos neste processo inclui a capacidade da oncoproteína E6 de ativar a expressão da subunidade catalítica da telomerase, hTERT (KLINGELHUTZ *et al.*, 1996). A

telomerase é uma enzima composta de quatro subunidades responsável pela manutenção do comprimento dos telômeros. A atividade de telomerase é normalmente restrita às células germinativas e normalmente não é encontrada em células somáticas. A perda da atividade de telomerase provoca o encurtamento dos telômeros a cada divisão celular e está relacionada a indução de senescência. Na maioria das células tumorais ocorre a reativação de hTERT, reconstituindo dessa forma a atividade da telomerase (LIU *et al.*, 1999). A oncoproteína E6 é capaz de induzir a expressão de hTERT aumentando sua transcrição através da sua capacidade de modular a atividade do fator de transcrição c-Myc e seu co-fator Max (VELDMAN *et al.*, 2003). Através da análise da atividade de mutantes de E6 que são incapazes de induzir a degradação de p53 foi possível constatar que a capacidade de E6 de induzir a expressão de hTERT é mais importante para indução de imortalização que a própria degradação de p53. Outra função de E6 relacionada ao processo de imortalização parece estar relacionada a sua capacidade de interagir com várias proteínas da família PDZ. Estas proteínas apresentam um domínio PDZ e são normalmente encontradas em regiões de contato célula-célula onde apresentam funções de adesão e sinalização celular. Através da ligação com a sua região C-terminal, E6 é capaz de induzir a degradação de muitos membros desta família, incluindo: hDlg (GARDIOL *et al.*, 1999), hScrib (NAKAGAWA & HUIBREGTSE, 2000), MUPP1 (LEE *et al.*, 2000) e MAGI-1, 2 e 3 (GLAUSINGER *et al.*, 2000; THOMAS *et al.*, 2002). Além das interações descritas acima, a oncoproteína E6 dos HPV de alto risco oncogênico é capaz de interagir e alterar a função de outras proteínas celulares. Dentre estas podemos citar: paxilina, SRC, ERC55, E6-BP, E6-TP1 IRF-3, BAK e TSC-2 (CHEN *et al.*, 1995; RONCO *et al.*, 1998; GAO *et al.*, 1999; ODA *et al.*, 1999; PATEL *et al.*, 1999; THOMAS & BANKS, 1999; ZIMMERMANN *et al.*, 1999; LU *et al.*, 2004).

O produto do gene E7 de HPV é uma fosfoproteína cuja principal e mais estudada interação é com a forma hipofosforilada da proteína de susceptibilidade ao retinoblastoma,

pRb. A proteína pRb desempenha um importante papel na regulação do ciclo celular uma vez que controla a transição da fase G1 para a fase S. Em células normais, a proteína pRb encontra-se hipofosforilada no início da fase G1 e o seu grau de fosforilação aumenta a medida que ocorre a progressão para a fase S. Na sua forma hipofosforilada, pRb liga-se ao fator de transcrição E2F e impede que este fator ative a transcrição de genes responsáveis pela síntese de DNA (LA THANGHE, 1994; SLANSKY & FARNHAM, 1996). Ao se ligar a proteína pRb em seu estado hipofosforilado, E7 promove a liberação do fator de transcrição E2F promovendo a progressão do ciclo celular (CHELLAPPAN *et al.*, 1992). Em um epitélio normal, as células param de proliferar à medida que o processo de diferenciação se inicia. Acredita-se que a proteína pRb desempenhe um importante papel na parada de proliferação induzida pelo início da diferenciação. Através da ligação com a proteína pRb, E7 é capaz de induzir a progressão do ciclo celular nas camadas mais diferenciadas do epitélio. Adicionalmente, E7 ainda é capaz de induzir a degradação de pRb pela via de proteólise dependente de ubiquitinação. Esse passo parece ser essencial para que E7 consiga evitar a parada do ciclo celular (GIARRE *et al.*, 2001). Além de pRb, E7 também é capaz de interagir com p107 e p130. Estas proteínas fazem parte da família de pRb e também estão envolvidas na inativação da atividade do fator de transcrição E2F (DYSON *et al.*, 1989; DAVIES *et al.*, 1993).

Além da ligação com membros da família pRb, a oncoproteína E7 é capaz de influenciar a transcrição de genes responsivos a E2F por se ligar às histonas deacetilases (HDAC) (BREHM *et al.*, 1999). As HDAC atuam como co-repressores transcricionais por induzirem o remodelamento da cromatina. A ligação de E7 as HDAC parece aumentar a transcrição de genes ativados por E2F nas células diferenciadas (LONGWORTH *et al.*, 2005) induzindo sua re-entrada na fase S do ciclo celular. Essa ligação desempenha um importante papel no ciclo de vida viral uma vez que células que expressam a oncoproteína E7, com



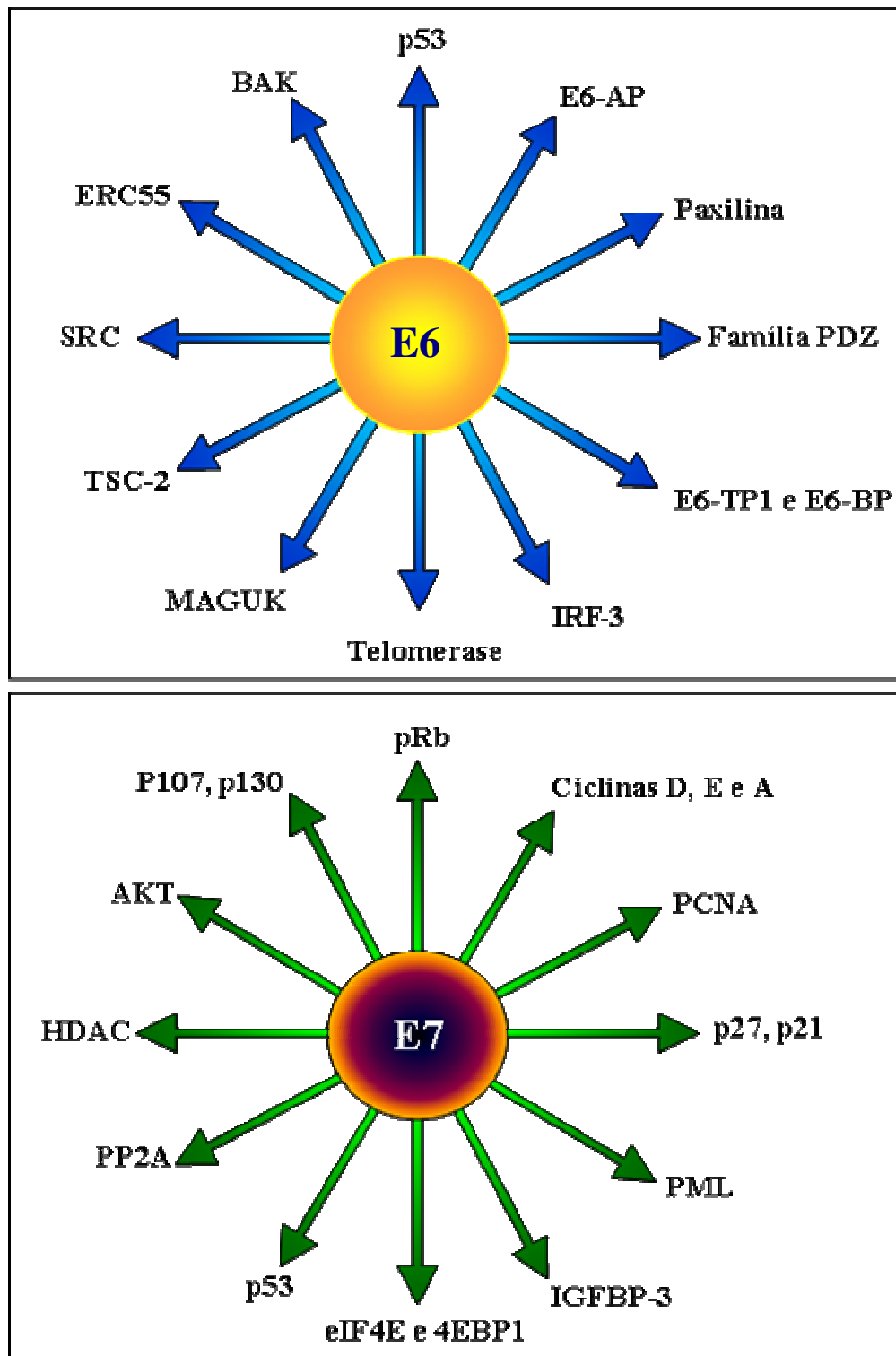
mutações que interferem na sua ligação à HDAC, apresentam crescimento mais lento e maior chance de perda do DNA episomal (LONGWORTH & LAIMINS, 2004).

Estudos adicionais realizados com a oncoproteína E7 dos HPV de alto risco também demonstram sua capacidade de impedir a atividade de inibidores de quinases dependentes de ciclinas (CKI) tais como p21<sup>cip1</sup> (FUNK *et al.*, 1997; JONES *et al.*, 1997) e p27<sup>kip1</sup> (ZERFASS-THOME *et al.*, 1996). Nos últimos anos foi demonstrado também que a inativação de pRb e p21<sup>cip1</sup> são eventos necessários para prevenção de parada do ciclo celular (HELT *et al.*, 2002). A ligação de E7 à p21<sup>cip1</sup> e p27<sup>kip1</sup> interfere na habilidade da proteína p53 de induzir a parada do ciclo celular disparada por dano ao DNA (DEMERS *et al.*, 1994; HICKMAN *et al.*, 1994; SEBLOS *et al.*, 1994). Interessantemente, as células que expressam E7 apresentam altos níveis das proteína p53 (DEMERS *et al.*, 1994) e p21<sup>cip1</sup> (THOMAS & LAIMINS, 1998). Este aumento é atribuído a um aumento da estabilidade destas proteínas (JONES & MUNGER, 1997; JONES *et al.*, 1999; NOYA *et al.*, 2001). Além das proteínas inibitórias descritas acima, a oncoproteína E7 de HPV de alto risco também é capaz de interagir com as ciclinas A e E (TOMMASINO *et al.*, 1993). Em ambos os casos E7 é capaz de manter a ativação de cdk2 (McINTYRE *et al.*, 1996; RUESCH *et al.*, 1998). Também observa-se que a proteína E7 dos HPV de alto risco é capaz de promover um aumento dos níveis das ciclinas A e E. O mesmo não é observado em relação a expressão de E7 dos HPV de baixo risco (MARTIN *et al.*, 1998).

Recentemente foi demonstrado que E7 é capaz de se ligar ao produto do gene supressor de tumor PML (BISCHOF *et al.*, 2005). Este gene está envolvido na indução de senescência celular e a perda de sua função resulta no aumento da taxa de proliferação e indução de tumorigênese (WANG *et al.*, 1998). Além disso, E7 também é capaz de interagir com a proteína IGFBP-3 reduzindo seus níveis (MANNHARDT *et al.*, 2000). Esta proteína

está envolvida no controle de ativação da via de PI3K/AKT através da sua interferência no sinal disparado pela ligação da insulina ao receptor IGF-1 (HUYNH *et al.*, 2002).

A via de PI3K pode ser ativada em resposta a uma variedade de estímulos extracelulares. Sua ativação tem sido relacionada à translocação da proteína AKT para a membrana plasmática das células. Acredita-se que esta translocação induza uma mudança conformacional que permite que AKT seja fosforilado no seu resíduo de serina 473. Esta ativação pode ser induzida por uma quinase dependente de PI3K (PDK) ou através de quinases ligadas à integrinas (ILK) (TROUSSARD *et al.*, 2003). A proteína AKT também pode ser fosforilada no resíduo de treonina 308 de maneira dependente de PI3K. Ao ser completamente ativada a proteína AKT pode induzir a fosforilação de seus alvos impedindo, por exemplo, que fatores de transcrição tais como FKHRL1 (*forkhead transcription factor 1*) entrem no núcleo (BRUNET *et al.*, 1999). Por outro lado, outros de seus alvos tais como GSK3 $\alpha$  e  $\beta$ , p21<sup>cip1/waf1</sup>, BAD, hTERT, BRCA-1 e hDM2 parecem ser fosforilados quando AKT encontra-se no núcleo (BRAZIL & HEMMING, 2001). Vários antagonistas para estas vias já foram descritos. A permanência de AKT na membrana plasmática é bloqueada pela atividade da proteína fosfatase PTEN (STAMBOLIC *et al.*, 1998) e a defosforilação de AKT pode ser obtida pela atividade da fosfatase PP2A (ANDJELKOVIC *et al.*, 1996). Recentemente foi demonstrado que E7 é capaz de interagir com a proteína PP2A e impedir sua interação com AKT (PIM *et al.*, 2005). Além disso, Menges e colaboradores (2006) demonstraram que E7 de HPV-16 é capaz de aumentar a atividade de AKT através da sua capacidade de induzir a degradação da proteína pRb. Também foi descrito que E7 é capaz de alterar o balanço dos fatores de tradução celulares (eIF4E e 4E-BP1) para induzir um aumento dos níveis de sua expressão (OH *et al.*, 2006). A figura 3 ilustra as interações de E6 e E7 já descritas com proteínas celulares.



**Figura 3.** Proteínas celulares que apresentam sua atividade modificada pelas oncoproteínas E6 e E7.

### 1.3. Potencial Oncogênico

A síntese contínua das proteínas precoces E6 e E7 do HPV é uma etapa essencial para o desenvolvimento e manutenção de tumores malignos, visto que ocorre sempre durante a gênese dos tumores anogenitais associados a este vírus (ZUR HAUSEN, 1996). Diferentes sistemas têm mostrado que as funções das proteínas transformantes codificadas pelos HPV associados ao câncer anogenital em humanos, podem ser reproduzidas *in vitro* (BEDELL *et al.*, 1989; KANDA *et al.*, 1988; MATLASHEWSKI *et al.*, 1987; PIRISI *et al.*, 1987). Dentre esses estudos, os dados iniciais de maior importância, foram a constatação de que os HPV-16, 18 e 31, os mais correlacionados às lesões do trato anogenital e com potencial para progressão maligna, podem imortalizar culturas primárias de queratinócitos normais de prepúcio ou células epiteliais da região cérvix uterina (o mesmo não acontecendo com HPV de baixo risco) (KAUR e McDOUGALL, 1988; SCHLEGEL *et al.*, 1988; WOODWORTH *et al.*, 1990).

No processo de imortalização de queratinócitos humanos normais, os HPV de alto risco promovem alterações de proliferação e de diferenciação celular. Estas células tornam-se altamente proliferantes mesmo na presença de fatores indutores de diferenciação celular, como fatores protéicos presentes no soro e altas concentrações de cálcio, e continuam dividindo indefinidamente *in vitro*, não se diferenciando (SCHLEGEL *et al.*, 1988).

Vale ressaltar que a maioria dos carcinomas de células escamosas, incluindo linhagens celulares derivadas de tumor da cérvix uterina, é resistente à supressão de crescimento induzida por citocinas. A expressão da oncoproteína E7 é capaz de superar o efeito inibitório induzido por TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor - $\beta$* ), uma importante citocina que restringe o crescimento de células epiteliais. Acredita-se que esta resistência se deva em parte ao fato de E7 ser capaz de inibir a atividade de p21<sup>cip1</sup> e p27<sup>kip1</sup>, ambos relacionados à inibição de proliferação induzida pelo tratamento com TGF- $\beta$  (PIETENPOL *et al.*, 1990). De maneira

similar, linhagens derivadas de carcinomas da cérvix uterina são resistentes ao efeito citostático do TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* ) (VILLA *et al.*, 1992). O TNF é uma citocina produzida por células T citotóxicas, macrófagos e queratinócitos sendo considerado um importante mediador da resposta imune contra infecções virais. O tratamento com TNF induz a parada do ciclo celular em G1 e diferenciação celular em queratinócitos normais. Contudo, queratinócitos que expressam a oncoproteína E7 são insensíveis ao efeito antiproliferativo do TNF. Essa resistência parece ser relacionada à inativação das proteínas da família pRb (BASILE *et al.*, 2001) e pode ser evidenciada em modelos de cultura organotípica de queratinócitos contendo o gene E7 ou o genoma completo de HPV-18 (BOCCARDO *et al.*, 2004).

A expressão das oncoproteínas E6 e E7 de HPV de alto risco, principalmente sua cooperação, é fundamental para a progressão e manutenção do fenótipo imortalizado ou maligno. De fato, a inibição da expressão *in vitro* destas proteínas interrompe a proliferação celular e, em alguns casos, pode ocorrer a reversão do fenótipo maligno ou imortalizado (BARBOSA *et al.*, 1989; GOODWIN & DiMAIO, 2000, ZUR HAUSEN, 2000). Em 2002, Jiang e Milner demonstraram que a inativação do RNAm de E6 e E7, através da utilização de RNA de interferência (RNAi), promovia uma redução da proliferação celular e o aumento de apoptose. Em 2003, Butz e colaboradores descreveram que ao inibir a produção de E6, também através de RNAi, era possível induzir apoptose em células derivadas de carcinomas do colo uterino.

Dessa forma, o desenvolvimento de estratégias que possibilitem a inibição de expressão de E6 e E7 podem contribuir para a reversão dos eventos celulares envolvidos nos processos de carcinogênese da cérvix uterina.

## 2. A RAPAMICINA

### 2.1. Descoberta e Características

A rapamicina foi descoberta durante uma triagem de possíveis drogas com ação antibacteriana pelo “*Ayerst Research Laboratories*”, com a primeira publicação científica datada de 1975 (VEZINA *et al.*, 1975). A rapamicina é uma lactona macrocíclica produzida por uma cepa de *Streptomyces hyroscopicus* isolada inicialmente do solo da ilha de Páscoa. Esta ilha, de nome nativo, *Rapa Nui*, inspirou o nome do composto isolado. Também conhecida pela numeração AY-22989, a rapamicina é um sólido branco cristalino, insolúvel em água, mas prontamente solúvel em etanol, metanol e DMSO (dimetilsulfóxido). Curiosamente a rapamicina não possui atividade antibacteriana; mas é eficaz na inibição de proliferação de leveduras, possui ação moderada contra fungos filamentosos, e é um forte antagonista do crescimento de várias espécies de *Candida*, especialmente *Candida albicans* (CRUZ *et al.*, 2001).

A rapamicina ganhou prestígio na comunidade científica somente 10 anos após a sua descoberta. Sua popularidade está intimamente relacionada com a descoberta de outra droga, o FK506 (KINO *et al.*, 1987), que sendo semelhante a rapamicina quanto a sua composição química e possuindo atividade imunossupressora, instigou a curiosidade de pesquisadores para determinar se a rapamicina seria, também, um eficaz agente imunossupressor. Ainda assim, foi somente após a demonstração de que o FK506 é cerca de 100 vezes mais potente que a ciclosporina-A, droga imunossupressora de reconhecido valor clínico, é que a comunidade clínica e científica passou a investigar o potencial terapêutico da rapamicina efetivamente (KINO *et al.*, 1987).

Não foi preciso muito tempo para se observar o potencial imunossupressor da rapamicina. De fato, esta droga é capaz de bloquear de maneira muito eficiente a proliferação

de linfócitos T induzindo sua parada na fase G1 do ciclo celular (DUMONT *et al.*, 1990). Devido à sua potente ação imunossupressora, a rapamicina foi inicialmente desenvolvida e regulamentada para prevenir a rejeição de órgãos transplantados (SEHGAL, 1995). Contudo, nos últimos anos, o potencial terapêutico da rapamicina foi estendido. Mais do que a inibição da ativação de linfócitos T, estudos posteriores começaram a identificar a rapamicina como potencial agente anti-tumoral (HIDALGO & ROWINSKY, 2000).

## **2.2. Atividade Anti-tumoral**

A rapamicina foi identificada como possível agente anti-tumoral ainda na década de 1970. Estudos realizados no NCI (*National Cancer Institute*) norte-americano demonstraram que a nova droga possuía potente atividade inibitória contra vários tipos de tumores sólidos (DOUROS & SUFFNESS, 1981; HOUCHENS *et al.*, 1983; ENG *et al.*, 1984). Apesar do NCI ter apontado o grande potencial da rapamicina, a companhia responsável pelo seu isolamento desistiu desta droga ao falhar em obter uma formulação intravenosa satisfatória que pudesse ser utilizada em ensaios clínicos. Além disso, na ocasião, pouco se sabia a respeito do mecanismo de ação da rapamicina. Foi somente em 1988, após a fusão da Ayerst com a Wyeth, que as pesquisas sobre o potencial terapêutico da rapamicina foram retomadas (HUANG & HOUGHTON, 2002).

A rapamicina normalmente apresenta efeito citostático, ou seja, induz a parada do ciclo celular na fase G1. Em linhagens celulares derivadas de tumores, além de induzir a parada do ciclo celular, esta droga também pode induzir apoptose. Atualmente sabe-se que a rapamicina é um potente inibidor do crescimento de células tumorais derivadas de rabdomiossarcomas (DILLING *et al.*, 1994), neuroblastomas e gliomas (SHI *et al.*, 1988), carcinoma de células pequenas do pulmão (SEUFFERLEIN & ROZENGURT, 1996), osteosarcoma (OGAWA *et al.*, 1998), carcinoma pancreático (GREWE *et al.*, 1999; SHAH *et al.*, 2001), carcinomas de

mama e próstata (GIBBONS *et al.*, 1999; YU *et al.*, 2001), melanoma murino, leucemia e linfoma de células B (HULTCH *et al.*, 1992; GOTTSCHALK *et al.*, 1994; MUTHUKKUMAR *et al.*, 1995). Contudo, a utilização da rapamicina como agente antitumoral na rotina clínica é prejudicada por sua baixa solubilidade e estabilidade em solução. Atualmente, dois ésteres análogos da rapamicina conhecidos como CCI-779 (Wyeth-Ayerst, PA, USA) e RAD001 (Novartis, Basel, Switzerland) vem sendo utilizados em estudos clínicos. Estes análogos apresentam propriedades farmacêuticas mais desejáveis e seu potencial de ação é muito similar ao da rapamicina (GIBBONS *et al.*, 1999; GEOERGER *et al.*, 2001; BEUVINK *et al.*, 2005).

Vários estudos clínicos com os dois análogos da rapamicina já foram concluídos. Os estudos clínicos de fase I, que avaliam a segurança do medicamento, foram realizados com pacientes portadores de diversas neoplasias e constataram que os efeitos colaterais relacionados à utilização da droga CCI-779 incluíam hipocalcemia, vômitos, trombocitopenia e um aumento dos níveis de transaminases hepáticas (DANCEY, 2002). Foram observadas respostas objetivas em carcinoma de células não-pequenas do pulmão, neuroendócrino e carcinomas de mama (ATKINS *et al.*, 2004). Respostas intermediárias ou estabilização da doença foram observadas em carcinoma da cérvice uterina, carcinoma de células renais e sarcomas de partes moles. Nos estudos clínicos de fase II para carcinoma de células renais, 5 a 7% dos pacientes obtiveram uma resposta objetiva, de 26-29% obtiveram uma resposta intermediária e 40% dos pacientes apresentaram uma estabilização da doença. Estes tratamentos foram relacionados a um aumento do tempo de sobrevida de 4 meses (ATKINS *et al.*, 2004). Para o linfoma de células do manto, 3% dos pacientes obtiveram uma resposta completa e 35% obtiveram uma resposta parcial (WITZIG *et al.*, 2005). O tratamento de pacientes com tumores de endométrio com o análogo da rapamicina CCI-779 parece contribuir para uma resposta objetiva de 25%. Mais da metade dos pacientes que participaram



deste estudo apresentaram uma estabilização da doença. A média de sobrevida livre de progressão foi de aproximadamente 8 meses. Os estudos clínicos de fase III estão em andamento para testar a eficácia do tratamento com CCI-779, isoladamente ou em combinação com interferon- $\alpha$ , como primeira estratégia de tratamento contra o carcinoma de células renais. Além disso, o CCI-779 também está sendo testado em combinação com o inibidor de aromatase letrozol para o tratamento de carcinoma de mama em estágio avançado e também metastático (EASTON & HOUGHTON, 2006).

Apesar da rapamicina ser capaz de induzir a parada do ciclo celular de vários tipos celulares, algumas linhagens derivadas de tumores são extremamente resistentes ao efeito antiproliferativo da rapamicina (SAWYERS, 2003). Além disso, a maioria dos pacientes com carcinoma de mama avançado parecem exibir resistência intrínseca a estes agentes anti-tumorais (taxa global de resposta em torno de 9,2%) (CHANG *et al.*, 2005; KURMASHEVA *et al.*, 2006).

O maior desafio para o desenho dos ensaios clínicos é a identificação de pacientes com uma assinatura molecular que permita distinguir entre aqueles que apresentarão benefício mediante o tratamento e aqueles cujos tumores não serão afetados pela utilização da droga. O critério de inclusão tradicional que utiliza a histologia do tumor e o sítio anatômico de origem pode falhar consideravelmente (SAWYERS, 2003). Baseados nestes aspectos, vários centros de pesquisa no mundo todo tentam identificar marcadores moleculares que sejam capazes de diferenciar tumores candidatos ao tratamento com os análogos da rapamicina. Alguns trabalhos têm apontado que a perda de expressão de PTEN ou a ativação de AKT promovem um aumento de sensibilidade à rapamicina. Estes trabalhos foram realizados numa série de linhagens celulares tumorais derivadas de cérebro, próstata e mama e também em tumores gerados em camundongos atímicos (YU *et al.*, 2001). Na maioria das células tumorais que apresentaram resistência a esta droga os níveis de ativação de AKT eram baixos ou

moderados. Assim, um dos marcadores moleculares que podem indicar a resistência à rapamicina pode ser a diminuição de ativação de AKT (SHI *et al.*, 2005). Também observa-se que o aumento de sensibilidade à rapamicina em linhagens de carcinoma de mama é inversamente proporcional a atividade de fosfolipase D (PLD). Níveis aumentados da atividade desta enzima conferem resistência à rapamicina e sua inibição leva a um aumento de sensibilidade (CHEN *et al.*, 2003). Essa hipótese é condizente com o fato de que o aumento da atividade de PLD promove um aumento dos níveis de ácido fosfatídico, um composto que se liga ao domínio FRB de mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*). Ao se ligar a este domínio, o ácido fosfatídico impede que a rapamicina se ligue a mTOR e bloqueie sua atividade (FANG *et al.*, 2001).

A resistência à rapamicina também se correlaciona com o aumento de expressão da proteína anti-apoptótica BCL-2. Estudos apontam que a inibição da sua expressão através de oligonucleotídeos antisense restabelece a capacidade do análogo da rapamicina RAD001 de induzir apoptose (SHINOURA *et al.*, 1999; FAIVRE *et al.*, 2006).

A deleção de p27<sup>kip</sup> em fibroblastos embrionários murinos (MEF – *mouse embryonary fibroblasts*) também correlaciona-se à resistência parcial à rapamicina. Além disso, a deleção completa de pRb nestas células torna as mesmas extremamente resistentes ao efeito antiproliferativo da rapamicina (KURMASHEVA *et al.*, 2006).

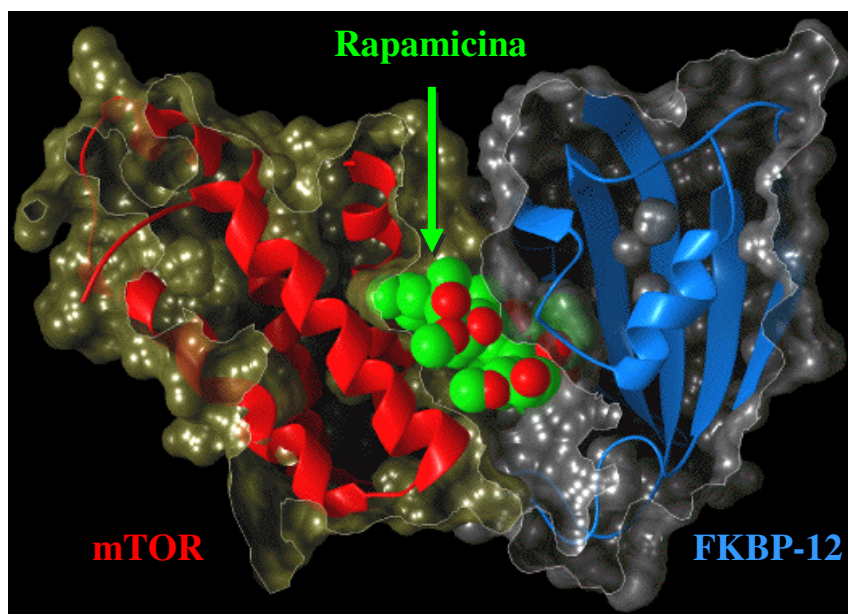
Por outro lado, foi demonstrado que o gene *p53* pode influenciar a sensibilidade de células à rapamicina. Numa situação onde MEF são cultivados na ausência de soro, a rapamicina foi capaz de induzir apoptose apenas naquelas células onde o gene *p53* estava deletado. O mesmo foi observado para o gene p21<sup>cip1</sup>, alvo transcricional da proteína *p53* (HUANG *et al.*, 2001; HUANG *et al.*, 2003).

### 2.3. Mecanismo de Ação

A proteína alvo da rapamicina (TOR – *Target Of Rapamycin*) foi originalmente identificada em cepas mutadas de *Saccharomyces cerevisiae* que apresentavam resistência ao efeito antiproliferativo da rapamicina (HEITMAN *et al.*, 1991). Este estudo também demonstrou que a rapamicina requer um cofator intracelular para sua toxicidade, a proteína FKBP-12. Ao formar um complexo com a proteína FKBP-12, a rapamicina é capaz de se ligar e inibir a atividade de TOR (Figura 4).

Estudos subsequentes em células de mamíferos levaram a identificação e clonagem do homólogo mTOR (WULLSCHLEGER *et al.*, 2006). Até o presente, todos os genomas eucarióticos analisados apresentam o gene TOR. Ao contrário de leveduras, que em alguns casos pode possuir dois genes TOR, os eucariotos superiores apresentam apenas uma cópia deste gene (CRESPO & HALL, 2002).

A proteína mTOR, também conhecida como FRAP ou RAFT, apresenta aproximadamente 280 kDa. Em humanos, ratos e camundongos a proteína mTOR apresenta 95% de identidade entre seus aminoácidos (JACINTO & HALL, 2003). Pelo fato de sua extremidade C-terminal apresentar alta homologia ao domínio catalítico de PI3K, esta proteína foi considerada membro da família PIKK (*Phosphatidylinositol 3-kinase related kinase*), que também inclui Mec1, Tel1, RAD3, MEI-41, DNA-PK, ATM, ATR e TRAP (GINGRAS *et al.*, 2001). Além disso, mTOR é capaz de responder a estímulos disparados pela ativação da via de PI3K (HAY & SONENBERG, 2004).



**Figura 4.** Complexo formado pela ligação da rapamicina à FKBP-12 e mTOR. Uma vez formado, este complexo impede que a proteína mTOR exerça sua atividade (modificado de <http://www.ch.ic.ac.uk/local/projects/russell/binding.html>).

A ligação da insulina ou de fatores semelhantes à insulina (IGF) ao seus receptores leva ao recrutamento e fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS) e subsequente recrutamento de PI3K. Ao se ligar a IRS a PI3K é capaz de converter fosfatidilinositol-4, 5-fosfato (PIP2) a fosfatidilinositol-3, 4, 5-fosfato (PIP3) que promove o recrutamento de PDK1 e AKT para a membrana levando a sua ativação (WULLSCHLEGER *et al.*, 2006). A proteína PTEN atua como antagonista neste processo uma vez que restringe a formação de PIP2 e PIP3, impedindo a translocação da proteína AKT para a membrana (HAY & SONENBERG, 2004).

A proteína kinase AKT, também conhecida como PKB, atua como importante mediador do sinal transmitido por PI3K à mTOR. Apesar de não atuar diretamente sobre mTOR, AKT é capaz de induzir a fosforilação e conseqüente inativação da proteína TSC2 em resposta à insulina (MANNING, 2004). O heterodímero formado entre TSC1 e TSC2 tem a capacidade de inativar o complexo mTORC1 através do controle de atividade da proteína Rheb, uma pequena proteína G capaz de induzir um aumento da atividade de mTOR (GARIMI *et al.* 2003; INOKI *et al.*, 2003).

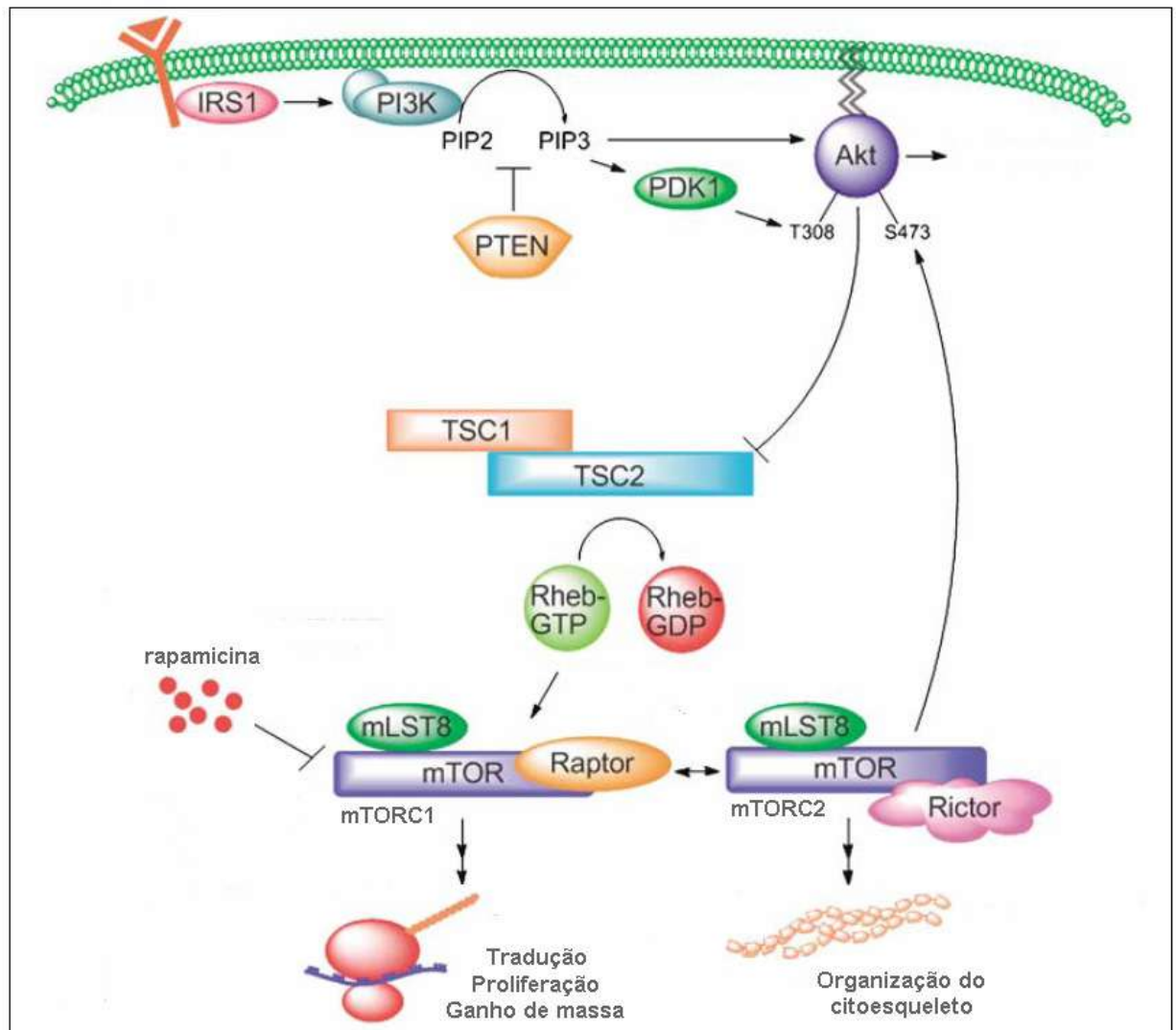
A proteína TSC2 atua na hidrólise de GTP associado à proteína Rheb e o aumento de sua atividade é relacionado à inibição de atividade de mTOR (TEE *et al.*, 2003).

Apesar de inúmeros estudos apontarem que AKT pode interromper o efeito inibitório que o complexo TSC1/TSC2 exerce sobre mTOR, o mecanismo por trás desta inativação ainda não é bem claro. Alguns estudos sugerem que a fosforilação de TSC2 interrompe a formação do heterodímero e acelera a degradação de TSC1 e TSC2 (INOKI *et al.*, 2002; POTTER *et al.*, 2002). Contudo, outros estudos não apóiam este modelo (DAN *et al.*, 2002; MANNING *et al.*, 2002). Além disso, ainda não é possível afirmar que a fosforilação de TSC2 por AKT é suficiente para ativar completamente a proteína mTOR. Isso porque a

atividade de mTOR diminui consideravelmente em células deficientes para AKT1 e AKT2, sem que a fosforilação de TSC2 seja substancialmente diminuída (PENG *et al.*, 2003).

Outra maneira de se regular a atividade de mTOR ocorre através da sua interação com ácido fosfatídico (PA – *Phosphatidic Acid*). Em resposta a estímulos para a proliferação, os níveis endógenos de ácido fosfatídico aumentam em consequência da atividade acentuada da fosfolipase D (PLD). O ácido fosfatídico se liga ao domínio FRB de mTOR aumentando sua ativação (FANG *et al.*, 2001).

Ao ser purificada por cromatografia de filtração em gel foi possível constatar que a proteína mTOR é encontrada normalmente em complexos de 1,5-2 MDa (KIM *et al.*, 2002; BADER & VOGT, 2004). Estes complexos, conhecidos como mTORC1 e mTORC2 apresentam características bem distintas (CORRADETTI & GUAN, 2006). O complexo mTORC1 é formado pela união de três proteínas (mTOR, Raptor e mLST8). No complexo mTORC2 a proteína Raptor é substituída pela proteína Rictor. Enquanto a atividade do complexo mTORC2 está relacionada ao controle de dinâmica do citoesqueleto de actina, o complexo mTORC1 está relacionado ao controle de síntese de proteínas e crescimento celular em resposta à estímulos externos. Além disso, a atividade do complexo mTORC2 parece não ser afetada pela rapamicina (KIM *et al.*, 2003; SARBASSOV *et al.*, 2004), enquanto o complexo mTORC1 é reconhecidamente afetado pela ação desta droga (BROWN *et al.*, 1994; CHIU *et al.*, 1994; SABATINI *et al.*, 1994; SABERS *et al.*, 1995). Vale ressaltar também que o complexo mTORC2 foi recentemente identificado como responsável pela fosforilação de AKT no resíduo de serina 473 (SARBASSOV *et al.*, 2005). A figura 5 ilustra a sinalização envolvida no controle de atividade de mTOR.



**Figura 5.** Representação esquemática do controle de ativação da proteína mTOR (modificado de Corradetti & Guan, 2006).

Os alvos mais estudados da proteína mTOR incluem componentes da maquinaria de iniciação da tradução, mais precisamente proteínas envolvidas no recrutamento do ribossomo para o RNAm. O controle da tradução de proteínas ocorre principalmente no momento em que o ribossomo é recrutado para a extremidade 5' do RNAm e posicionado no códon de início da tradução (GINGRAS *et al.*, 1999). Este recrutamento é facilitado pela ligação de fatores de tradução específicos à extremidade 5' do transcrito ou por sequências IRES (*Internal Ribosome Entry Sites* ou sítios internos de entrada do ribossomo) nos RNAm, que promovem o recrutamento do ribossomo independente do reconhecimento da extremidade 5'. A extremidade 5' de todos os RNAm transcritos no núcleo da célula possui uma estrutura conhecida como cap. Este cap, nada mais é do que um nucleosídeo modificado (7-metil guanosina), e está envolvido no transporte e na estabilidade dos RNAm. Além destas funções, o cap tem papel fundamental na tradução dos RNAm uma vez que o recrutamento na subunidade ribossomal 40S requer a ligação de fatores de tradução auxiliares que permitam a aproximação do transcrito e da maquinaria de início da tradução. O cap da extremidade 5' é reconhecido por um fator de tradução conhecido como eIF4E. Esta proteína é capaz de se ligar a outros dois fatores de tradução: eIF4G e eIF4A. A proteína eIF4G é capaz de se ligar à subunidade ribossomal 40S, por intermédio da ligação com eIF3. Além disso, também é capaz de se ligar a eIF4E permitindo a aproximação do RNAm e da subunidade ribossomal. A proteína eIF4A, por sua vez, tem atividade de helicase e é responsável pelo desenrolamento da região 5'UTR, que precede o códon de início da tradução. Em conjunto, estes fatores de tradução formam o complexo eIF4F que juntamente com outros fatores de início da tradução permitem que a informação contida no RNAm seja transformada num polipeptídeo (GINGRAS *et al.*, 1999; HERSHEY & MERRICK, 2000; RAUGHT *et al.*, 2000).

A interação entre eIF4E e eIF4G é regulada por membros da família 4EBP. Esta proteína compete com eIF4G pelo mesmo sítio de ligação à eIF4E de maneira que a ligação

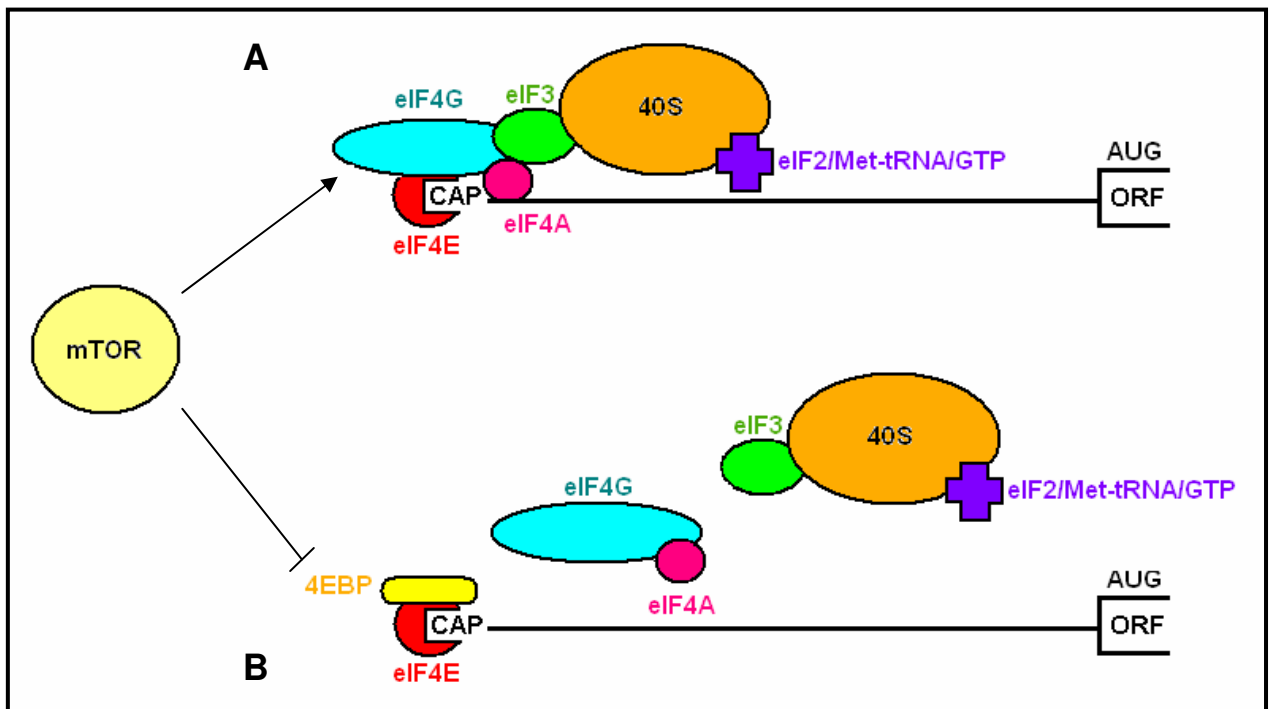


de uma impede automaticamente que a outra se ligue (HAGHIGHAT *et al.*, 1995; MADER *et al.*, 1995).

Enquanto a forma hipofosforilada de 4EBP se liga com alta afinidade à proteína eIF4E, sua forma hiperfosforilada previne esta interação. A proteína 4EBP1 apresenta sete sítios passíveis de fosforilação. Nestes sítios a fosforilação ocorre de maneira hierárquica e a liberação completa de eIF4E só ocorre após a fosforilação do último resíduo disponível, uma serina localizada na posição 65 (GINGRAS *et al.*, 2001; HAY & SONENBERG, 2004).

Várias evidências apontam o papel da proteína mTOR na fosforilação de 4EBP. Estas incluem o fato desta proteína ser defosforilada em resposta à privação de aminoácidos, juntamente com efeitos relacionados à atividade de mTORC1; o aumento de sua fosforilação após a indução de ativação de Rheb; a inibição de fosforilação após a superexpressão do complexo TSC1/TSC2 e sua diminuição de fosforilação em células onde a atividade de mTOR foi inibida (WANG *et al.*, 2005). Assim, mTOR é capaz de controlar a síntese de proteínas ao induzir a fosforilação de 4EBP e promover a liberação do fator de início de tradução eIF4E.

Além de 4EBP, mTOR parece estar relacionado à indução de fosforilação de outro fator de tradução, eIF4G. A inibição da atividade de mTOR por ação da rapamicina promove uma rápida defosforilação da proteína eIF4G (RAUGHT *et al.*, 2000). Recentemente foi demonstrado que a insulina induz a associação de eIF4G e eIF3. Esta associação, contudo, é interrompida por ação da rapamicina (HARRIS *et al.*, 2006). A figura 6 ilustra o funcionamento do complexo eIF4F e o papel de mTOR no controle de tradução.



**Figura 6.** Montagem do complexo de início da tradução na extremidade 5' do RNAm. (A) eIF4E, componente do complexo eIF4F, liga-se ao cap do transcrito. eIF4G liga-se à eIF3 que é capaz de recrutar a subunidade ribossomal 40S juntamente com o complexo ternário (eIF2, Met-RNAt, GTP) e dar início a tradução. (B) A proteína 4EBP liga-se à eIF4E e previne sua interação com eIF4G. Essa ligação impede que o complexo eIF4F seja formado. A proteína mTOR é capaz de controlar a tradução por induzir a fosforilação de 4EBP e promover seu desligamento de eIF4E e por induzir a fosforilação de eIF4G (modificado de HAY & SONENBERG, 2004).

A superexpressão de vários componentes do complexo eIF4F vem sendo relacionada à eventos de transformação celular. O RNAm que codifica para a proteína eIF4A encontra-se normalmente em altos níveis em alguns tipos de tumores e células tumorais (EBERLE *et al.*, 1997; SHUDA *et al.*, 2000). A expressão artificial de eIF4G1 em fibroblastos murinos da linhagem NIH3T3 induzem o seu crescimento independente de ancoragem e indução de tumores em camundongos atímicos (FUKUCHI-SHIMOGORI *et al.*, 1997). O aumento da expressão de eIF4E pode induzir transformação celular *in vitro* e *in vivo* (LAZARIS-KARATZAS *et al.*, 1990; RUGGERO *et al.*, 2004; WENDEL *et al.*, 2004). Além disso, a proteína eIF4E desempenha um papel fundamental na tradução de RNAm com a região 5' UTR longa e com alto grau de estrutura secundária. A tradução destes RNAm é feita de maneira deficiente uma vez que a baixa quantidade de eIF4E cria uma situação de competição entre este tipo de RNAm e àqueles com a 5' UTR mais curta. Isso é especialmente interessante uma vez que a maioria dos RNAm com a 5' UTR longa codifica para fatores reguladores do ciclo celular, fatores de crescimento e seus receptores e diversas oncoproteínas (De BENEDETTI & HARRIS, 1999). Assim, a superexpressão de eIF4E pode levar a expressão inapropriada de reguladores do ciclo celular fazendo com que essas células apresentem eventos mitóticos aberrantes. A instabilidade genética gerada por esses eventos pode levar à transformação maligna (De BENEDETTI & HARRIS, 1999). De fato, a superexpressão de eIF4E tem sido observada em diversas neoplasias tais como, as de bexiga (CREW *et al.*, 2000), mama (KEREKATTE *et al.*, 1995), cólon (ROSENWALD *et al.*, 1999), próstata (WILLIAMS *et al.*, 1998), cabeça e pescoço (NATHAN *et al.*, 1997) e de colo uterino (MATTHEUS-GREER *et al.*, 2005; TURBAT-HERRERA *et al.*, 1999).

### 3. AS ONCOPROTEÍNAS E6 E E7 E A VIA DE mTOR

Ao contrário dos HPV de baixo risco, que apresentam promotores específicos independentes para transcrição de E6 e E7 (SMOTKIN, PROKOPH & WETTSTEIN, 1989) os HPV de alto risco induzem a transcrição destes genes a partir de um único promotor. Esta transcrição normalmente produz um RNAm bicistrônico que contém a informação necessária para a tradução de E6 e E7. Esta tradução normalmente ocorre através de um mecanismo de *leaky scanning*, onde a porção do RNAm que codifica a proteína E7 só será traduzida quando o ribossomo falhar em encontrar o códon de início da porção que codifica a proteína E6. Além disso, a tradução do RNAm viral é dependente do reconhecimento do cap deste transcrito pelo fator de início da tradução eIF4E, componente do complexo eIF4F (STACEY *et al.*, 2000). A superexpressão de eIF4E é normalmente observada em amostras de tumores do colo uterino (MATTHEUS-GREER *et al.*, 2005; TURBAT-HERRERA *et al.*, 1999). Mais recentemente, Oh e colaboradores (2006) demonstraram que a desregulação de eIF4E e 4EBP1, em células diferenciadas contendo o genoma do HPV-16, induzia um aumento da expressão da oncoproteína viral E7. Além disso, este aumento podia ser atenuado pelo tratamento destas células com rapamicina. Esses achados indicam não só que o HPV depende da maquinaria de tradução celular para promover a tradução de suas proteínas, mas também que o vírus pode induzir alterações que levam a ativação da proteína mTOR. Estas alterações podem ser induzidas tanto pela proteína E6, quanto pela proteína E7. Em 2004, Lu e colaboradores demonstraram que E6 é capaz de induzir a degradação da proteína TSC-2, um dos reguladores negativos da atividade de mTOR. Além disso, E6 é capaz de induzir a degradação de membros da família PDZ, incluindo MAGI 1,2 e 3 (MAGUK). A interação destas proteínas com PTEN favorece sua atividade e aumenta a capacidade desta fosfatase de inibir a proliferação e a invasão através da inativação de AKT (WU *et al.*, 2000).

A manutenção da fosforilação de AKT também é atribuída a PP2A. Esta fosfatase, é capaz de se ligar à AKT e induzir sua defosforilação (ANDJELKOVIC *et al.*, 1996). Recentemente, Pim e colaboradores (2005) demonstraram que E7 de HPV-16 é capaz de se ligar às duas subunidades de PP2A (catalítica e estrutural) impedindo que esta proteína seja capaz de se ligar à AKT. Menges e colaboradores (2006) também demonstraram que E7 é capaz de aumentar a atividade de AKT através da sua capacidade de induzir a degradação da proteína pRb.

Além disso, a ativação da via de PI3K/AKT em resposta à ligação de fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF-1) pode ser inibida por IGFBP-3. Esta proteína, que controla o nível de resposta à estímulos extracelulares, foi descrita como alvo da oncoproteína E7 por Mannhardt e colaboradores (2000).

Alguns trabalhos também apontam que a ativação do gene p53 é capaz de inibir a atividade de mTOR (HORTON *et al.*, 2002). Em resposta ao estresse genotóxico, incluindo dano ao DNA, hipóxia e ativação de oncogenes, p53 é capaz de desencadear a fosforilação de TSC-2 e inibir a atividade de mTOR (FENG *et al.*, 2005; LEVINE *et al.*, 2006). Além disso, foi demonstrado que o gene p53 e o gene p21<sup>cip</sup> podem influenciar a sensibilidade de células à rapamicina. A deleção isolada de ambas está relacionada a indução de apoptose após o tratamento com esta droga (HUANG *et al.*, 2001). Assim, o fato da oncoproteína E6 de HPV ser capaz de induzir a degradação de p53 pode permitir não só que a via de mTOR permaneça ativada, mas também pode conferir maior sensibilidade das células que a expressam à ação citotóxica da rapamicina. Vale ressaltar que a proteína p21 também é inativada pela expressão de E7.

A compreensão de como E6 e E7 interferem na alteração da via de sinalização que controla a atividade da proteína mTOR pode fornecer importantes contribuições para avaliar o efeito da rapamicina em células e tecidos que expressam estas oncoproteínas virais.

#### **4. CULTURAS ORGANOTÍPICAS DE QUERATINÓCITOS PRIMÁRIOS HUMANOS**

O modelo de cultura organotípica de queratinócitos é um sistema que permite que estas células sejam capazes de gerar um epitélio escamoso estratificado com arquitetura muito semelhante àquela observada em tecidos provenientes de espécimes biológicos. Este modelo é considerado uma importante ferramenta de estudo para compreensão dos fenômenos biológicos porque é capaz de mimetizar não só as propriedades morfológicas do tecido, mas também suas propriedades bioquímicas (CHOW & BROKER, 1997). Além da geração de tecidos epiteliais com características semelhantes ao epitélio normal, este sistema permite que a geração de epitélios com alterações compatíveis àquelas observadas em neoplasias epiteliais de vários graus histológicos.

Muitos tipos de vírus, incluindo o HPV, utilizam o epitélio humano como sítio primário de infecção e replicação. As características tridimensionais das culturas organotípicas permitem estudar o efeito das infecções virais de maneira temporal e espacial. Mais importante ainda é o fato destas culturas reproduzirem o programa de diferenciação de maneira fidedigna. Essa característica torna este sistema único e primordial para a compreensão da biologia do HPV no contexto mais próximo ao do epitélio normal.

Para melhor compreensão dos fenômenos envolvidos na patogênese induzida por HPV, a maioria das culturas organotípicas geradas para o estudo da biologia do vírus e de suas doenças associadas utilizam queratinócitos provenientes da região ano-genital. Inúmeros estudos apontam a importância de se estudar as alterações induzidas pela expressão de genes virais neste modelo de cultura. Estes estudos contribuíram de maneira significativa para a compreensão dos fenômenos induzidos pela infecção por HPV (HALBERT *et al.*, 1994; CHEN *et al.*, 1995; DEMERS *et al.*, 1996; FRATTINI *et al.*, 1996; NOYA *et al.*, 2001; BOCCARDO *et al.*, 2004).

## **OBJETIVOS**

### **1. OBJETIVO GERAL**

O presente trabalho teve como principal objetivo avaliar o efeito da rapamicina em culturas organotípicas de queratinócitos primários humanos após a sua infecção com vetores retrovirais contendo os oncogenes E6 e E7 de HPV-16.

### **2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ❖ Avaliar se o potencial antiproliferativo da rapamicina poderia ser afetado pela expressão dos oncogenes E6 e/ou E7.
- ❖ Avaliar se a expressão de E6 e/ou E7 poderia influenciar a atividade de alvos efetores de mTOR antes e após o tratamento com rapamicina.
- ❖ Avaliar se a degradação de p53 ou inativação da proteína p21, induzida por E6 e E7 respectivamente, poderia sensibilizar estas células à apoptose após o tratamento com rapamicina.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. VETORES RETROVIRAIS

Para expressão dos oncogenes E6 e/ou E7 de HPV-16 em queratinócitos primários humanos foram utilizados vetores retrovirais gentilmente cedidos pela Dra. Denise A. Galloway (*Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, USA*). Também foram utilizados vetores onde as seqüências de E6 e E7 apresentam mutações que afetam algumas de suas principais atividades. Todas as construções utilizadas estão devidamente caracterizadas (HALBERT *et al.*, 1992; FOSTER *et al.*, 1994; DEMERS *et al.*, 1996; HELT & GALLOWAY, 2001) e suas principais características são descritas na tabela 1. Os oncogenes virais de HPV-16 foram clonados no vetor pLXSN (No. de acesso M28248, GeneBank), sob controle do promotor viral presente na LTR (*Long Terminal Repeat*) retroviral. O gene que confere resistência à neomicina nesse vetor tem sua expressão controlada pelo promotor de SV40.

**Tabela 1.** Descrição dos vetores retrovirais utilizados para infecção de QPH.

Inserto	Principal característica
E6E7 <sup>♦</sup>	Capacidade de se ligar e degradar as proteína p53 e pRb Induz proliferação mesmo na presença de sinais de parada do ciclo celular
E6 <sup>♦</sup>	Capacidade de degradar a proteína p53
E7 <sup>♦</sup>	Capacidade de degradar a proteína pRb Induz proliferação mesmo em resposta à sinais de parada do ciclo celular
E6 Δ9-13 <sup>♣</sup>	Incapacidade de se ligar e degradar a proteína p53
E7 E26G <sup>≈</sup>	Incapacidade de se ligar e degradar a proteína pRb
E7 CVQ68-70AAA <sup>∞</sup>	Capacidade de degradar a proteína pRb Não induz proliferação na presença de sinais de parada do ciclo celular

♦ genes selvagens.

♣ a proteína E6 apresenta uma deleção dos aminoácidos 9-13.

≈ a proteína E7 apresenta uma substituição de um ácido glutâmico (E) por uma glicina (G) na posição 26.

∞ a proteína E7 apresenta substituições dos aminoácidos 68-70 (cisteína, valina e glutamina) por três alaninas.



Para a clonagem dos vetores recombinantes foram utilizadas bactérias *E.coli* da linhagem JM109 (*recA1*, *supE44*, *endA1*, *hsdR17*, *gyrA96*, *relA1*, *tHIA*, *lac-proAB*) tornadas termocompetentes conforme protocolo padronizado por Inoue e colaboradores (1990).

Para termotransfecção as bactérias competentes foram descongeladas a temperatura ambiente. Aproximadamente 100 µl destas bactérias foram adicionadas ao DNA plasmidial dos vetores recombinantes. Esta mistura foi mantida em gelo por 30 minutos. Para transformação a mistura foi incubada a 42°C por 2 minutos seguida de incubação em gelo por 1 minuto. Após esta etapa foi adicionado 1ml de meio L.B. (*Luria Bertani*- 1g triptona, 0,5g extrato de levedura, 1,0g NaCl, para 50ml de água destilada e deionizada). A mistura foi incubada por 1 hora a 37°C, sob suave agitação. Após este período, 200µl deste crescido foram plaqueados em meio L.B.-ágar 1,5% contendo ampicilina (50µg/ml) a 37°C, por aproximadamente 15 horas. Os plasmídeos foram purificados utilizando o kit Wisard™ Minipreps DNA Purification System (*Promega*). A presença dos genes E6 e/ou E7 foi avaliada através de PCR utilizando iniciadores específicos. Finalmente, as células foram armazenadas a -70°C em meio LB contendo 10% de glicerol.

## **2. CLONAGEM EM LARGA ESCALA E EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL**

A clonagem em larga escala foi utilizada para obtenção de grandes quantidades de DNA plasmidial dos vetores retrovirais de interesse. O protocolo, também conhecido como Maxi-preparação, foi realizado conforme descrito por Sambrook & Russel (2001). Primeiramente, as bactérias contendo o plasmídeo de interesse foram semeadas, pela técnica de esgotamento, em placas de L.B.-ágar 1,5% contendo ampicilina na concentração de 50 µg/ml. As placas permaneceram em estufa a 37°C por 16 horas para permitir o crescimento de colônias visíveis a olho-nu. Após este período uma colônia referente a cada vetor

recombinante foi inoculada em 30ml de meio de cultura TB (*Terrific Broth* -12 g de triptona, 24 g de extrato de levedura, 4ml de glicerol 89%, 100ml de solução  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,17 M e  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,72 M para 1 litro de solução) contendo 50 $\mu\text{g/ml}$  de ampicilina. Este inóculo permaneceu a 37°C sob agitação (240 rpm) até que a D.O.<sub>600</sub> estivesse por volta de 0,6. Nesse momento, o inóculo gerado foi adicionado a 500ml de meio de cultura TB contendo 50 $\mu\text{g/ml}$  de ampicilina. Esta solução foi incubada por 16h a 37°C sob agitação de 240 rpm. Após este período, a cultura gerada foi centrifugada a 3.000 rpm, por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em 200ml de STE gelado (Tris-HCl 10 mM, pH=8; NaCl 0,1 M, EDTA 1 mM). Após nova centrifugação nas mesmas condições mencionadas acima o precipitado gerado foi ressuspensionado em 18ml de solução de ressuspensão (glicose 50 mM, Tris-HCl 25 mM, pH=8, EDTA 10 mM). Em seguida foram adicionados 2ml de lisozima (10mg/ml) e 20ml de solução de lise (NaOH 0,2N, SDS 1%). Após a mistura por inversão, esta solução foi incubada a temperatura ambiente por 7 minutos. Foram, então, adicionados 20ml de solução de neutralização (acetato de potássio 3 M, 11,5ml de ácido acético glacial para 100ml de solução) e, após mistura por inversão e incubação em gelo por 10 minutos, houve uma centrifugação a 5.000 rpm por 40 minutos, a 4°C. O sobrenadante obtido foi vertido em uma proveta onde seguiu-se adição de isopropanol (0,6 vezes do volume obtido). Esta solução foi homogeneizada e incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. Após esta etapa, foi realizada uma centrifugação a 5.000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 70%. Após sua secagem o mesmo foi ressuspensionado em 3ml de tampão TE (Tris HCl 10mM, EDTA 1mM) 1X, pH=8. Todo o procedimento descrito acima foi realizado em uma centrífuga *Sorvall*<sup>®</sup> RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge em rotor *Sorvall*<sup>®</sup> H1000B.

### 3. PURIFICAÇÃO POR GRADIENTE DE CLORETO DE CÉSIO

O DNA plasmidial obtido após a clonagem em larga escala foi purificado por gradiente contínuo de cloreto de cézio formado a partir de ultracentrifugação. O protocolo foi realizado conforme descrito por Sambrook & Russel (2001). Nesta etapa, o produto obtido após a clonagem em larga escala foi pesado e à cada grama de solução obtida foi adicionado 1,01g de CsCl sólido (*Invitrogen*). Para facilitar a dissolução do sal, a solução foi incubada a 37°C. Após esta etapa foram adicionados 100 µl de brometo de etídio, na concentração de 10 mg/ml, para cada 5g de solução de DNA original. Seguiu-se então a centrifugação da preparação em centrífuga *Sorvall® RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge* (rotor *Sorvall® H1000B*), a 3.000 rpm, por 5 minutos a temperatura ambiente. Com auxílio de uma seringa descartável, a solução foi transferida para um tubo de ultracentrifugação (*Ultra Clear™ Tubes*, 16 x 76 mm, *Beckman*). Os tubos foram preenchidos até aproximadamente 3 cm da borda com solução de 1,01 g de CsCl por ml de tampão T.E. (pH=8). O restante do tubo foi preenchido com óleo mineral (*Nujol*). Os tubos foram então lacrados e submetidos à ultracentrifugação a 45000 rpm a 20°C por 48 horas em ultracentrífuga *Beckman L8-M* (rotor 50Ti). Após esse período, em uma sala com pouca luz, a banda referente ao DNA dupla fita circular plasmidial foi removida utilizando-se uma agulha de 19G conectada a uma seringa de 5ml de capacidade. A solução contendo o DNA de interesse foi transferida para um tubo de polipropileno. O brometo de etídio foi removido por sucessivos ciclos de adição de 1-butanol saturado, agitação, centrifugação a 3.000 rpm por 3 minutos e retirada da fase orgânica, até que a solução contendo o DNA estivesse completamente transparente.

A remoção do cloreto de cézio da solução de DNA foi feita através de diálise em TE 1X por 20h. Após esta etapa o DNA foi precipitado com 2,5 volumes de etanol 100% e 0,1 volume de acetato de sódio 3M e o precipitado gerado foi ressuspensionado em 2ml de água destilada e deionizada.

#### 4. GERAÇÃO DE PARTÍCULAS RETROVIRAIS

Os vetores retrovirais purificados foram transfectados na linhagem celular ecotrófica BOSC-23 (ATCC CRL-270) por eletroporação. Para isso foram utilizados 15µg de vetor e 50µg de DNA de esperma de salmão como carregador. Ambos foram colocados em uma cubeta de eletroporação (4mm de distância entre os eletrodos - BioRad) juntamente com 2,5µl de BES (ácido N, N-bis[2-hidroxietil]-2-aminoetanosulfônico) 0,5M, pH 7,2. Finalmente foram acrescentadas  $5 \times 10^6$  células/cubeta em um volume de 250µl de meio DMEM com 10% de soro fetal bovino (SFB) – D10. A eletroporação foi realizada a 170V e 960µF (a constante de tempo  $\tau$  do circuito Resistência/Capacitância deve ficar entre 40-50 msec) em um eletroporador (BioRad). Em seguida, as células foram transferidas para placas de Petri de 100mm com 7ml de meio de cultura D10 e incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Quatro horas depois, o meio de cultura foi aspirado e substituído por 5ml de meio fresco, dessa maneira é possível concentrar as partículas retrovirais que começam a ser produzidas aproximadamente 24h depois. Após este período, o sobrenadante desta cultura foi utilizado para infecção da linhagem anfotrófica Am-12 (MARKOWITZ *et al.*, 1988). Para isso o meio das células BOSC-23 foi aspirado com uma seringa de 5ml e, utilizando um filtro de 0,45µm, gotejado sobre as células Am-12. Para impedir que as partículas retrovirais se agreguem e dificultem a infecção destas células foi utilizado polibreno (*Sigma-Aldrich*) na concentração final de 10µg/ml. Após 6 horas de contato com o sobrenadante produzido pelas BOSC-23 foi adicionado a cada uma das placas mais 5ml de meio de cultivo. Em torno de 24 horas após a infecção deu-se início a seleção com geneticina (*Invitrogen*) na concentração final de 600 µg/ml. Após uma semana de seleção com geneticina, foi possível observar a formação de colônias que foram expandidas para utilização desta linhagem como fonte produtora de partículas retrovirais.

## 5. TITULAÇÃO DAS PARTÍCULAS RETROVIRAIS

A geração de partículas virais difere consideravelmente entre os vários tipos de linhagens produtoras. Para que a infecção não provoque citotoxicidade, por número elevado de partículas, ou leve a uma infecção deficiente, por número reduzido de partículas, é necessário determinar o título viral. Além de identificar se a linhagem produtora é capaz de montar partículas infectantes, a titulação permite a determinação do número máximo de células que pode ser infectada por um determinado volume de meio.

Para determinação do título viral produzido pelas células Am-12 foi utilizado o protocolo nº. PT3132-1 versão nº. PR43789 (*Clontech*). Neste protocolo, o sobrenadante das linhagens produtoras de partículas retrovirais (Am-12) é utilizado para infecção de células da linhagem celular NIH3T3 (ATCC CRL 1658™). Resumidamente, o sobrenadante das Am-12 infectadas foi concentrado em 5ml de meio de cultura por um período de 48 horas. Após este período o mesmo foi fracionado em diferentes diluições utilizadas para infectar células NIH3T3. O meio utilizado nas diluições foi o mesmo utilizado para o cultivo de Am-12, ou seja, D10. Contudo, a este meio foi acrescentado 10µg/ml de polibreno (*Sigma-Aldrich*). A infecção se deu por gotejamento do meio de cultivo, contendo partículas retrovirais diluídas em série, diretamente sobre as células NIH3T3 aderidas em placas de 6 poços. A seleção iniciou-se 24 horas após a infecção. Nesta etapa as células foram cultivadas por sete dias em meio contendo 600µg/ml de geneticina (*Invitrogen*). Após este período, as células foram fixadas com formol tamponado 10% e coradas com hematoxilina de Harris. A partir do número de colônias obtidas foi possível calcular a MOI (*Multiplicity Of Infection*). Para calcular a MOI utiliza-se o número de colônias obtidas na diluição mais alta dividido pelo número inicial de células que se deseja infectar. Assim, ao utilizarmos uma MOI de 10, teremos no sobrenadante de infecção dez partículas retrovirais para cada célula que se deseja infectar.

## 6. INFECCÃO DE QUERATINÓCITOS PRIMÁRIOS HUMANOS (QPH)

Para a infecção de queratinócitos primários humanos, derivados de prepúcio de recém nascidos (*Clonetics*), foram utilizadas partículas retrovirais empacotadas pela linhagem Am-12, previamente selecionada e tituladas. Os QPH foram semeados em placas de 60mm de diâmetro numa densidade de  $10^5$  células/placa. Após 48 horas de cultivo das células Am-12 em 5ml de meio, o sobrenadante contendo partículas retrovirais infecciosas foi gotejado sobre os QPH semeados no dia anterior utilizando-se um MOI=10. Para aumentar a eficiência de infecção foi utilizado polibreno (*Sigma-Aldrich*) na concentração de 10µg/ml. Após 45 minutos foi adicionado à cultura 5ml de meio de cultivo de queratinócitos (KSFM-*Keratinocytes Serum Free Media*) (*Invitrogen*) suplementado com EGF recombinante e extrato de pituitária bovina (*Invitrogen*). Este passo é importante para minimizar o efeito do soro fetal bovino sobre estas células uma vez que, o cálcio presente no mesmo, induz a diferenciação e a parada de proliferação dos queratinócitos. Quatro horas após a infecção, o meio contendo as partículas retrovirais foi completamente substituído por KSFM fresco. Dois dias depois o meio foi aspirado e os queratinócitos foram selecionados em meio de cultivo contendo 250µg/ml de geneticina (*Invitrogen*) por 48 horas. Finalmente, o meio foi substituído por KSFM fresco para expansão das células infectadas.

## 7. CULTURAS ORGANOTÍPICAS

### 7.1. Geração

A geração de uma cultura organotípica de queratinócitos envolve necessariamente a criação de uma matriz que propicie não só uma base para a adesão das células, mas também uma estrutura que reproduza as condições encontradas na derme. Essa matriz é conhecida como equivalente dérmico e é composta basicamente de colágeno, fibroblastos e suplementos. Mais precisamente, o equivalente dérmico para geração de uma cultura organotípica é composto de 80% de colágeno tipo I de cauda de rato (*BD Bioscience*), 10% de meio Ham's F12 10x (*Invitrogen*) e 10% do volume de *Reconstitution Buffer* –RB 10x (2,2% NaHCO<sub>3</sub>, NaOH 0,05 M, HEPES 200mM). Além disso, são utilizadas como células *feeders*, fibroblastos de camundongo derivados de NIH3T3, denominadas células J2 (CHOW & BROKER, 1997). Para constituição do equivalente dérmico estas células foram previamente cultivadas em meio DMEM contendo 10% de soro fetal bovino até atingirem 60%-70% de confluência. Após esta etapa, as células foram tripsinizadas e contadas. Para cada 1ml de equivalente dérmico são utilizadas  $1,3 \times 10^5$  células J2 ressuspendidas em soro fetal bovino (5% do volume final de equivalente dérmico). Após a mistura por inversão de todos os componentes, com o cuidado de evitar a formação de bolhas, o equivalente dérmico foi distribuído em uma placa de 24 poços na quantidade de 0,75ml/poço.

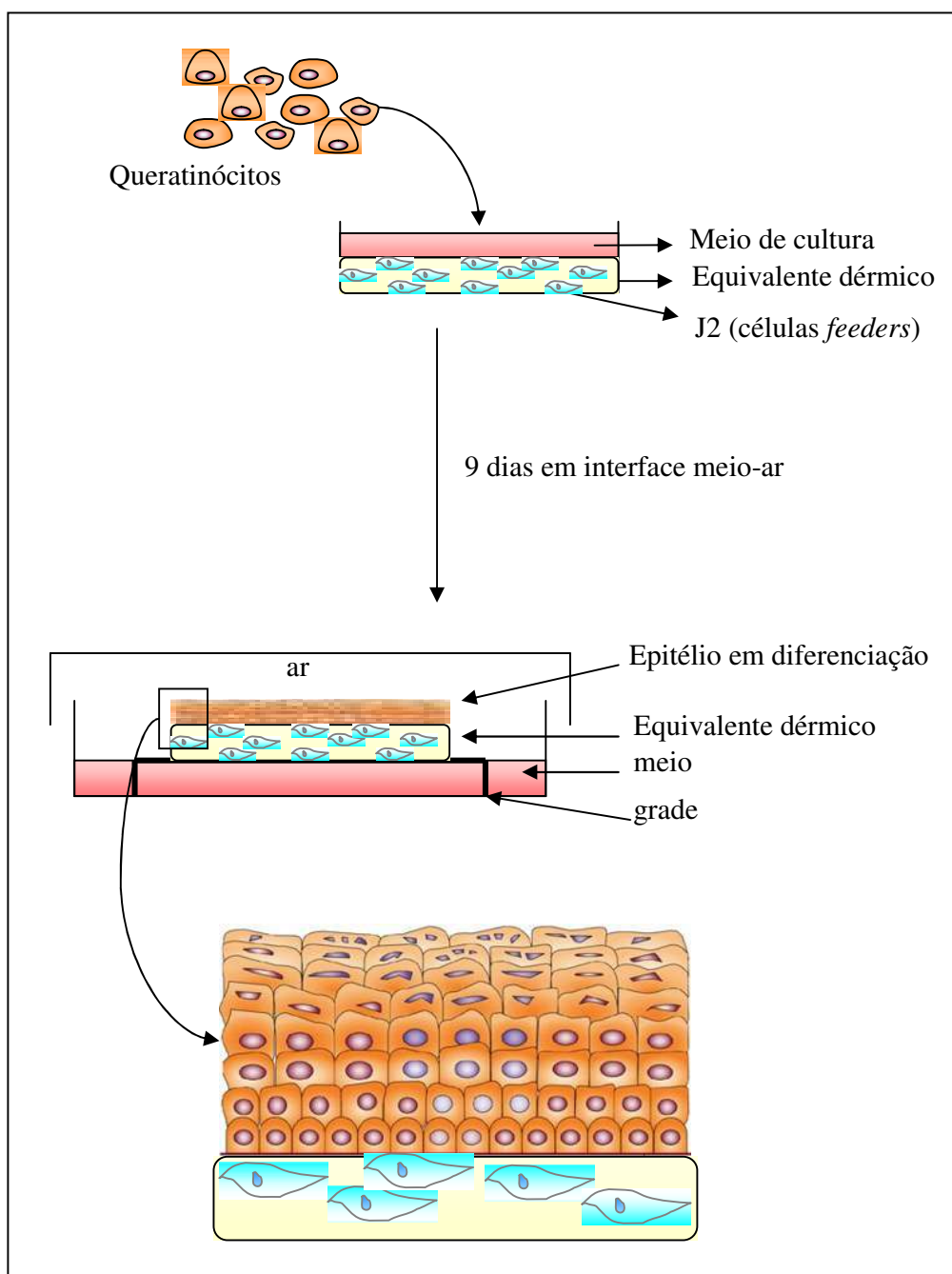
Após a solidificação, a temperatura ambiente por 40 minutos, foi adicionado à cada poço 1ml de meio para cultura organotípica (67,5% DMEM, 22,5% F12, 10% SFB, 5µg/ml de Insulina, 5µg/ml de apotransferrina, 0,1nM de toxina colérica, 0,4µg/ml de hidrocortizona, 0,5ng/ml de EGF). A placa foi mantida a 37°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, até a adição dos queratinócitos primários humanos.

Os queratinócitos primários humanos, infectados ou não, foram cultivados como descrito anteriormente em placas de 60mm. Ao atingirem uma confluência de 80-90%, estas células foram tripsinizadas, contadas e ressuspensas em KSFM. Em seguida foram semeados sobre o equivalente dérmico em uma densidade de  $2 \times 10^5$  células/poço em 0,5ml de KSFM. Logo após, foi adicionado 0,5ml de meio para cultura organotípica a cada poço e a placa foi colocada a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>. No dia seguinte, o meio foi substituído por 1ml de meio para cultura organotípica fresco e a matriz de colágeno de cada poço foi descolada da placa utilizando-se uma espátula. Após oito horas cada matriz de colágeno, com a superfície coberta por queratinócitos, foi transferida para uma grelha de aço colocada em uma placa de Petri de 60 mm. Posteriormente, foram adicionados 5ml de meio para cultura organotípica por placa e as mesmas foram mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. A cada 48 horas foi realizada uma troca de meio e, nove dias após a semeadura dos queratinócitos, as culturas foram interrompidas e processadas. A figura 7 resume as etapas necessárias para geração das culturas organotípicas.

## **7.2.Tratamentos**

O tratamento das culturas organotípicas com rapamicina (*Calbiochem*) foi realizado no sexto dia de diferenciação. Para isto, 100ng/ml desta droga foram adicionados ao meio de cultura. Ao controle negativo foi adicionado DMSO (2µl/ml), substância utilizada para dissolução da rapamicina. O tratamento foi finalizado no nono dia de diferenciação, aproximadamente 60 horas após o início do tratamento. Para avaliar o potencial antiproliferativo da rapamicina, as últimas 12 horas de tratamento com a droga foram realizados na presença de 100 µg/ml bromodeoxiuridina (BrdU, *GibcoBRL*), um análogo de nucleotídeo passível de reconhecimento por anticorpos específicos.





**Figura 7.** Esquema que representa a montagem das culturas organotípicas. Os queratinócitos foram semeados sobre o equivalente dérmico. No dia seguinte a cultura foi transferida para grade de aço, onde permaneceu por 9 dias em interface meio-ar. Durante este período ocorre a diferenciação dos queratinócitos de maneira semelhante ao que é observado em um epitélio estratificado escamoso.

### 7.3. Processamento

Para avaliação histológica, as culturas organotípicas obtidas após nove dias de cultivo em interface meio-ar, foram lavadas com PBS pH=7,4 e fixadas por 45 minutos em formol 10%. Após esta etapa as amostras foram submetidas à desidratação com banhos sucessivos de etanol 70%, 95% e 100% seguidas de diafanização em banhos de xilol e posterior inclusão em parafina. Os tecidos foram então seccionados em cortes de 4  $\mu$ m de espessura. Estes cortes foram dispostos em lâminas revestidas com silano (*Superfrost Plus, Erviegas Instrumental Cirúrgico Ltda*) que promove melhor aderência do tecido. A coloração com hematoxilina-eosina foi utilizada para avaliação morfológica geral do tecido (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983).

### 7.4. Imunohistoquímica

As secções obtidas a partir das culturas organotípicas foram desparafinizadas por incubação a 65°C durante 1 hora. Após esta etapa, as lâminas passaram pelo processo de desparafinização com banhos de xilol: o primeiro deles a 60°C, por 20 minutos, seguido de outro banho à temperatura ambiente por mais 20 minutos. Seguiu-se então a etapa de re-hidratação, onde as lâminas foram banhadas por 30 segundos em etanol 100%, 30 segundos em etanol 95% e 30 segundos em etanol 70%. Após esta etapa, as lâminas foram lavadas em água corrente e em água destilada. Para recuperação antigênica as lâminas foram mergulhadas em solução citrato de sódio 10mM pH=6,0 em ebulição. Esta etapa foi realizada em panela de pressão (*Eterna®, Nigro*). Após a adição das lâminas à solução de citrato, a panela foi tampada e quando esta atingiu a pressurização total foi iniciada a contagem de 4 minutos para completar a recuperação antigênica. A panela foi então resfriada sob água corrente por 10 minutos. Após a lavagem das lâminas em água corrente e destilada foi realizado o bloqueio da

peroxidase endógena. Nesta etapa foram realizados 4 banhos de 5 minutos cada com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%. As lâminas foram lavadas em água corrente e destilada e submetidas a uma lavagem com PBS 10mM, pH=7,4, por 5 minutos. Para identificação antigênica foram utilizados os anticorpos listados na tabela 2. Estes foram incubados em solução de PBS contendo 1% BSA (*Sigma Aldrich*) e 0,1% azida sódica (NaN<sub>3</sub>) por 18 horas a 4°C em câmara úmida. Após este período, as lâminas foram submetidas à 3 lavagens de 3 minutos cada com PBS. Seguiu-se então a incubação com anticorpo secundário biotilado (reagente C) do Kit StrepABComplex/HRP Duet (mouse/rabbit) (*Dako*) no título estabelecido 1:200 diluído em PBS por 30 minutos a 37°C. Após esta etapa foram realizadas 3 lavagens de 3 minutos cada com PBS seguidas de incubação das lâminas com o complexo (reagente A-streptavidina) e (reagente B-peroxidase biotilada) nos títulos pré-estabelecidos de 1:200, diluídos em PBS por 30 minutos à 37°C. Para revelação do sinal as lâminas foram incubadas em solução DAB (3,3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride) (*Sigma Aldrich*) por 5 minutos à 37°C, seguida da adição de corante hematoxilina de Harris (contra-coloração) por 1 minuto. Após a desidratação com banhos sucessivos em álcool absoluto e xilol as lâminas foram montadas utilizando a resina sintética Entelan (*Merck*).

**Tabela 2.** Lista de Anticorpos utilizados nas reações de imunohistoquímica.

<b>Anticorpo</b>	<b>Origem</b>	<b>Diluição</b>	<b>Comercializado por:</b>
Anti-BrdU	Camundongo	1/500	Zymed Laboratories Inc.
Anti-p53	Camundongo	1/400	Novocastra Inc.
Anti-pRb	Camundongo	1/500	Novocastra Inc.
Anti-AKT total	Coelho	1/800	Cell Signaling Technology
Anti-p-AKT (ser 473)	Coelho	1/100	Cell Signaling Technology
Anti-4EBP1 total	Coelho	1/400	Cell Signaling Technology
Anti-4EBP1 (ser 65)	Coelho	1/40	Cell Signaling Technology
Anti-p-eIF4G (ser 1188)	Coelho	1/500	Cell Signaling Technology
Anti-eIF4G total	Camundongo	1/200	Santa Cruz Biotechnology
Anti-eIF4E total	Coelho	1/200	Cell Signaling Technology
Anti-caspase 3 ativada	Coelho	1/1000	Cell Signaling Technology

## 8.CULTURA DE CÉLULAS EM MONOCAMADA

Além das culturas organotípicas de queratinócitos também foram analisadas culturas em monocamada deste tipo celular. Estas células foram infectadas com os vetores retrovirais contendo os oncogenes virais E6 e/ou E7 e suas formas mutantes. Além disso, como controle negativo, também foram gerados queratinócitos infectados com o vetor vazio pLXSN.

### 8.1. Incorporação de Timidina Tritiada

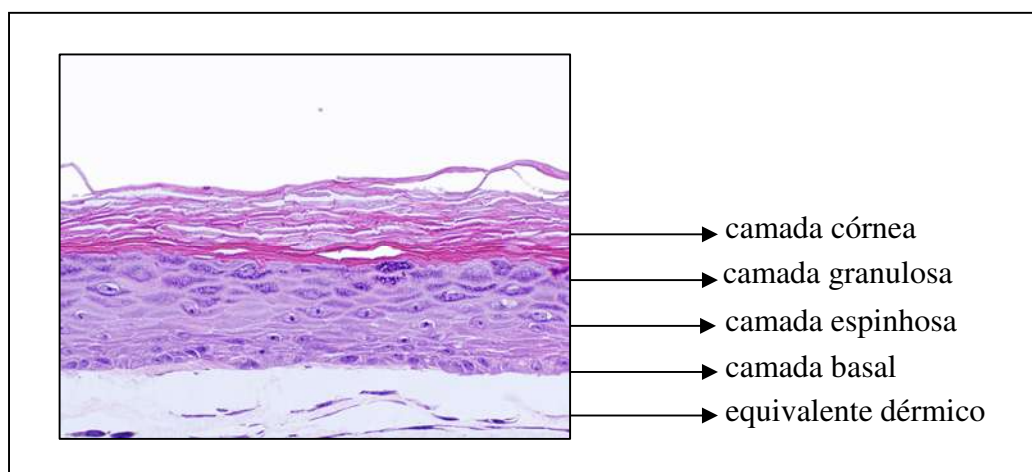
Para verificar o efeito da rapamicina na proliferação de queratinócitos normais e infectados cultivados em monocamada foram realizados experimentos de incorporação de timidina tritiada. Para isto os queratinócitos foram semeados em placas de 6 poços numa densidade de  $5 \times 10^5$  células/poço. Após 24 horas os mesmos foram tratados com rapamicina na concentração de 100ng/ml. Estas células permaneceram neste meio por 60 horas. Aos controles não tratados foi adicionado DMSO (2µl de DMSO/ml) uma vez que a rapamicina encontra-se diluída nesta substância. Para monitorar a síntese de DNA foi adicionado a cada poço 4µl de timidina tritiada na concentração 1 µCi/µl (*Amersham Pharmacia Biotech*) nas últimas 12 horas de cultivo celular. Após a lavagem das placas com PBS 1X pH=7,4 estas foram fixadas com etanol absoluto, a 4°C durante 15 a 20 minutos. As células foram então solubilizadas em 1ml de NaOH 0,5 N durante 2 a 3 minutos e neutralizadas com 0,962ml de HCl 0,5 N. Em seguida, 300 µl dessa solução foram acrescentados a 3ml de líquido de cintilação (*Sardi*) e a incorporação de radioatividade foi avaliada por cintilação líquida em um cintilador *Beckman LS 6800*. O resultado foi obtido através de contagens por minuto (CPM). Foram realizados, no mínimo, 3 experimentos independentes para cada tipo celular.

## RESULTADOS

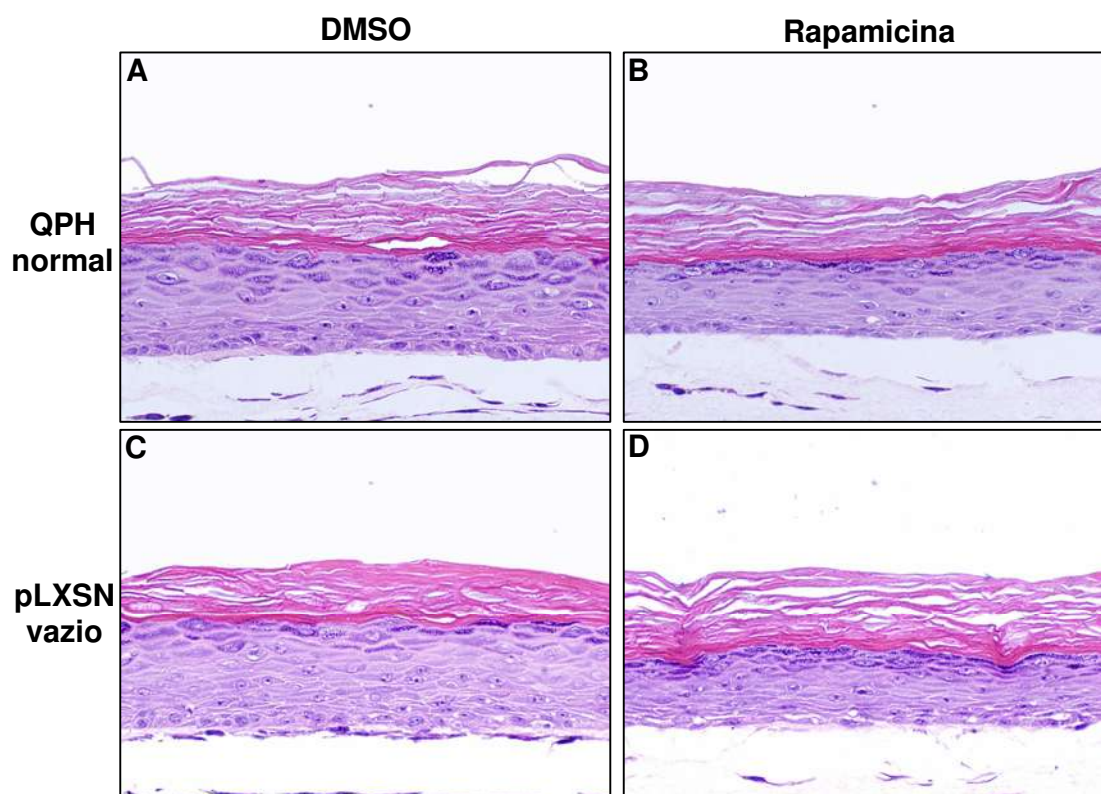
### **1. A Rapamicina não promove alterações na organização geral do epitélio de culturas organotípicas de queratinócitos normais ou que expressam as oncoproteínas de HPV-16.**

O sistema convencional de cultura de queratinócitos em monocamada seleciona aquelas células capazes de proliferar. Nestas condições os queratinócitos apresentam capacidade limitada de diferenciação. Por outro lado, o sistema de cultura organotípica permite a proliferação e a diferenciação celular de maneira semelhante à observada nos epitélios escamosos, permitindo inclusive a identificação das camadas características deste tipo de tecido (figura 8) (CHOW E BROKER, 1997).

Para avaliar se o tratamento por 60 horas com rapamicina promovia alterações morfológicas em culturas organotípicas de queratinócitos normais ou que expressam os oncogenes E6 e/ou E7 de HPV-16 e de suas formas mutadas foi realizada coloração com hematoxilina-eosina para cada uma das amostras. A figura 9 ilustra as alterações morfológicas evidenciadas em queratinócitos normais e em queratinócitos infectados com o vetor retroviral pLXSN vazio. Também compara as duas culturas evidenciando que não ocorrem alterações decorrentes da infecção com o vetor vazio (Figura 9A e 9B). Através da avaliação morfológica foi possível evidenciar que o tratamento com rapamicina promoveu um discreto achatamento das camadas do epitélio, tanto nos queratinócitos normais quanto nos queratinócitos contendo o vetor vazio pLXSN (Figura 9B e 9D). Esse achatamento não pode ser correlacionado à diminuição do número de camadas do mesmo uma vez que a organização do tecido é semelhante à da amostra não tratada.



**Figura 8.** Imagem de um corte transversal de uma cultura organotípica de QPH normais após a coloração com hematoxilina-eosina evidenciando as diferentes camadas do epitélio. Aumento de 400X.



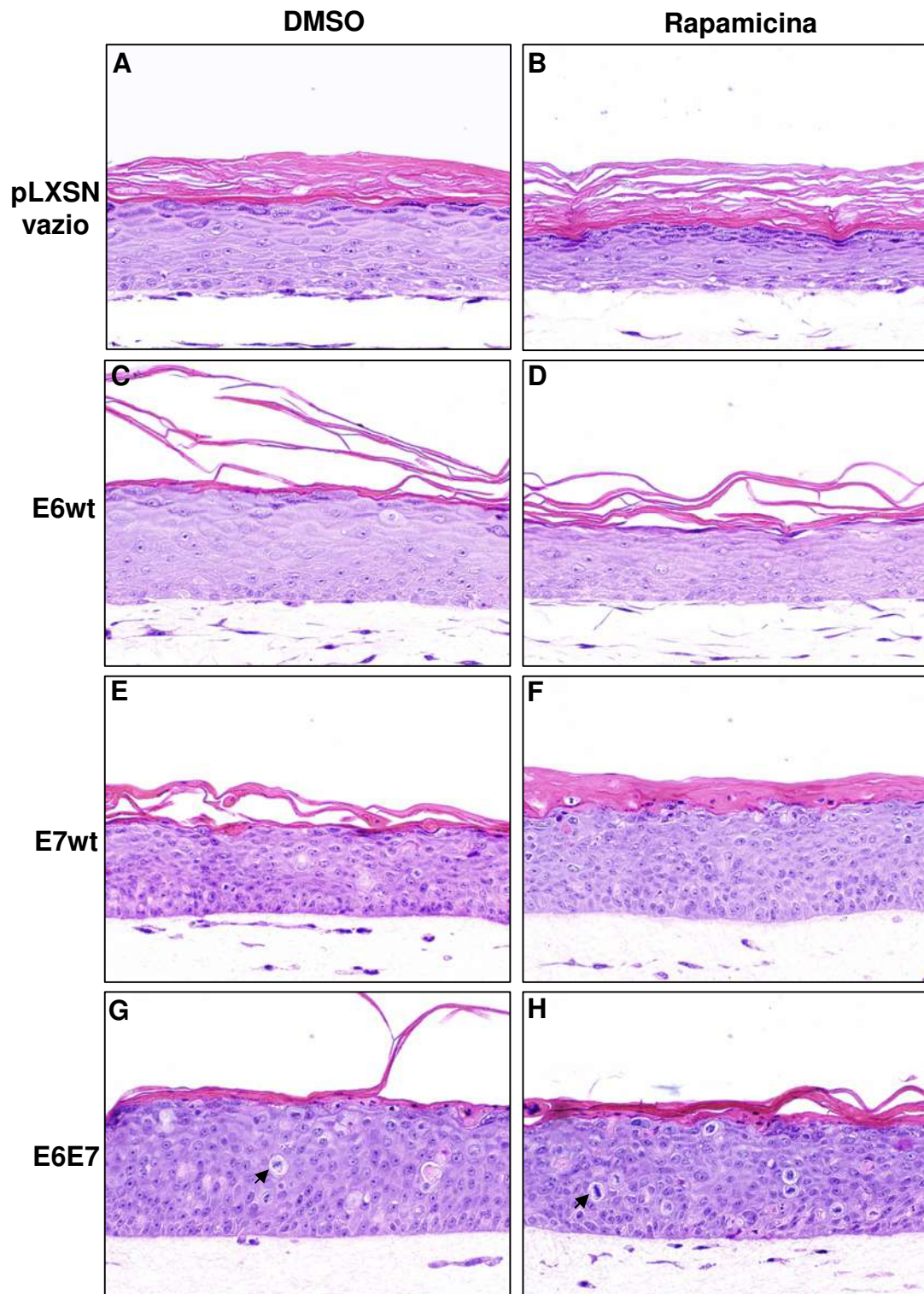
**Figura 9.** Imagem de cortes transversais de culturas organotípicas de QPH normais e QPH infectados com partículas retrovirais contendo o vetor vazio pLXSN expostos a DMSO ou rapamicina. Coloração: hematoxilina-eosina. Aumento de 400X.

Na figura 10 são comparadas as alterações provocadas pela expressão dos genes E6, E7 e E6E7 com àquelas produzidas pela infecção com partículas retrovirais contendo apenas o vetor vazio pLXSN. Também ilustra as alterações induzidas pelo tratamento com rapamicina.

Através da avaliação morfológica foi possível verificar que a proteína E6 promove um aumento da espessura do epitélio, mais precisamente um aumento da espessura da camada espinhosa (Figura 10C). Esse fenômeno é conhecido como acantose e é normalmente observado em epitélios infectados por HPV. Esse fenômeno é conhecido como acantose e é normalmente encontrado em epitélios onde os oncogenes de HPV de alto risco são expressos. Após o tratamento com rapamicina foi possível evidenciar uma diminuição da espessura do epitélio mais precisamente na região da camada espinhosa (Figura 10D).

A expressão da oncoproteína E7, por sua vez, promove a desorganização arquitetural do epitélio. Após a sua expressão ocorre a perda de polarização do tecido não sendo mais possível a identificação das diferentes camadas do epitélio (Figura 10E). Além disso, a expressão da oncoproteína E7 faz com que as células apresentem hipercromasia nuclear. O tratamento das culturas organotípicas contendo o gene E7 com rapamicina induziu um aumento da espessura do epitélio, contudo, não foram observadas alterações referentes à arquitetura do mesmo (Figura 10F).

A organização epitelial de culturas organotípicas geradas a partir de queratinócitos que expressam ambas oncoproteínas virais (E6E7) mostrou-se semelhante àquela observada quando havia apenas a expressão de E7 (Figura 10G). Ambas compartilham desorganização arquitetural e hipercromasia nuclear. Contudo, o tratamento com rapamicina não promoveu o aumento da espessura do epitélio (Figura 10H), situação apresentada pelas culturas organotípicas que expressavam E7. A presença de mitoses nas camadas suprabasais mostra que estas culturas apresentam características semelhantes às observadas em epitélios estratificados escamosos displásicos.



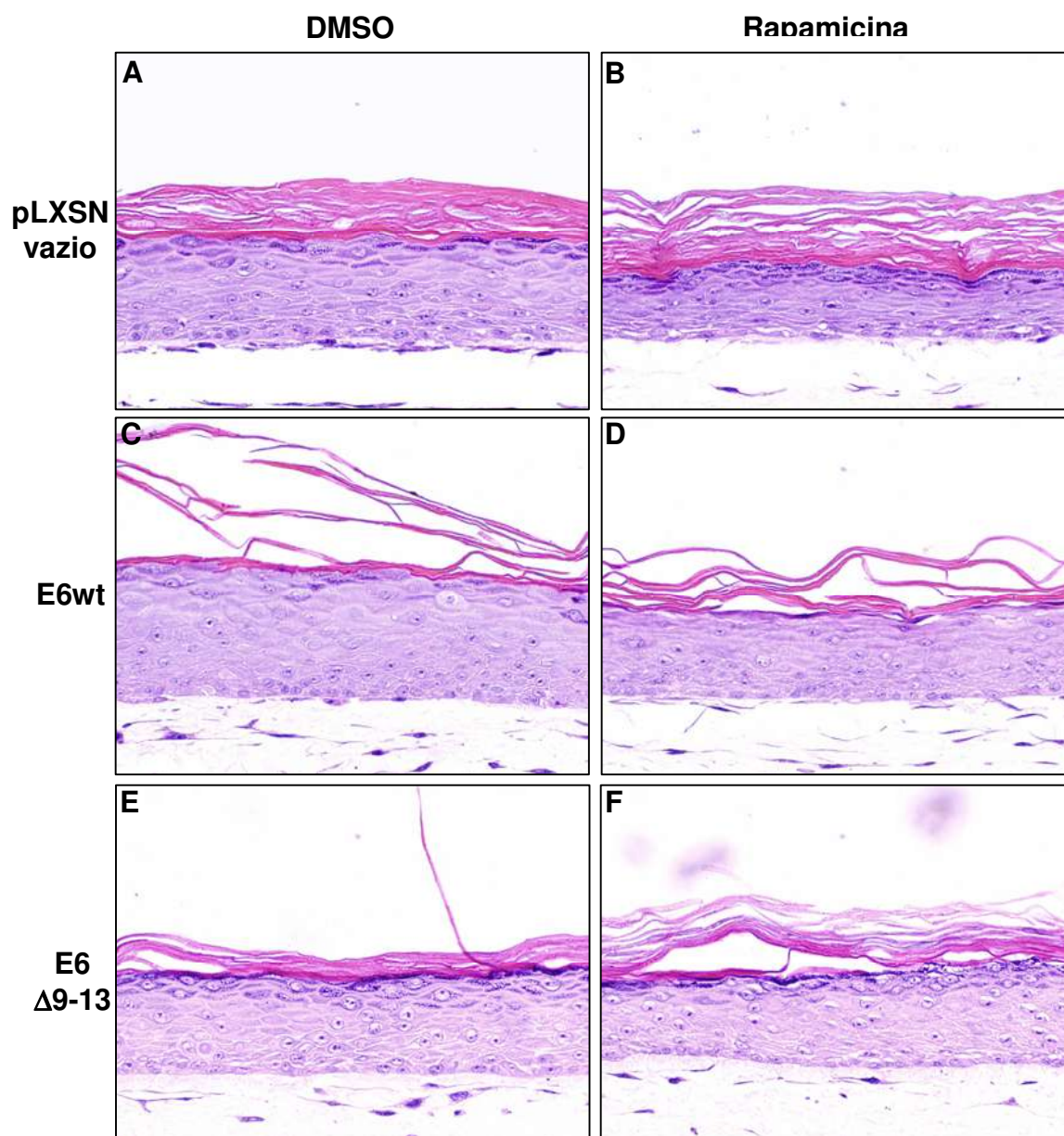
**Figura 10.** Imagem de cortes transversais de culturas organotípicas de QPH contendo o vetor vazio pLXSN ou expressando as oncoproteínas de HPV-16 expostos a DMSO ou Rapamicina. Coloração: hematoxilina-eosina. As setas indicam células em mitose. Aumento de 400X.



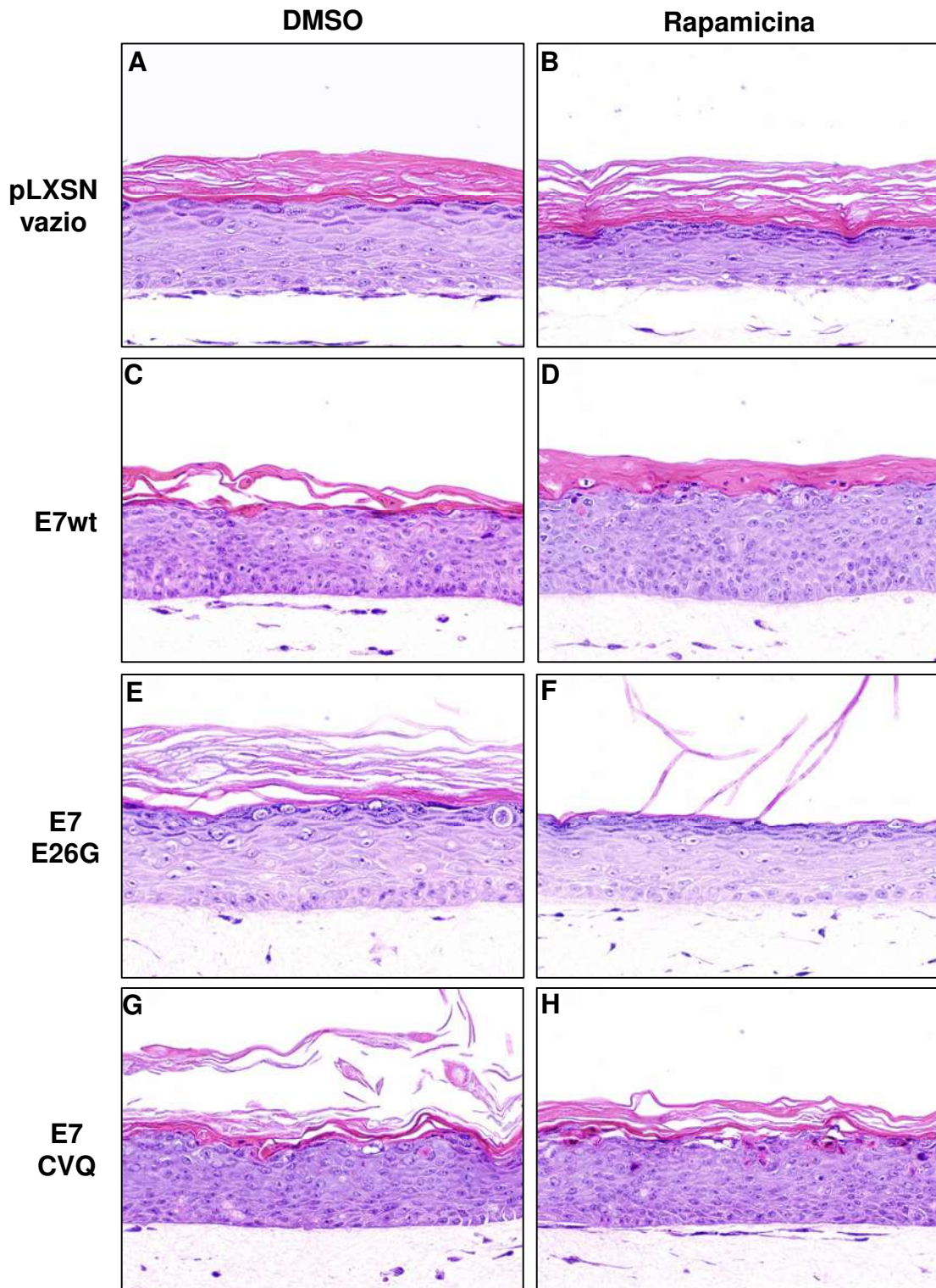
Na figura 11 são comparadas as alterações morfológicas evidenciadas em culturas organotípicas de queratinócitos portadores do gene E6 de HPV-16 e da forma mutada deste gene: E6 $\Delta$ 9-13 (incapaz de induzir degradação de p53) com culturas organotípicas de queratinócitos normais. Também é possível observar as alterações morfológicas induzidas pelo tratamento com rapamicina.

A avaliação morfológica dos cortes de cultura organotípica que expressam o gene E6 indica que esta oncoproteína, como descrito anteriormente, induz um aumento da espessura da camada espinhosa (Figura 11C). Após o tratamento com rapamicina evidencia-se uma diminuição da espessura do epitélio (Figura 11D). A expressão da forma mutante do gene E6 (E6 $\Delta$ 9-13 - incapaz de induzir a degradação de p53) não promoveu um aumento do número de camadas do epitélio (Figura 11E). O tratamento desta cultura com rapamicina promoveu um discreto achatamento do tecido (Figura 11F), também observado anteriormente para as culturas organotípicas de queratinócitos normais (Figura 11B).

Na figura 12 estão ilustradas alterações morfológicas evidenciadas em culturas organotípicas de queratinócitos portadores do gene E7 de HPV-16 e das formas mutadas deste gene: E726G (incapaz de induzir degradação de pRb) e CVQ68-70AAA (incapaz de induzir proliferação em resposta à sinais de parada do ciclo celular) quando comparados com culturas de queratinócitos normais. Também é possível evidenciar as alterações morfológicas induzidas pelo tratamento com rapamicina.



**Figura 11.** Imagem de cortes transversais de culturas organotípicas de QPH contendo o vetor vazio pLXSN ou expressando a oncoproteína E6 de HPV-16 e sua forma mutada E6 $\Delta 9-13$  (incapaz de induzir a degradação de p53) tratados com DMSO ou Rapamicina. Coloração: hematoxilina-eosina. Aumento de 400X.



**Figura 12.** Imagem de cortes transversais de culturas organotípicas de QPH contendo o vetor vazio pLXSN ou expressando a oncoproteína E7 de HPV-16 e suas formas mutadas E7E26G (incapaz de induzir a degradação de pRb) e CVQ68-70AAA (capaz de induzir a degradação de pRb e incapaz de induzir proliferação em resposta a sinais de parada do ciclo celular, tratados com DMSO ou Rapamicina. Coloração: hematoxilina-eosina. Aumento de 400X.

A avaliação morfológica dos cortes de cultura organotípica que expressam o gene E7 indicam que esta oncoproteína promove, como descrito anteriormente, uma evidente desorganização do epitélio (Figura 12C). Além disso, a identificação das diferentes camadas do epitélio é consideravelmente limitada. Também se observa um atraso no processo de diferenciação, evidente pelo maior número de camadas do epitélio e pela diminuição da camada granulosa. Alterações morfológicas celulares também são notadas. No epitélio normal (Figura 12A) as células das camadas espinhosa e granular são claramente alongadas. No epitélio gerado por queratinócitos que expressam a oncoproteína E7 estas células apresentam morfologia arredondada. O epitélio gerado por queratinócitos que expressam a oncoproteína E7 mutada numa posição que interfere na sua capacidade de induzir a degradação de pRb (E7E26G) apresenta morfologia bem semelhante ao que se observa em um epitélio gerado por queratinócitos normais (Figura 12E). As camadas do epitélio são facilmente distinguíveis e não ocorre atraso na diferenciação celular. Além disso, este epitélio apresentou ligeiro achatamento após o tratamento com rapamicina (Figura 12F). O tratamento das culturas organotípicas de queratinócitos portadores do gene E7 com rapamicina (Figuras 12D) aparentemente não promoveu alterações na arquitetura do tecido.

O epitélio gerado por queratinócitos que expressam a proteína E7 contendo a mutação CVQ68-70AAA (capaz de induzir a degradação de pRb e incapaz de induzir proliferação em resposta a sinais de parada do ciclo celular) apresentou morfologia muito semelhante àquela observada em culturas organotípicas de queratinócitos que expressam a proteína E7 selvagem (Figura 12G). O tratamento destas culturas com rapamicina não promoveu alterações na organização geral do epitélio (Figura 12H).

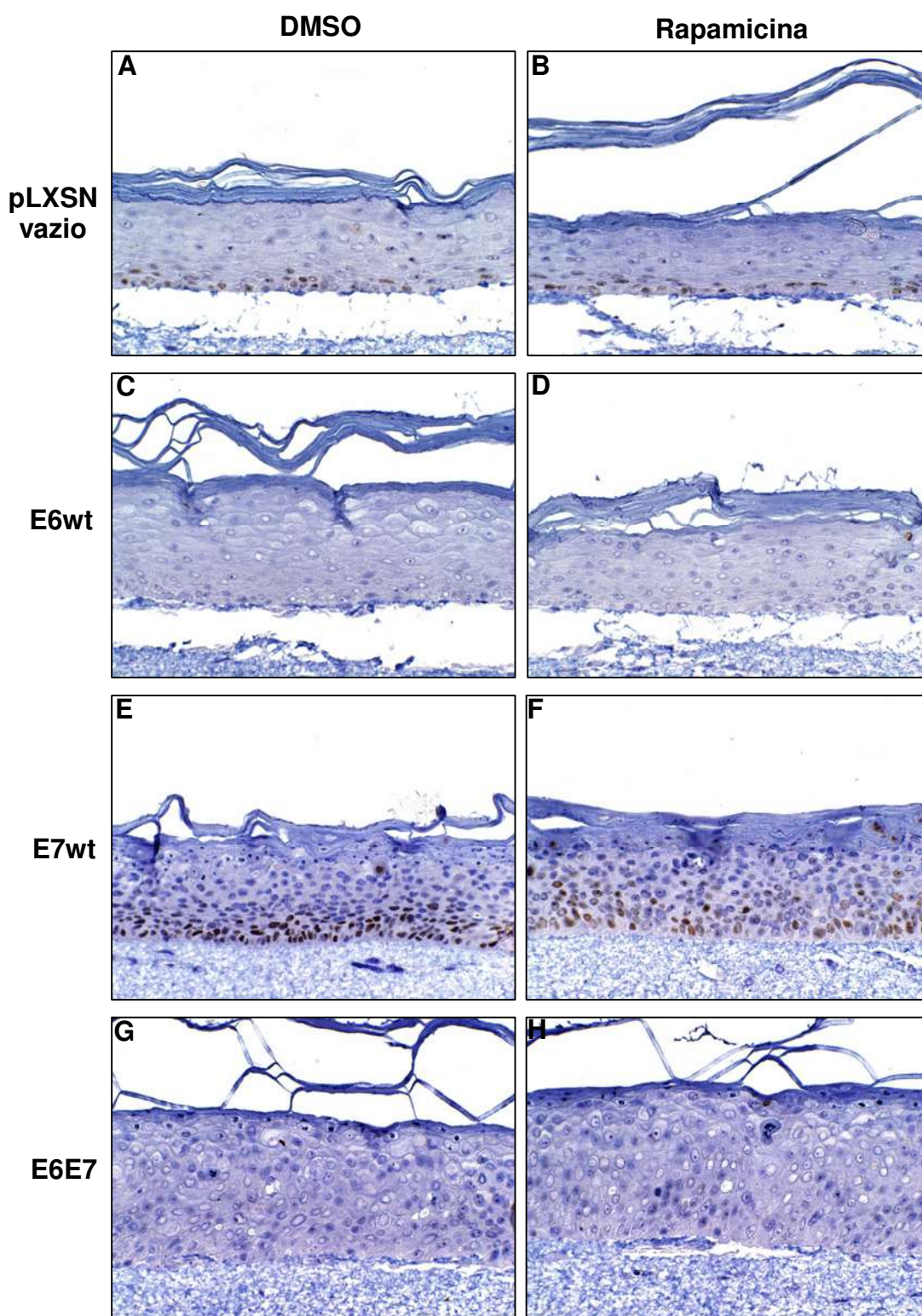
## **2. A Rapamicina não impede que a proteína E6 de HPV-16 induza a degradação de p53 e promove alterações no padrão de distribuição dessa proteína em culturas organotípicas de queratinócitos que expressam o oncogene E7.**

A expressão das oncoproteínas E6 e E7 de HPV-16 está relacionada à alterações dos níveis da proteína p53. Enquanto a proteína E6 promove a degradação de p53 pela via de proteólise dependente de ubiquitina (WERNESSE *et al*, 1989) a expressão da oncoproteína E7 está relacionada ao aumento da estabilidade desta proteína (DEMERS *et al.*, 1994).

Pelo fato do RNAm que codifica para a proteína E6 de HPV-16 apresentar um cap na extremidade 5' (STACEY *et al.*, 2000) o tratamento com rapamicina poderia influenciar na capacidade deste RNA ser traduzido. Contudo, por não existirem anticorpos disponíveis para detectar a proteína E6, optamos por avaliar se o tratamento com rapamicina poderia alterar os níveis da proteína p53 em culturas organotípicas de queratinócitos que expressam esta oncoproteína. Para isso, os níveis e distribuição de p53 nos tecidos gerados foram avaliados por imunohistoquímica.

A figura 13 ilustra o resultado obtido em culturas organotípicas de queratinócitos que apresentam o vetor vazio pLXSN ou que expressam as oncoproteínas E6 e E7, isoladamente ou em conjunto. Através da marcação nuclear observada podemos concluir que a proteína p53 encontra-se predominantemente em células da camada basal e suprabasal do epitélio gerado a partir de queratinócitos contendo o vetor vazio (Figura 13A). O mesmo é observado no tecido tratado com rapamicina (Figura 13B). Como esperado, a proteína p53 não pode ser detectada em culturas de queratinócitos que expressam a oncoproteína E6 (Figura 13C). O tratamento com rapamicina não promoveu alterações nos níveis da proteína p53 (Figura 13D).



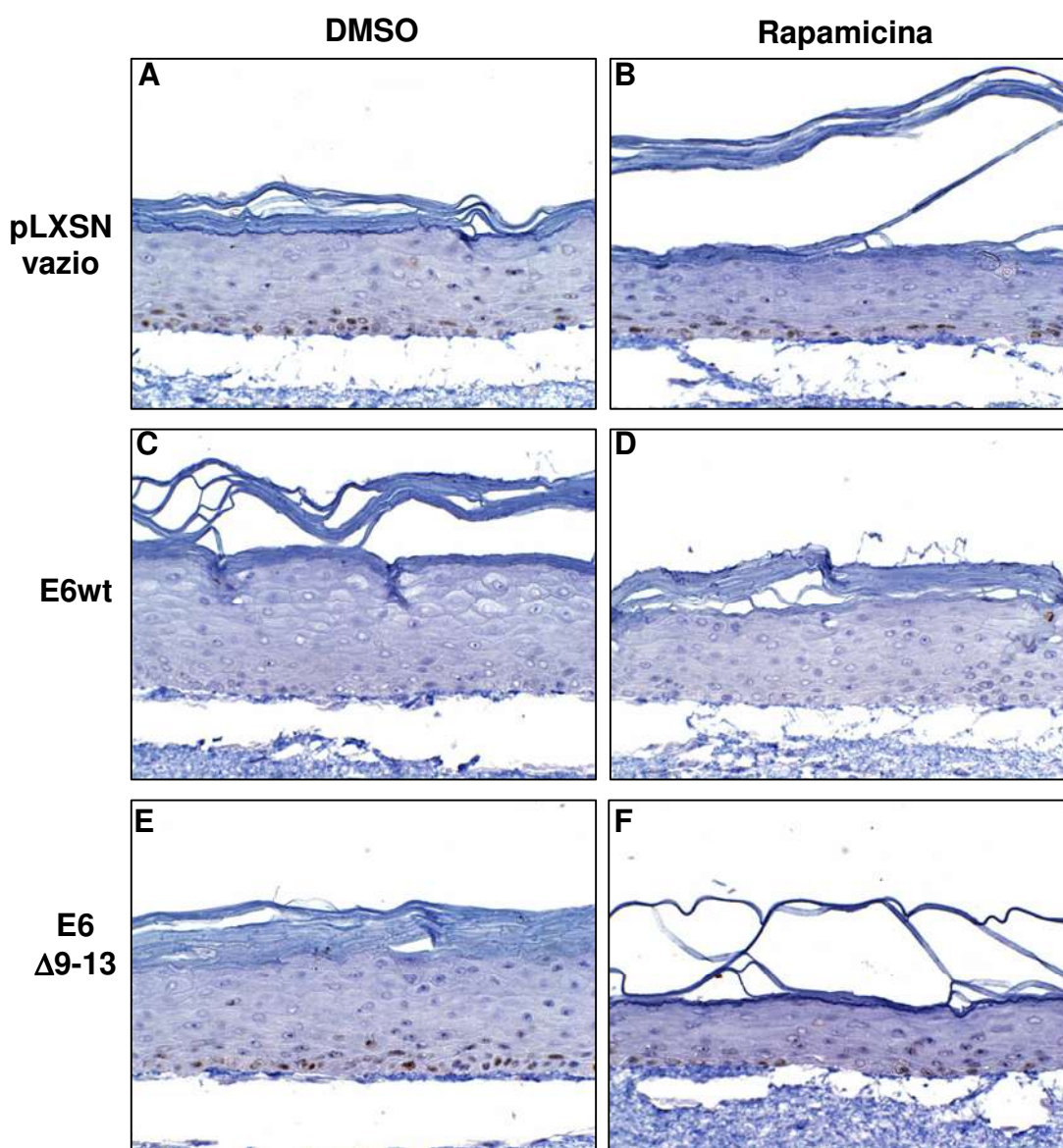


**Figura 13.** Imagem de cortes transversais de culturas organotípicas de QPH contendo o vetor vazio pLXSN ou expressando as oncoproteínas de HPV-16 expostos a DMSO ou rapamicina. A marcação nuclear observada corresponde à proteína p53 detectada por Imunohistoquímica. Aumento de 400X.

Em culturas organotípicas de queratinócitos que expressam a oncoproteína E7 foi possível observar que as células com marcação positiva para a proteína p53 localizam-se predominantemente nas camadas basal e parabasal do epitélio (Figura 13E). Vale ressaltar que a marcação observada é mais proeminente do que àquela obtida em culturas geradas a partir de queratinócitos contendo o vetor vazio, como esperado. Após o tratamento dessas culturas com rapamicina foi possível observar que as células positivas para p53 não se encontravam predominantemente nas camadas basal e suprabasal do epitélio (Figura 13F). Além da distribuição das células marcadas ser mais heterogênea também foi possível constatar a presença de células marcadas nas camadas espinhosa e granulosa.

Em culturas organotípicas geradas a partir de queratinócitos contendo E6 e E7 de HPV-16 a proteína p53 não pode ser detectada uma vez que a oncoproteína E6 promove a degradação dessa proteína. (Figura 13G) (WERNESSE *et al.*, 1990). Não houve alteração após o tratamento com rapamicina (Figura 13H).

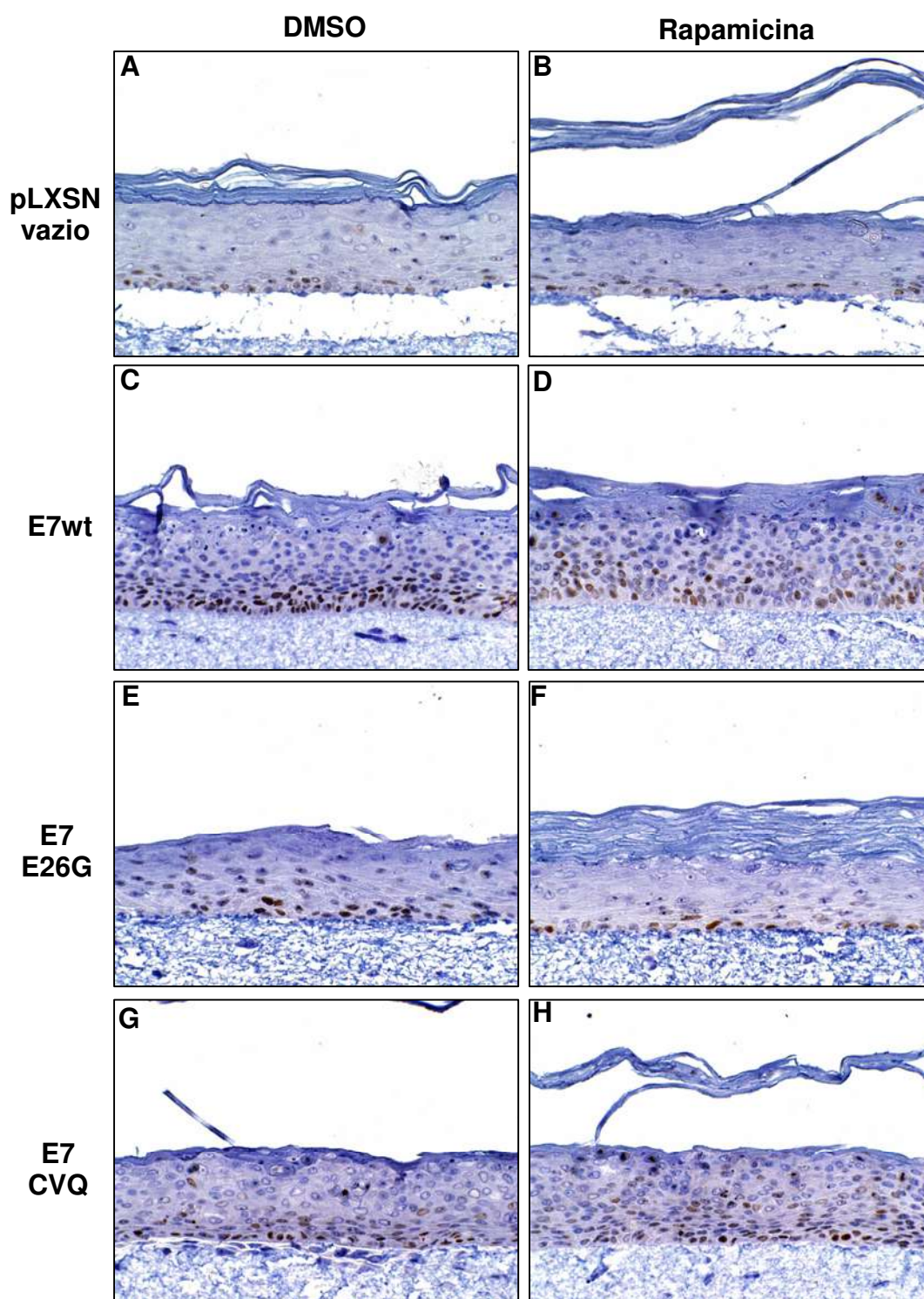
A figura 14 compara a marcação para a proteína p53 em culturas organotípicas de queratinócitos contendo o vetor vazio pLXSN e contendo o gene E6 ou sua forma mutada E6 $\Delta$ 9-13 (incapaz de induzir a degradação de p53). Através da comparação podemos observar que a expressão da forma mutada do gene E6, como esperado, não promove alterações nos níveis da proteína p53 (Figura 14E). O tratamento com rapamicina não promoveu alterações na marcação observada no controle não tratado (Figura 14F).



**Figura 14.** Imagem de cortes transversais de culturas organotípicas de QPH contendo o vetor vazio pLXSN ou expressando a oncoproteína E6 de HPV-16 e sua forma mutada E6 $\Delta$ 9-13 (incapaz de induzir a degradação de p53) expostos a DMSO ou rapamicina. A marcação nuclear observada corresponde à proteína p53 detectada por Imunohistoquímica. Aumento de 400X.



Na figura 15 é possível compara os resultados obtidos em culturas de queratinócitos que expressam a oncoproteína E7 e suas formas mutadas (E7E26G e E7CVQ68-70AAA) com as de queratinócitos contendo o vetor vazio. Através da marcação obtida é possível verificar que a rapamicina não promove alterações na marcação de p53 nas culturas organotípicas de queratinócitos contendo a forma mutada do gene E7 que não é capaz de degradar a proteína pRb (E7E26G) (Figura 15E e F). Este resultado é comparável ao obtido para a cultura de queratinócitos contendo o vetor vazio. Já a forma mutada do gene E7 (E7CVQ68-70AAA) que é capaz de induzir a degradação de pRb, mas não é capaz de induzir parada do ciclo celular em resposta à danos no DNA, tem padrão de distribuição da proteína p53 muito semelhante àquele observado para a cultura de queratinócitos que expressam a oncoproteína E7 (Figura 15G). Além disso, o tratamento com rapamicina tem efeito semelhante ao observado para as culturas organotípicas contendo o gene E7. O padrão de distribuição no tecido deixa de ser restrito à camada basal e parabasal do epitélio e passa a ter uma distribuição mais heterogênea, onde as células marcadas podem ser encontradas também nas camadas espinhosa e granulosa (Figura 15H).



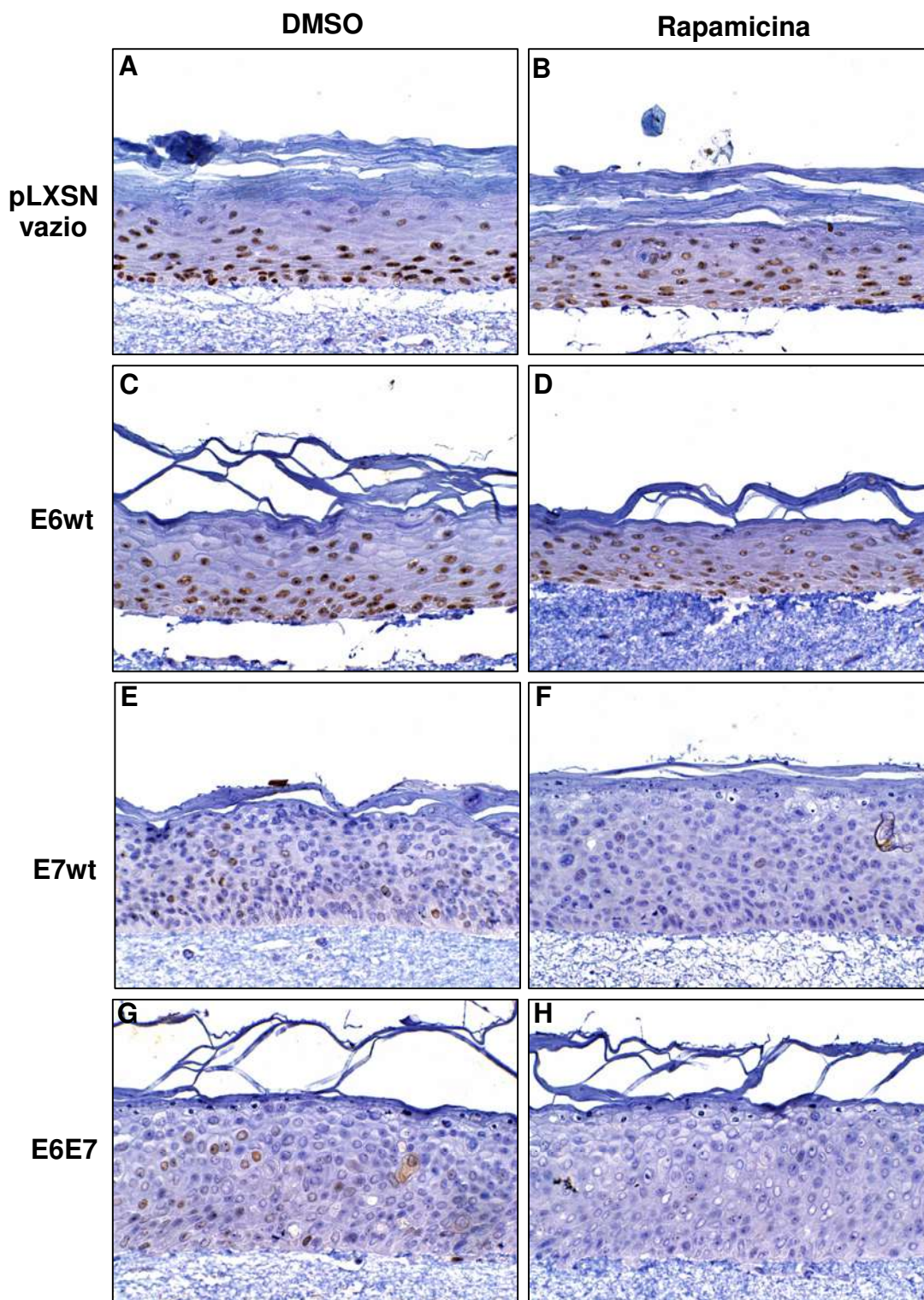
**Figura 15.** Imagem de cortes transversais de culturas organotípicas de QPH contendo o vetor vazio pLXSN ou expressando a oncoproteína E7 de HPV-16 e suas formas mutadas E7E26G (incapaz de induzir a degradação de pRb) e CVQ68-70AAA (capaz de induzir a degradação de pRb e incapaz de induzir proliferação em resposta a sinais de parada do ciclo celular) expostos a DMSO ou rapamicina. A marcação nuclear observada corresponde à proteína p53 detectada por Imunohistoquímica. Aumento de 400X.

**3. A rapamicina não promove alterações nos níveis da proteína pRb em culturas organotípicas de queratinócitos normais e que expressam a oncoproteínas E6 de HPV-16 e não impede que E7 seja capaz de degradar a proteína pRb.**

A proteína pRb é considerada um dos mais importantes reguladores do ciclo celular. Através da sua ligação com o fator de transcrição E2F esta proteína é capaz de bloquear a progressão do ciclo celular impedindo que este fator esteja disponível para transcrição de RNAm que codificam proteínas essenciais para transição G1/S. A oncoproteína E7 de HPV de alto risco, ao se ligar à proteína pRb, não só promove a liberação do fator de transcrição E2F, mas também é capaz de induzir a degradação de pRb pela via de proteólise dependente de ubiquitina (CHELLAPPAN *et al.*, 1991; GIARRE *et al.*, 2001).

Recentemente foi demonstrado que o tratamento com rapamicina da linhagem celular CasKi (derivada de carcinoma do colo uterino, contendo HPV 16) promovia um ligeiro decréscimo dos níveis da oncoproteína E7 (OH *et al.*, 2006). Pelo fato de não existirem anticorpos disponíveis para detecção da proteína E7 por imunohistoquímica optamos por avaliar se a rapamicina poderia alterar os níveis da proteína pRb em culturas organotípicas de queratinócitos expressando o gene E7.

A figura 16 ilustra o resultado obtido em culturas organotípicas de queratinócitos que apresentam o vetor vazio pLXSN e que expressam as oncoproteínas E6 e E7, isoladamente ou em conjunto. Através da marcação nuclear observada podemos concluir que a proteína pRb encontra-se homogeneamente distribuída por todas as células do epitélio gerado a partir de queratinócitos contendo o vetor vazio (Figura 16A). O mesmo é observado no tecido tratado com rapamicina (Figura 16B).



**Figura 16.** Imagem de cortes transversais de culturas organotípicas de QPH contendo o vetor vazio pLXSN ou expressando as oncoproteínas de HPV-16 expostas a DMSO ou rapamicina. A marcação nuclear observada corresponde à proteína pRb detectada por Imunohistoquímica. Aumento de 400X.

O epitélio gerado a partir de queratinócitos contendo a oncoproteína E6 apresenta distribuição de marcação muito semelhante àquela observada para a cultura organotípica gerada a partir de queratinócitos contendo o vetor vazio (Figura 16C). O tratamento com rapamicina não alterou o padrão de marcação observado (Figura 16D).

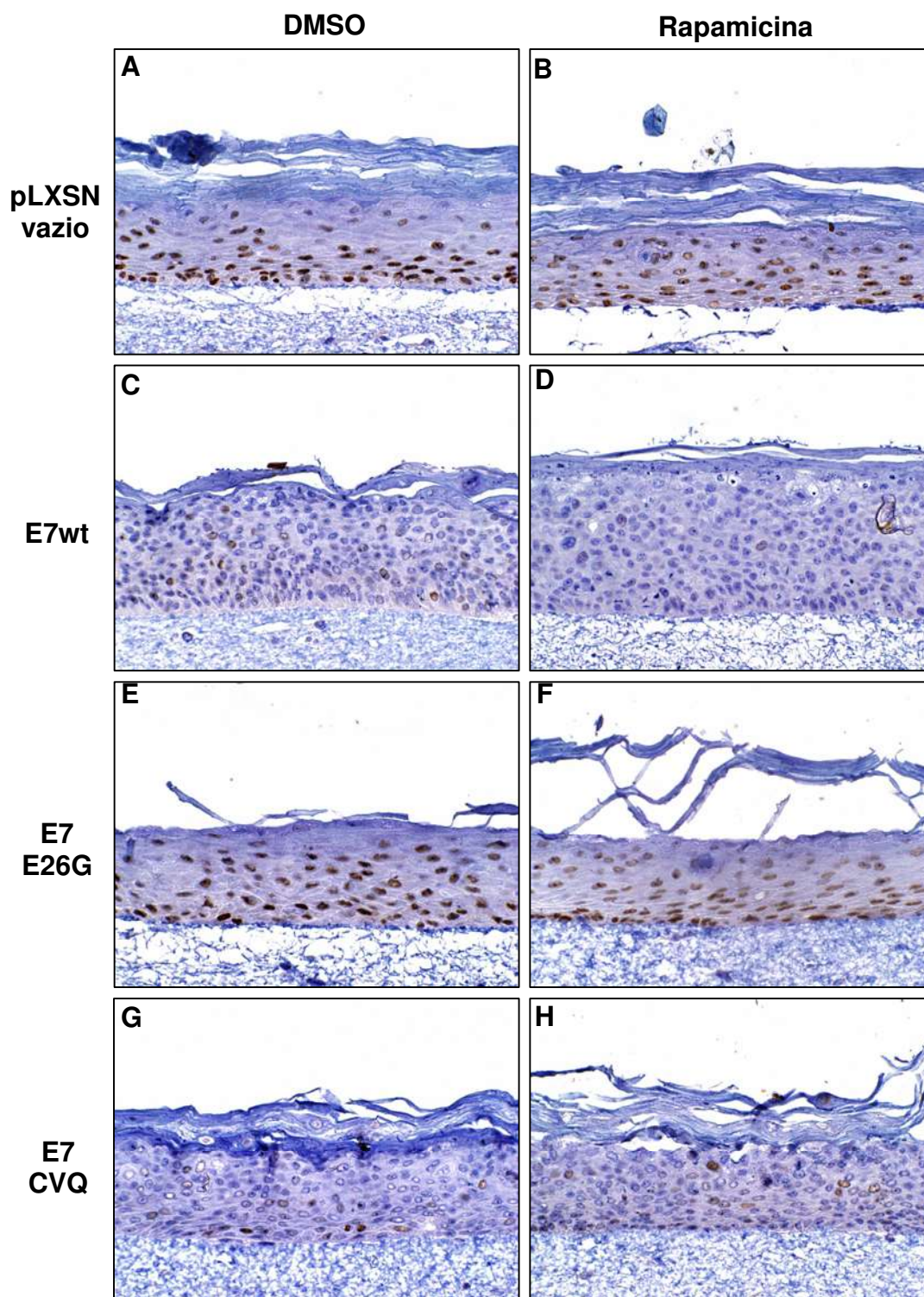
Como esperado, a proteína pRb foi raramente detectada em culturas de queratinócitos expressando a oncoproteína E7 (Figura 16E). O tratamento com rapamicina promoveu uma ligeira diminuição da marcação observada no tecido não tratado (Figura 16F). Contudo, pelo fato desta diminuição ter sido discreta e não consistente por todo epitélio não podemos afirmar com precisão que a rapamicina promove uma diminuição dos níveis da proteína pRb em culturas organotípicas de queratinócitos que expressam a oncoproteína E7.

Em culturas organotípicas geradas a partir de queratinócitos contendo E6 e E7 de HPV-16 a proteína pRb foi raramente detectada, assim como observado para o tecido contendo apenas a oncoproteína E7 (Figura 16G). O tratamento com rapamicina não promoveu alterações significativas nos níveis da proteína pRb (Figura 16H).



A utilização de mutantes da proteína E7 que interferem na capacidade desta proteína de induzir a degradação de pRb preconiza a necessidade de avaliar os níveis dessa proteína nas culturas organotípicas de queratinócitos que expressam essas formas mutadas. A figura 17 compara a marcação para a proteína pRb em culturas organotípicas de queratinócitos contendo o vetor vazio pLXSN com àquelas geradas à partir de queratinócitos contendo o gene E7 e suas formas mutadas: E7E26G (incapaz de induzir a degradação de pRb) e E7CVQ68-70AAA (incapaz de induzir proliferação em resposta à sinais de parada do ciclo celular e capaz de induzir a degradação de pRb).

Através da comparação podemos observar que a expressão da forma mutada do gene E7E26G, como esperado, não promove alterações nos níveis da proteína pRb (Figura 17E). O tratamento com rapamicina também não promoveu alterações na marcação observada no controle não tratado (Figura 17F). Já a forma mutada de E7CVQ68-70AAA, como esperado, promoveu uma redução dos níveis de pRb (Figura 17G). Essa diminuição pode ser comparada àquela observada em culturas de queratinócitos expressando a proteína E7 selvagem (Figura 17C). O tratamento destas culturas com rapamicina não promoveu alterações nos níveis de detecção de pRb (Figura 17H).



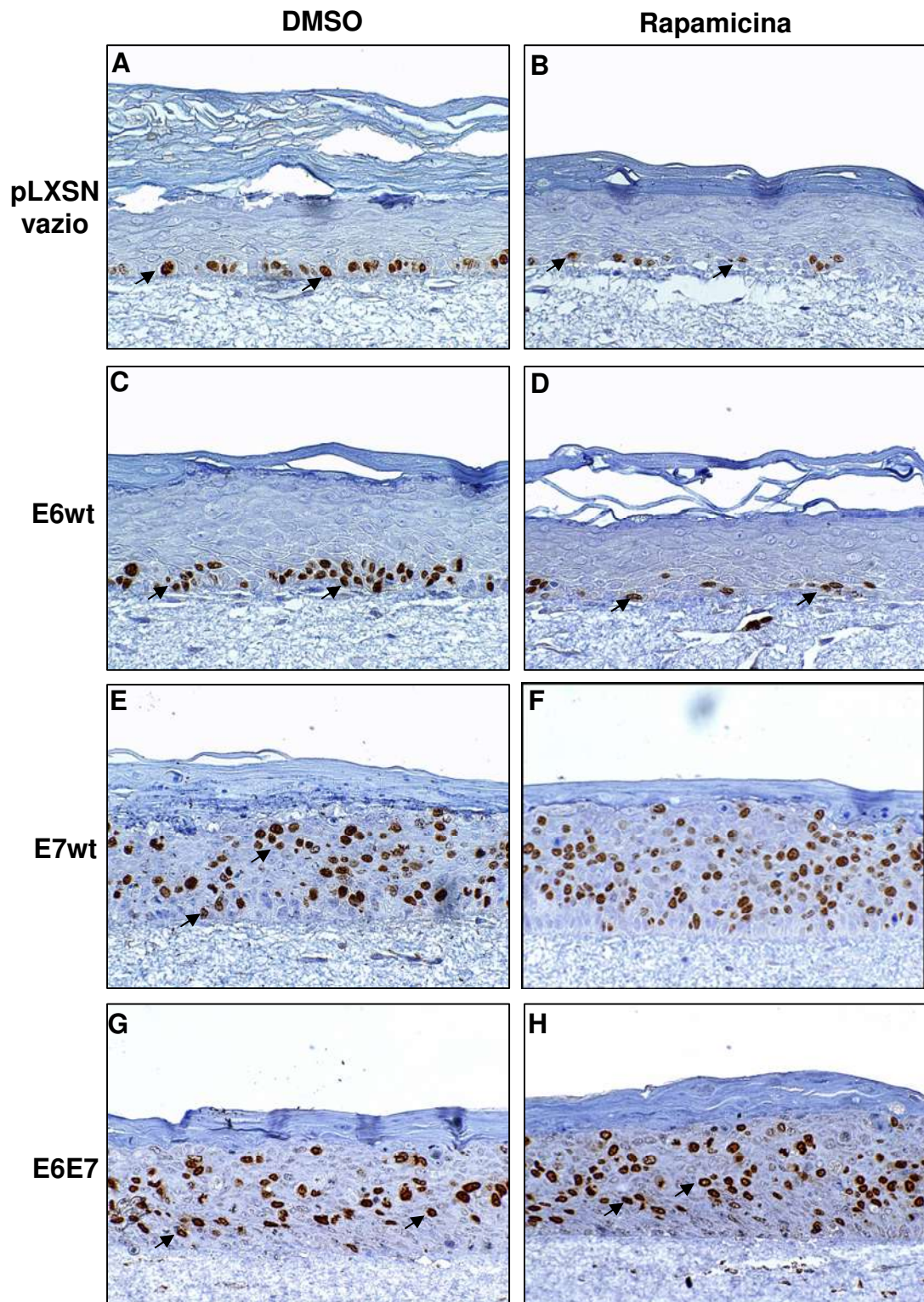
**Figura 17.** Imagem de cortes transversais de culturas organotípicas de QPH contendo o vetor vazio pLXSN ou expressando a oncoproteína E7 de HPV-16 e suas formas mutadas E7E26G (incapaz de induzir a degradação de pRb) e CVQ68-70AAA (capaz de induzir a degradação de pRb e incapaz de induzir proliferação em resposta a sinais de parada do ciclo celular) expostas a DMSO ou rapamicina. A marcação nuclear observada corresponde à proteína pRb detectada por Imunohistoquímica. Aumento de 400X.

#### **4. A expressão da oncoproteína E7 de HPV-16 confere resistência ao efeito antiproliferativo da Rapamicina em culturas organotípicas de queratinócitos e em monocamada.**

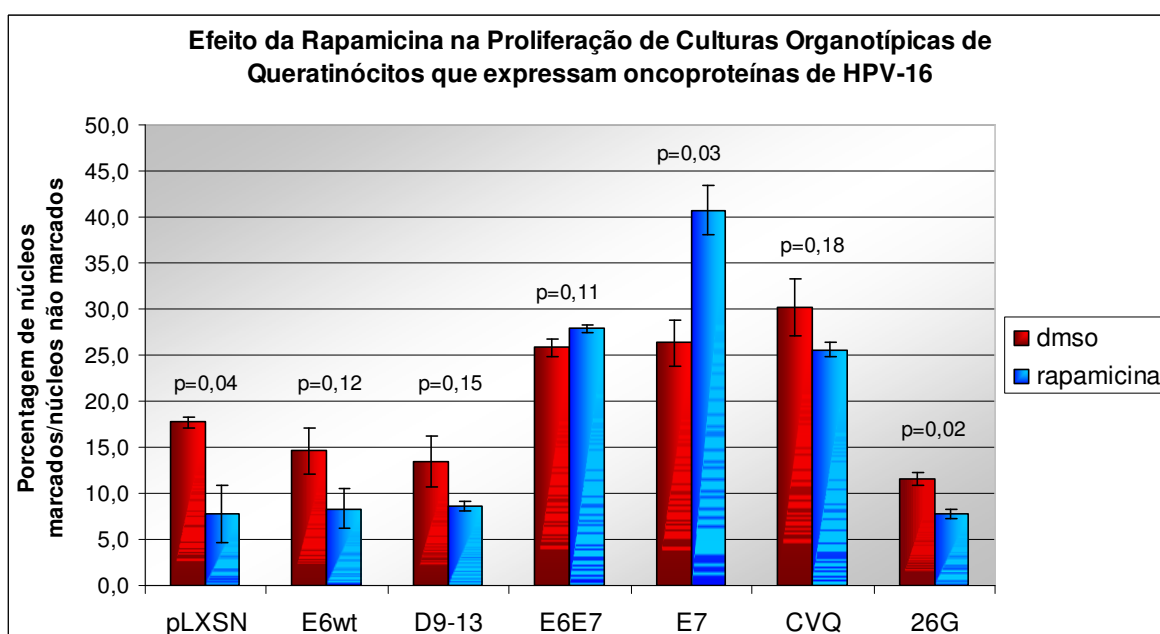
O efeito da rapamicina sobre a proliferação de queratinócitos em culturas organotípicas foi avaliado através da incorporação de 5-bromodesoxiuridina (BrdU). A figura 18 ilustra, através da marcação dos núcleos celulares, que a proliferação de queratinócitos normais e infectados com o vetor vazio restringe-se à camada basal do epitélio. Além disso, é possível evidenciar que a rapamicina apresenta efeito citostático nestas culturas. Contudo, esse efeito não pode ser considerado extremo já que mesmo após o tratamento por 60 horas com rapamicina ainda existem células capazes de proliferar.

A análise quantitativa da proliferação celular foi realizada através da contagem de núcleos marcados sobre núcleos totais. Através desta contagem foi possível estabelecer a porcentagem de inibição de proliferação conferida pelo tratamento por 60 horas com rapamicina. Os resultados representam a contagem dos núcleos de 3 experimentos independentes. Para cada experimento foram contados no mínimo 2.500 núcleos. Através desta avaliação foi possível identificar que queratinócitos infectados com o vetor vazio apresentam em média 18% de marcação nuclear (Figura 18A e Figura 19). Após o tratamento com rapamicina este número caiu para em média 8% (Figura 18B e Figura 19) indicando que esta droga promove uma inibição de proliferação em torno de 56% em culturas organotípicas de queratinócitos normais e infectados com vetor vazio ( $p=0,04$ ).





**Figura 18.** Imagem de cortes transversais de culturas organotípicas de QPH contendo o vetor vazio pLXSN ou expressando as oncoproteínas de HPV-16 expostas a DMSO ou rapamicina. As setas indicam células que incorporaram BrdU, detectadas por Imunohistoquímica. Aumento de 400X.



**Figura 19.** Quantificação da proliferação de culturas organotípicas de QPH infectados com os vetores retrovirais pLXSN contendo ou não as oncoproteínas de HPV-16 (E6, E7 e E6E7), bem com suas formas mutadas E6 $\Delta$ 9-13 (incapaz de induzir a degradação de p53), E7E26G (incapaz de induzir a degradação de pRb) e E7CVQ68-70AAA (incapaz de induzir proliferação em resposta à sinais de parada do ciclo celular).

A figura 18 também ilustra o efeito da rapamicina sobre a proliferação de culturas organotípicas de queratinócitos que expressam o oncogene E6. Em culturas organotípicas de queratinócitos normais a proliferação celular se restringe à camada basal do epitélio. Já em culturas de queratinócitos que expressam o oncogene E6 (Figura 18C) é possível observar que a proliferação celular ocorre também na camada suprabasal. Após o tratamento com rapamicina, contudo, é possível notar uma redução consistente do número de células marcadas (Figura 18D). Isso indica que a rapamicina interfere na proliferação de queratinócitos que expressam a proteína E6. A análise quantitativa revela que a rapamicina atua de maneira citostática para a proliferação de queratinócitos que expressam a oncoproteína E6. Isto é evidenciado pela redução média de núcleos marcados de 15% para 8,5% após o tratamento (Figura 19). Isso mostra uma inibição de proliferação de ordem de 42% ( $p=0,11$ ). Embora não significativo esse valor indica uma tendência de inibição de proliferação.

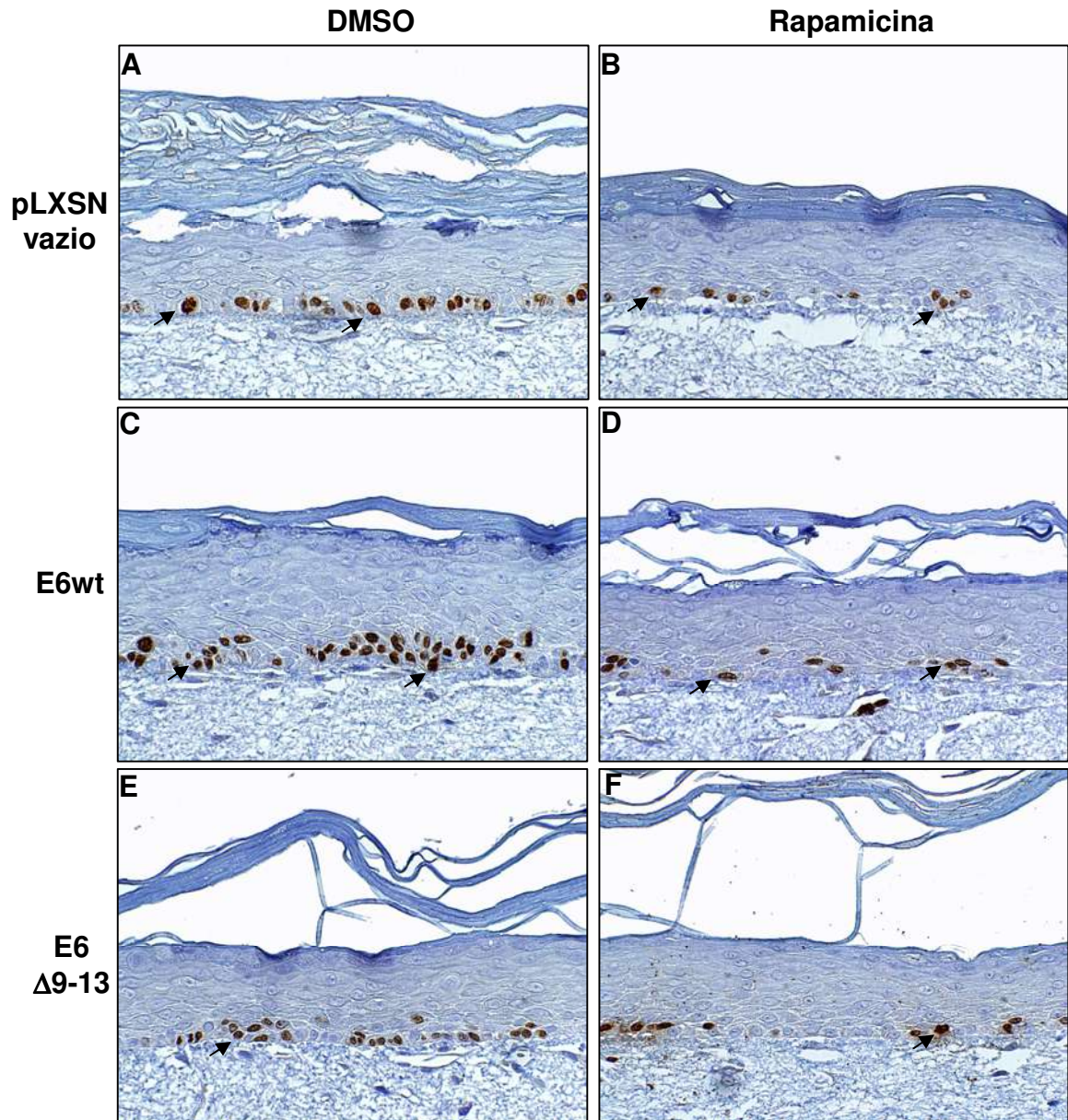
A expressão da oncoproteína E7 está relacionada a um aumento dos níveis de proliferação celular. De fato, de acordo com a marcação nuclear observada é possível evidenciar que a proteína viral E7 é capaz de induzir proliferação em todas as camadas do epitélio (Figura 18E). Essa proliferação foi em média 8% maior nessas culturas do que naquelas geradas por queratinócitos infectados com partículas retrovirais contendo o vetor vazio (Figura 19). Interessantemente, a rapamicina não promoveu parada de proliferação em culturas organotípicas de queratinócitos expressando a proteína E7 (Figura 18F). A análise quantitativa revelou que em média 26% das células presentes em uma cultura organotípica de queratinócitos expressando E7 apresentaram incorporação de BrdU. Interessantemente, a análise quantitativa também revela que a rapamicina não é capaz de induzir parada de proliferação em queratinócitos que expressam a oncoproteína viral E7. De fato, houve um

aumento médio de 14% na detecção de núcleos marcados após o tratamento com esta droga ( $p=0,03$ ).

A expressão de ambas oncoproteínas (E6E7) também promoveu um aumento dos níveis de proliferação de queratinócitos em culturas organotípicas. Ao ser comparada com a cultura gerada a partir de queratinócitos normais (Figura 18A), a cultura de queratinócitos expressando E6 e E7 de HPV-16 também apresentou um aumento do no número de células marcadas (25,8%) (Figura 18G). Esse índice de proliferação também foi 8% maior em queratinócitos expressando as oncoproteínas E6 e E7 do que em queratinócitos normais (Figura 19). O tratamento com rapamicina não promoveu alterações de proliferação significativas nessas culturas ( $p=0,11$ ) (Figura 18H). A análise quantitativa mostrou que em média 27,9% das células apresentaram marcação indicativa de proliferação.

A figura 20 ilustra o efeito da rapamicina sobre a proliferação de culturas organotípicas de queratinócitos normais (Figura 20A) e que expressam o oncogene E6 (Figura 20C) e sua forma mutante E6 $\Delta$ 9-13 (Figura 20E). Nota-se que a proliferação de queratinócitos que expressam a forma mutada do gene E6 (E6 $\Delta$ 9-13) é semelhante àquela observada para a cultura de queratinócitos normais, ou seja, restringe-se à camada basal. A rapamicina também promoveu uma inibição de proliferação de queratinócitos que expressam a oncoproteína E6 mutada (Figura 13F) já que houve uma redução de núcleos marcados de 13,8 para 8,7, em média, após o tratamento (Figura 14). A quantificação revelou uma inibição de proliferação por volta de 35 % ( $p=0,14$ ). Embora não significativo esse valor indica uma tendência de inibição de proliferação.



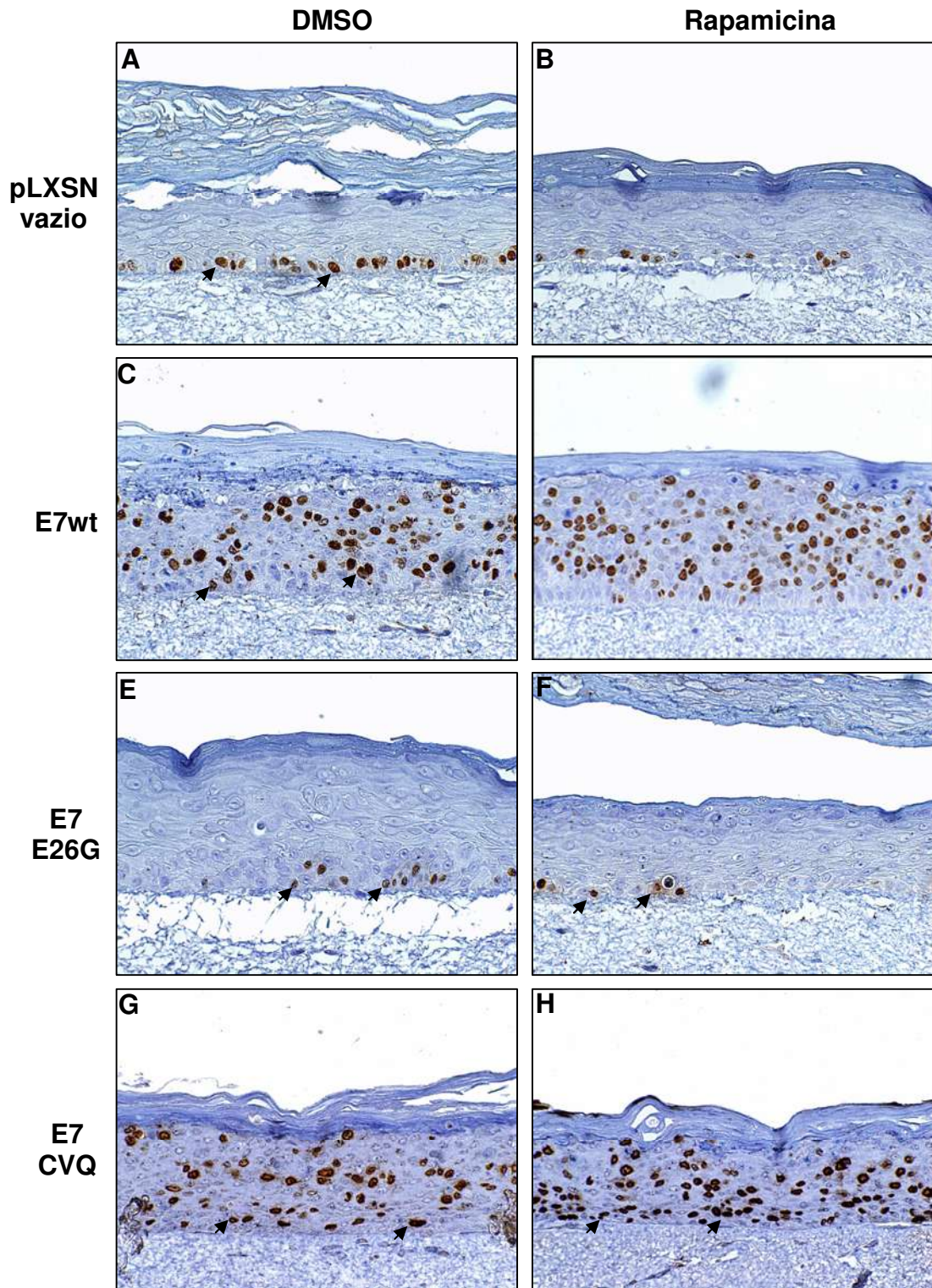


**Figura 20.** Imagem de cortes transversais de culturas organotípicas de queratinócitos normais e infectados com os vetores que expressam E6 e sua forma mutada (E6 $\Delta$ 9-13) expostas a DMSO ou rapamicina. As setas indicam células que incorporaram BrdU, detectadas por Imunohistoquímica. Aumento de 400X.

A figura 21 ilustra o efeito da rapamicina sobre a proliferação de culturas organotípicas de queratinócitos normais e que expressam o oncogene E7 e suas formas mutadas E7E26G e E7CVQ68-70AAA. Através desta comparação foi possível notar que as culturas organotípicas de queratinócitos que expressam a proteína E7E26G (Figura 21E) apresentam perfil de proliferação mais parecido com culturas geradas a partir de queratinócitos normais (Figura 21A) do que com culturas de queratinócitos que expressam a oncoproteína E7 selvagem (Figura 21C).

A análise quantitativa revela que houve incorporação média de BrdU em 11,5% das células de culturas organotípicas geradas a partir de queratinócitos que expressam a forma mutada do gene E7 (E726G – incapaz de induzir a degradação de pRb). O tratamento com rapamicina promoveu uma inibição de proliferação por volta de 32%, onde os núcleos marcados totalizaram 7,8% de todos os núcleos contados ( $p=0,02$ ) (Figura 19).

O epitélio gerado por queratinócitos que expressam a proteína E7 contendo a mutação CVQ68-70AAA (capaz de induzir a degradação de pRb e incapaz de induzir proliferação em resposta a sinais de parada do ciclo celular) apresentou incorporação de BrdU em 30,1% dos núcleos celulares do tecido (Figura 21G e Figura 19). O tratamento destas culturas com rapamicina promoveu uma pequena diminuição do total de núcleos marcados (em torno de 25,6%) (Figura 21H e Figura 19) ( $p=0,18$ ).



**Figura 21.** Imagem de cortes transversais de culturas organotípicas de QPH contendo o vetor vazio pLXSN ou expressando a oncoproteína E7 de HPV-16 e suas formas mutadas E7E26G (incapaz de induzir a degradação de pRb) e CVQ68-70AAA (capaz de induzir a degradação de pRb e incapaz de induzir proliferação em resposta a sinais de parada do ciclo celular) expostas a DMSO ou rapamicina. As setas indicam células que incorporaram BrdU, detectadas por Imunohistoquímica. Aumento de 400X.

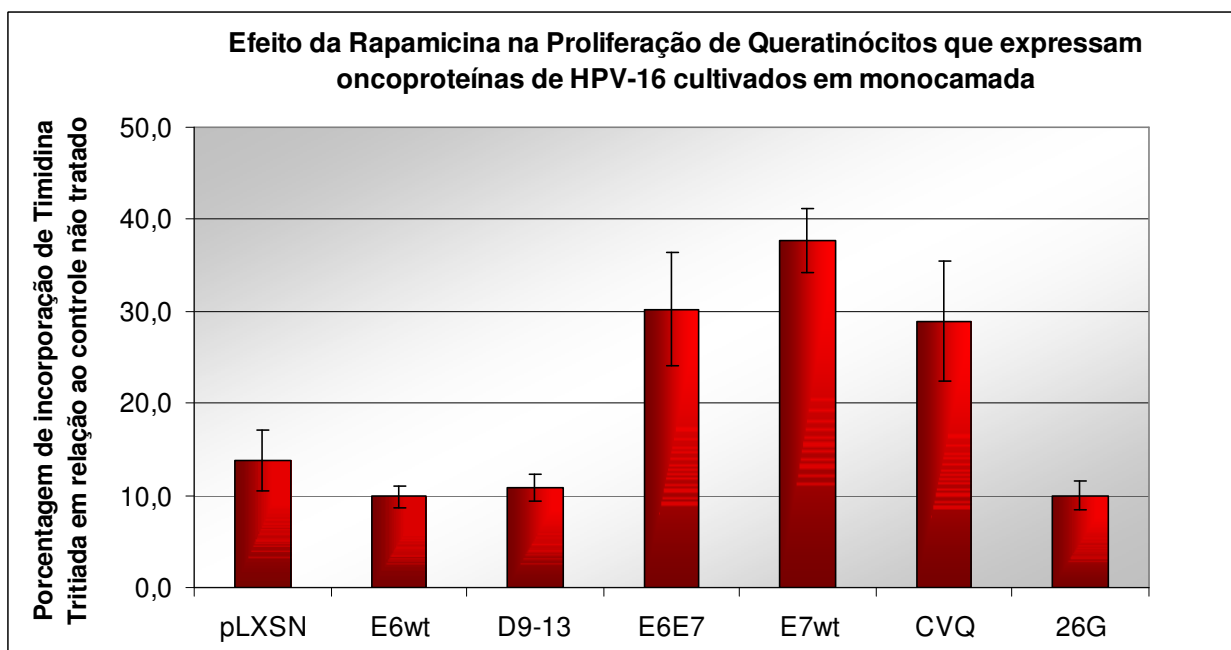


Pelo fato da oncoproteína E7 estar relacionada à resistência ao efeito antiproliferativo da rapamicina em culturas organotípicas de queratinócitos optamos por avaliar se a expressão deste oncogene poderia conferir resistência ao efeito antiproliferativo dessa droga em queratinócitos primários humanos cultivados em monocamada. Para isto cultivamos queratinócitos infectados com partículas retrovirais contendo os oncogenes de HPV-16 (E6, E7 e E6E7) e suas formas mutadas (E6 $\Delta$ 9-13, E7E26G e E7CVQ68-70AAA) por 60 horas na presença de rapamicina. O efeito da rapamicina na proliferação celular foi avaliado através de incorporação de timidina tritiada, adicionada ao meio de cultura das células 12h antes do final do tratamento.

Os resultados apresentados na figura 22 apontam que a expressão da oncoproteína E7 confere resistência ao efeito antiproliferativo da rapamicina em queratinócitos cultivados em monocamada. Após 60 horas de tratamento com a droga foi possível verificar que apenas 14% das células infectadas com partículas retrovirais contendo o vetor vazio pLXSN eram capazes de incorporar o nucleotídeo marcado radioativamente, indicando inibição de proliferação de mais de 85%. O tratamento com rapamicina promoveu inibição de proliferação de 90% das células que expressavam a oncoproteína E6, indicada pela incorporação de apenas 10% de timidina tritiada. Os queratinócitos que expressavam a forma mutada da oncoproteína E6 (E6 $\Delta$ 9-13 – incapaz de induzir a degradação de p53) apresentaram quase 11% de incorporação de timidina tritiada, indicando também uma inibição de proliferação de quase 90%. Já os queratinócitos infectados com partículas retrovirais contendo o oncogene E7 apresentaram-se quase 3 vezes mais resistentes à ação antiproliferativa da rapamicina do que queratinócitos contendo o vetor vazio pLXSN. Aproximadamente 38% das células foram capazes de incorporar timidina tritiada, mesmo após o tratamento por 60 horas com rapamicina. Isso indica uma inibição de proliferação de aproximadamente 62%. O mesmo efeito foi observado para queratinócitos que expressam ambas oncoproteínas de HPV-16



(E6E7). Aproximadamente 30% dos queratinócitos que expressavam E6 e E7 foram capazes de incorporar timidina tritiada, mesmo após o tratamento por 60 horas com rapamicina. Mesmo com inibição de proliferação de quase 70%, estes queratinócitos foram capazes de proliferar duas vezes mais do que queratinócitos que continham o vetor vazio pLXSN. Em queratinócitos que expressavam a forma mutada do gene E7 (CVQ68-70AAA – capaz de induzir a degradação de pRb e incapaz de induzir proliferação em resposta à sinais de parada do ciclo celular) a proliferação foi 10% menor do que a observada para a forma selvagem deste gene (em torno de 28%). Ainda assim, os queratinócitos infectados com esta forma mutada de E7 apresentaram-se duas vezes mais resistentes ao efeito antiproliferativo da rapamicina do que queratinócitos contendo o vetor vazio. Contrariamente ao observado para o gene E7 selvagem, a expressão da forma mutada do gene E7 (E7E26G – incapaz de induzir a degradação de pRb) não conferiu resistência ao efeito antiproliferativo da rapamicina. De fato, a incorporação de timidina tritiada em queratinócitos expressando essa forma mutada de E7 foi de aproximadamente 10%, indicando inibição de proliferação de 90% após o tratamento por 60 horas com rapamicina.

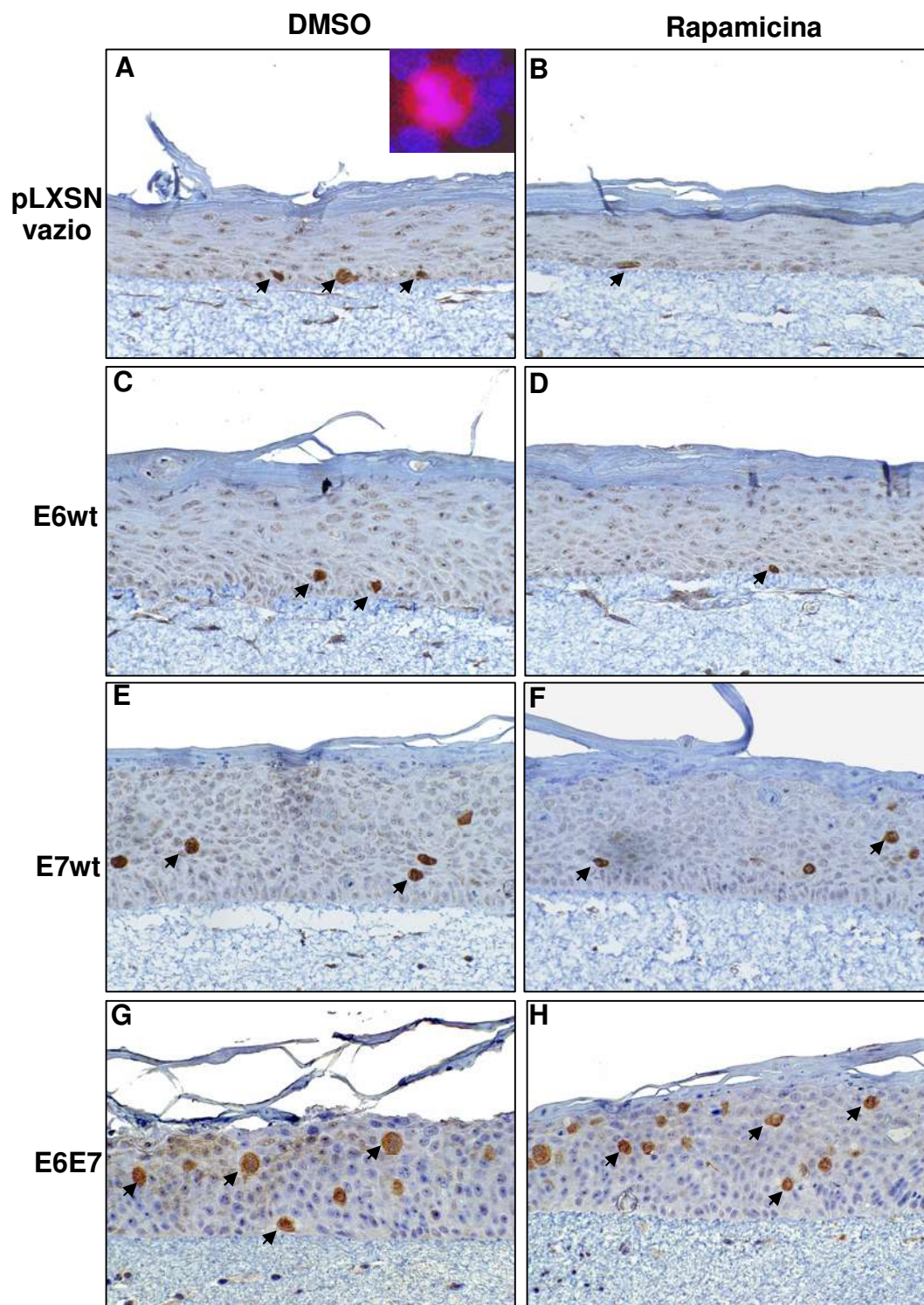


**Figura 22.** Avaliação de proliferação através de incorporação de timidina tritiada em QPH infectados com os vetores retrovirais pLXSN contendo ou não as oncoproteínas de HPV-16 (E6, E7 e E6E7), bem com suas formas mutadas E6 $\Delta$ 9-13 (incapaz de induzir a degradação de p53), E7E26G (incapaz de induzir a degradação de pRb) e E7CVQ68-70AAA (incapaz de induzir proliferação em resposta à sinais de parada do ciclo celular). Resultados de 3 experimentos independentes.

## **5. A expressão da oncoproteína E7 de HPV-16 impede que a proteína mTOR tenha sua atividade inibida por ação da Rapamicina.**

Para avaliar o papel da oncoproteína E7 na indução de resistência ao efeito antiproliferativo da rapamicina decidimos investigar o nível de fosforilação das proteínas de controle de tradução eIF4G1 e 4EBP1. Estas proteínas são alvos efetores da proteína mTOR e seu nível de fosforilação pode ser correlacionado com a inibição desta proteína por ação da rapamicina.

A avaliação de fosforilação da proteína 4EBP1 (ser 65) nas culturas organotípicas de queratinócitos normais ou infectados com o vetor vazio indica que as células que apresentam marcação positiva estão localizadas na camada basal do epitélio (Figura 23A). Também é possível constatar que esta proteína encontra-se predominantemente no citoplasma de células que estão em processo de divisão celular (Figura 23A – detalhe). Após o tratamento com rapamicina as células positivas para este marcador foram raramente visualizadas (Figura 23B). Isto indica que em culturas organotípicas de queratinócitos contendo o vetor vazio pLXSN a rapamicina foi capaz de inibir a atividade da proteína mTOR. O mesmo foi observado para a proteína E6 de HPV-16 (Figuras 23C e D). Em culturas organotípicas de queratinócitos que expressam a oncoproteína E7 de HPV-16 as células que apresentam marcação positiva para este marcador encontram-se predominantemente nas camadas suprabasais (Figura 23E). Além disso, o tratamento com rapamicina aparentemente não promoveu uma diminuição do número de células marcadas (Figura 23F). O mesmo foi observado para culturas organotípicas de queratinócitos que expressam ambas oncoproteínas de HPV-16. Contudo, algumas células deste tecido apresentaram marcação positiva para este marcador na camada basal (Figura 23G). O tratamento com rapamicina aparentemente também não diminuiu a quantidade de células marcadas (Figura 23H).



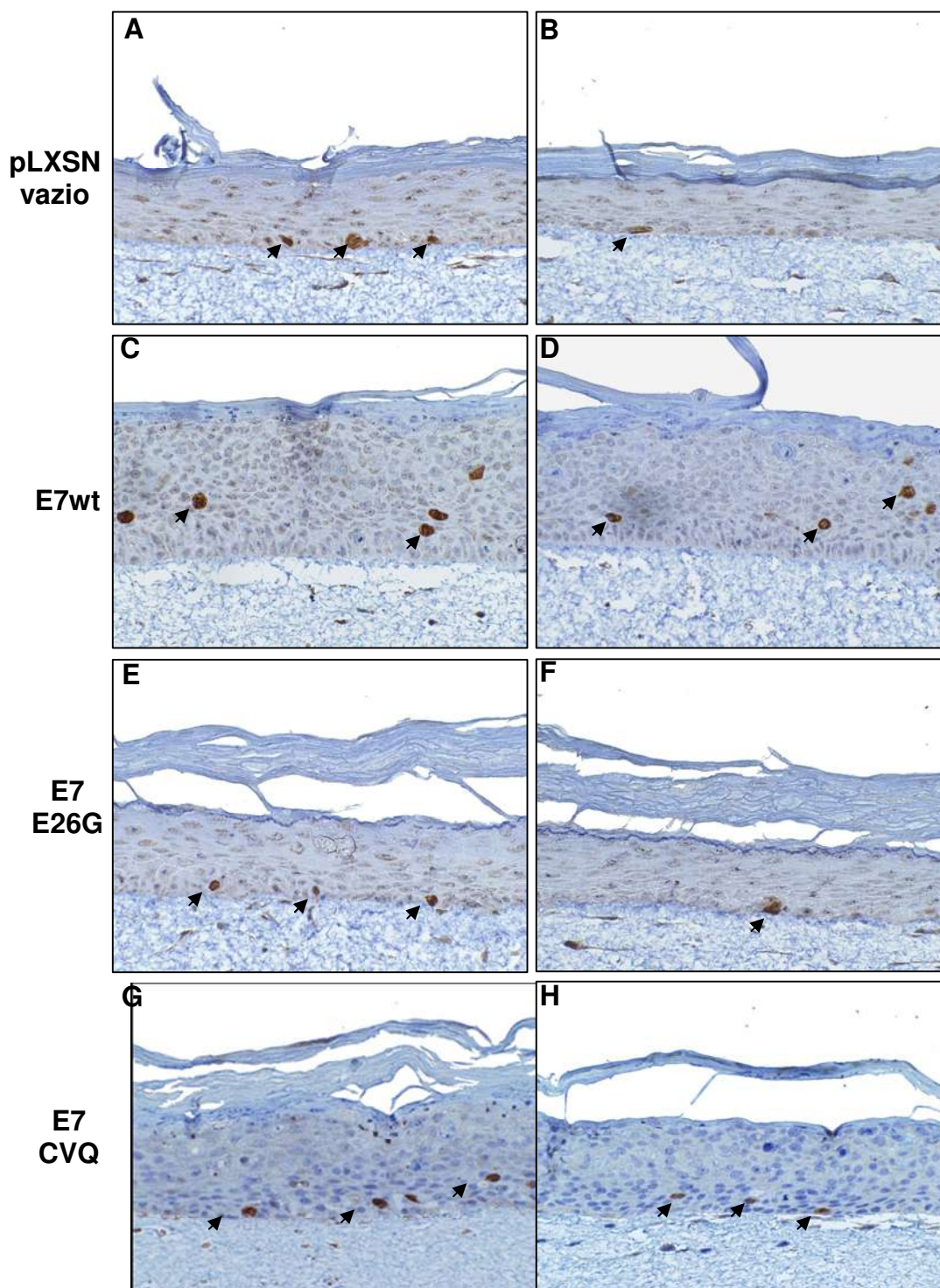
**Figura 23.** Imagem de cortes transversais de culturas organotípicas de QPH contendo o vetor vazio pLXSN ou expressando as oncoproteínas de HPV-16 expostos a DMSO ou rapamicina. As setas indicam células com marcação positiva para a proteína 4EBP1 fosforilada (ser 65), detectadas por Imunohistoquímica. A figura A apresenta em detalhe uma célula com marcação para a proteína 4EBP1 fosforilada identificada por imunofluorescência. Contracoloração: Dapi. Aumento de 400X.

A forma mutada da oncoproteína E7 (E7E26G – incapaz de induzir a degradação de pRb) apresentou marcação semelhante à observada para culturas de queratinócitos contendo o vetor vazio (Figura 24E). O tratamento com rapamicina tornou muito rara a identificação de células positivas para este marcador (Figura 24F). Já a forma mutada do gene E7 (E7CVQ68-70AAA – capaz de induzir a degradação da proteína pRb e incapaz de induzir proliferação em resposta a sinais de parada do ciclo celular) apresentou marcação localizada predominantemente na camada basal, com algumas células marcadas nas camadas suprabasais (Figura 24G). O tratamento com rapamicina aparentemente não alterou a localização das células com marcação positiva para a proteína 4EBP1 fosforilada (Figura 24H).

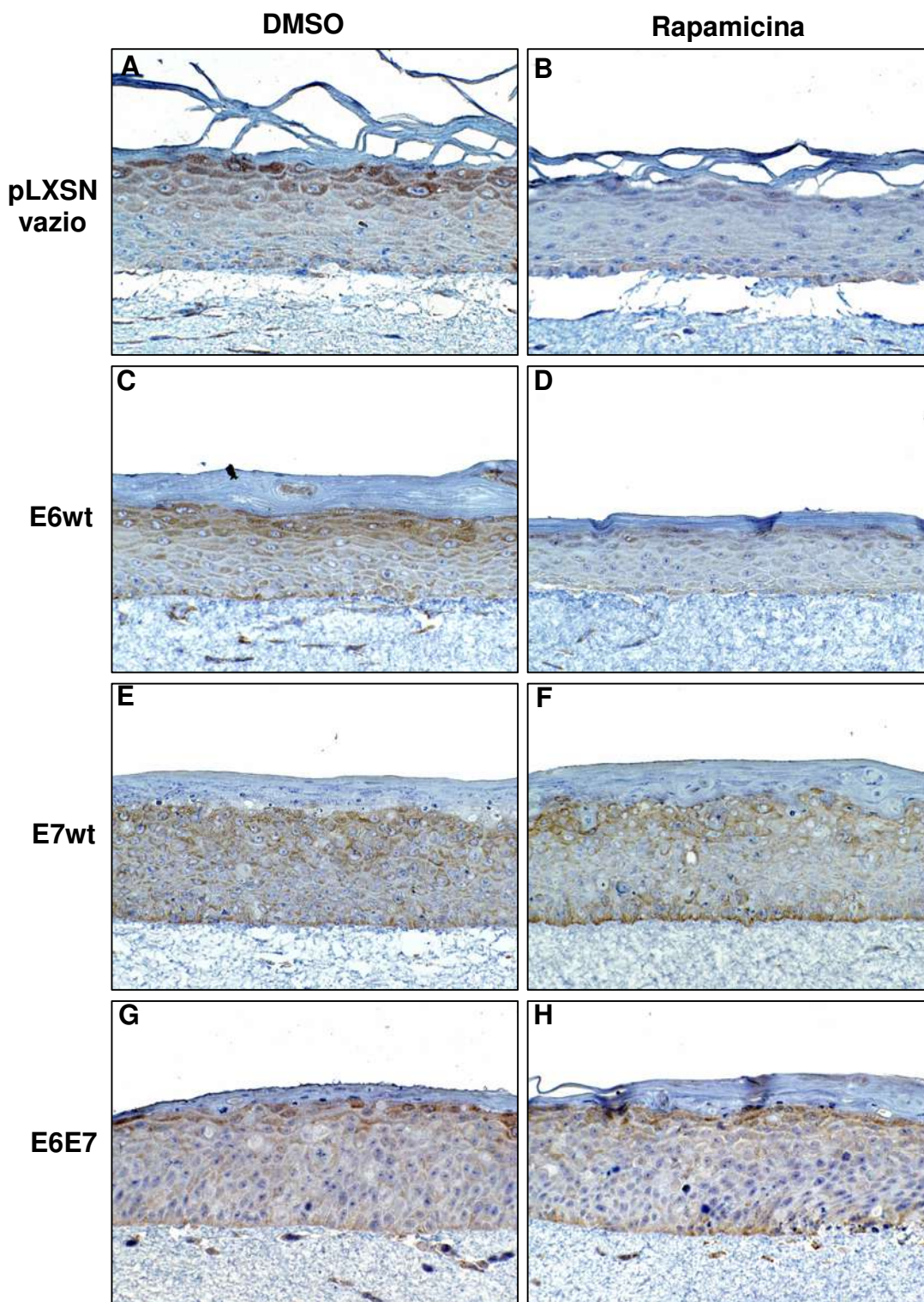
Contudo, o fato das culturas organotípicas apresentarem poucas células positivas para a proteína 4EBP1 fosforilada não permite uma avaliação qualitativa adequada. Dessa forma optamos pela utilização de mais um marcador para avaliar se a rapamicina era capaz de inibir a atividade da proteína mTOR, a proteína eIF4G1 fosforilada (ser 1188).

A figura 25 ilustra que a proteína eIF4G1 fosforilada localiza-se no citoplasma das células. Além disso, podemos verificar que em culturas organotípicas de queratinócitos contendo o vetor vazio a marcação torna-se mais proeminente na camada granulosa do epitélio (Figura 25A). Após o tratamento com rapamicina é possível notar que essa marcação diminui consideravelmente (Figura 25B). O mesmo é observado para as culturas de queratinócitos que expressam a oncoproteína E6 (Figuras 25C e D).





**Figura 24.** Imagem de cortes transversais de culturas organotípicas de QPH contendo o vetor vazio pLXSN ou expressando a oncoproteína E7 de HPV-16 e suas formas mutadas E7E26G (incapaz de induzir a degradação de pRb) e CVQ68-70AAA (capaz de induzir a degradação de pRb e incapaz de induzir proliferação em resposta a sinais de parada do ciclo celular, expostos a DMSO ou Rapamicina. As setas indicam células com marcação positiva para a proteína 4EBP1 fosforilada (ser 65), detectadas por Imunohistoquímica. Aumento de 400X.

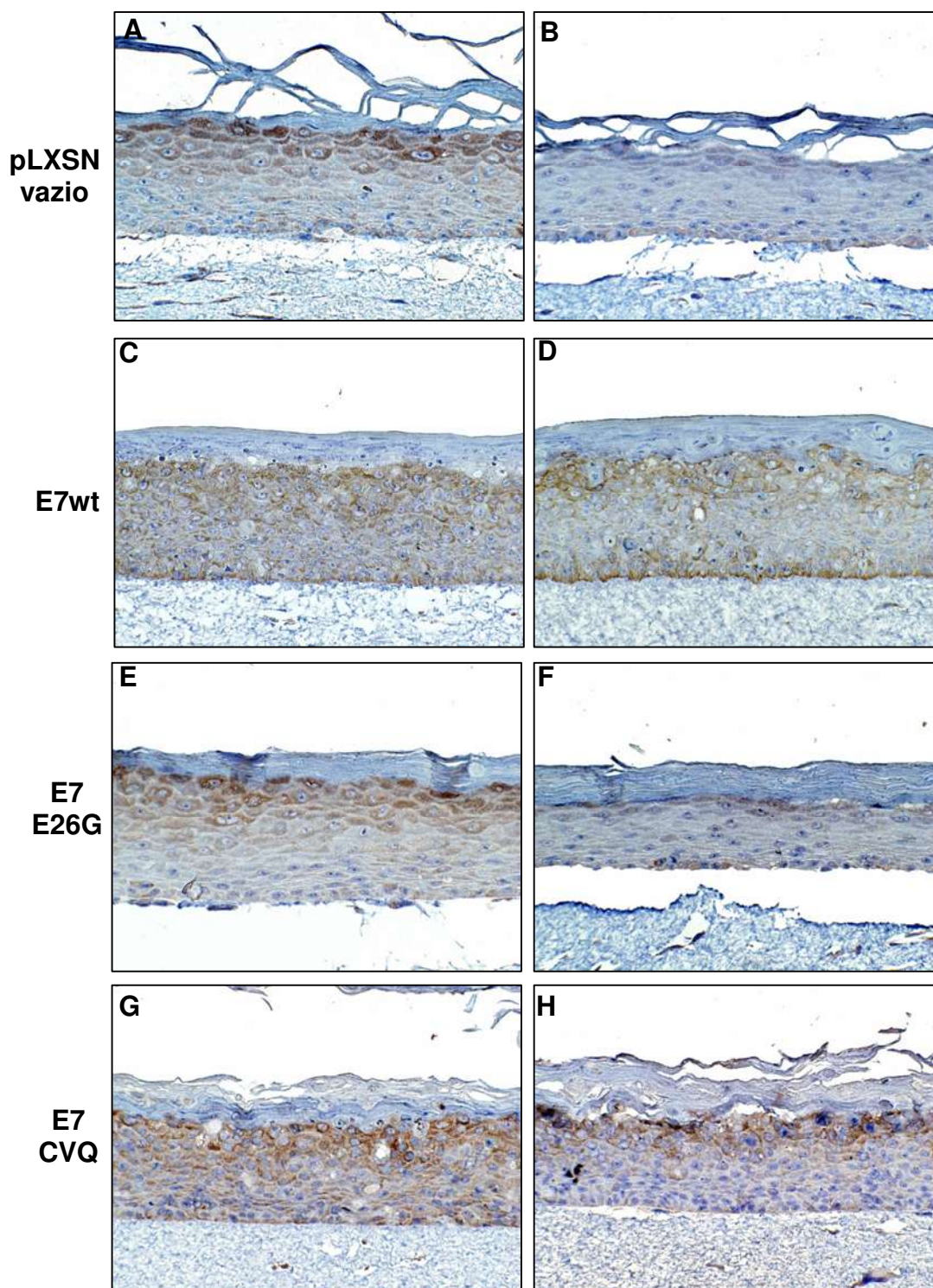


**Figura 25.** Imagem de cortes transversais de culturas organotípicas de QPH contendo o vetor vazio pLXSN ou expressando as oncoproteínas de HPV-16 tratados com DMSO ou rapamicina. A marcação citoplasmática representa células onde a proteína eIF4G1 fosforilada (ser1188) foi detectada por imunohistoquímica. Aumento de 400X.

Em culturas organotípicas de queratinócitos que expressam a oncoproteína E7 não é possível a identificação de uma camada de células onde a marcação é mais evidente (Figura 25E). Isso se deve ao fato da identificação de camadas neste epitélio ser limitada pela desorganização geral do tecido, relacionada à expressão de E7. O tratamento destas culturas com rapamicina não promoveu uma diminuição de marcação como observada para culturas organotípicas de queratinócitos contendo o vetor vazio (Figura 25F). De fato, apesar da marcação ser menos acentuada na região central do tecido, podemos observar um aumento da fosforilação de eIF4G1 na camada basal deste epitélio. Isso indica que a expressão da oncoproteína E7 impede que a rapamicina iniba a atividade da proteína mTOR. Esta observação também é compartilhada para culturas organotípicas de queratinócitos que expressam ambas oncoproteínas de HPV-16 em conjunto (Figura 25G e H).

A figura 26 indica as alterações induzidas pela expressão da oncoproteína E7 mutada nas regiões que interferem na sua capacidade de degradar a proteína pRb (E726G) e na sua capacidade de induzir parada do ciclo celular em resposta ao dano ao DNA ou estresse genotóxico (E7CVQ68-70AAA). A marcação de eIF4G1 fosforilada observada em culturas de queratinócitos contendo a forma E726G indica expressão muito semelhante ao observado para culturas de queratinócitos contendo o vetor vazio (Figura 26E). O tratamento com rapamicina também induz o mesmo efeito observado para queratinócitos que não contem oncogenes de HPV-16 (Figura 26F). Já a proteína E7CVQ68-70AAA apresentou marcação semelhante ao observado para queratinócitos que continham a forma selvagem do oncogene E7 (Figura 26G). Contudo, após o tratamento com rapamicina não foi mais possível identificar a marcação positiva na camada basal (Figura 26H) observada no epitélio contendo a proteína E7 selvagem tratado com rapamicina (Figura 26D).



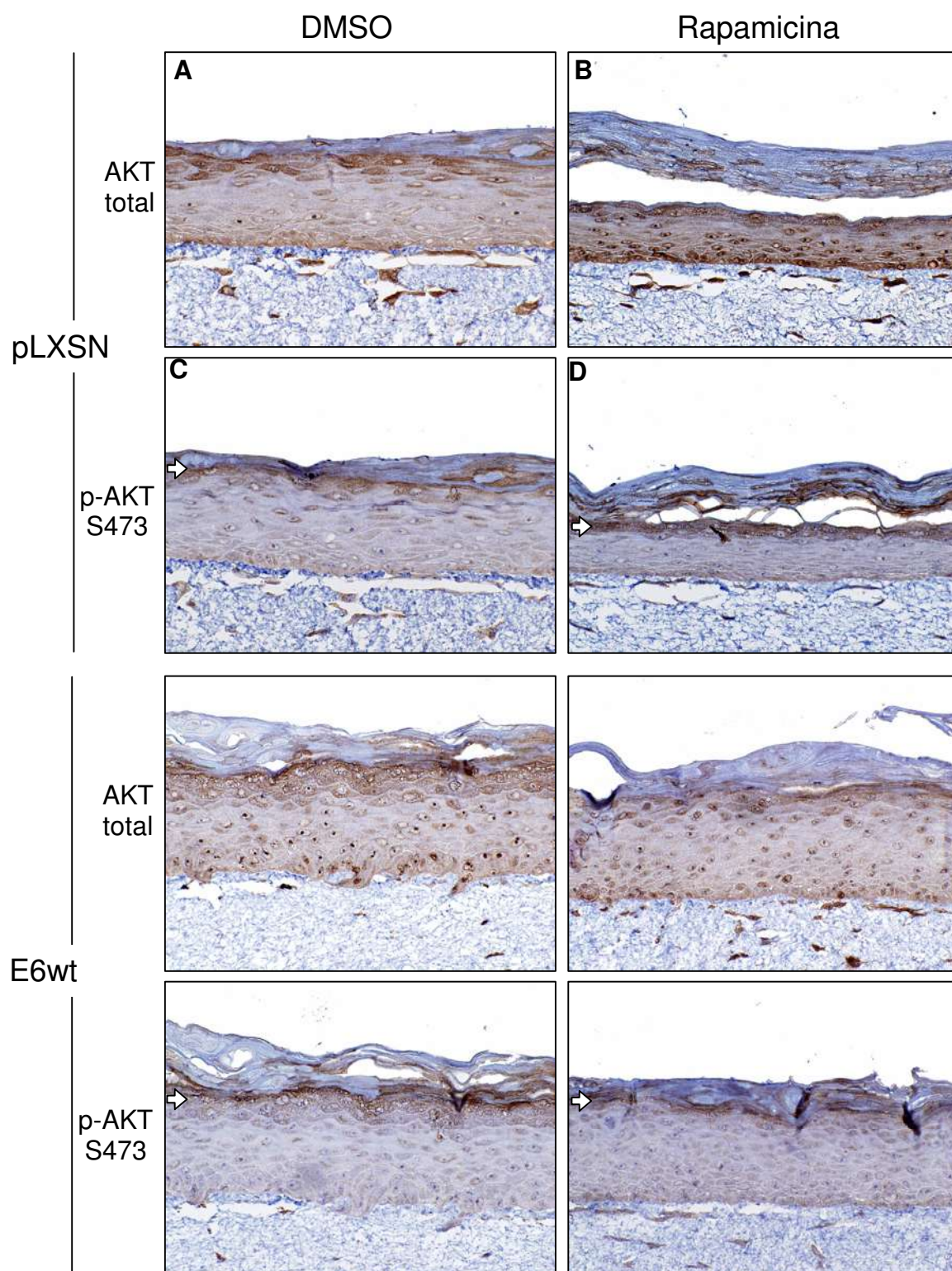


**Figura 26.** Imagem de cortes transversais de culturas organotípicas de QPH contendo o vetor vazio pLXSN ou expressando a oncoproteína E7 de HPV-16 e suas formas mutadas E7E26G (incapaz de induzir a degradação de pRb) e CVQ68-70AAA (capaz de induzir a degradação de pRb e incapaz de induzir proliferação em resposta a sinais de parada do ciclo celular, tratados com DMSO ou Rapamicina. A marcação citoplasmática representa células onde a proteína eIF4G1 fosforilada (ser1188) foi detectada por imunohistoquímica. Aumento de 400X.

## **6. A oncoproteína E7 pode conferir resistência ao efeito antiproliferativo da rapamicina por interferir na fosforilação da proteína AKT.**

A sensibilidade à rapamicina vem sendo correlacionada à ativação da proteína AKT (revisado por FAVRE *et al.*, 2006). Dessa forma, optamos por avaliar o nível de fosforilação desta proteína no resíduo de serina 473 nas culturas organotípicas de queratinócitos que expressam as oncoproteínas de HPV-16. Além disso, como a localização da proteína AKT pode variar dependendo da sua ativação optamos também por avaliar a localização da forma não fosforilada desta proteína.

A figura 27 apresenta os resultados obtidos em culturas organotípicas de queratinócitos contendo o vetor vazio pLXSN. As figuras 27A e B ilustram a marcação para a proteína AKT total em amostras de culturas submetidas a DMSO e rapamicina. Através da marcação é possível constatar que esta proteína localiza-se por todo epitélio, tanto no núcleo quanto no citoplasma das células. Também é possível notar que na região da camada granulosa as células apresentam marcação citoplasmática mais acentuada. As figuras 27C e D ilustram a forma fosforilada da proteína AKT. Através dessa marcação é possível constatar que a marcação ocorre predominantemente na região da camada granulosa. Além disso, podemos observar que a proteína fosforilada tem localização preferencialmente citoplasmática. As figuras 27E e F ilustram a marcação para a proteína AKT total em culturas de queratinócitos que expressam a oncoproteína E6 submetidas ao tratamento com DMSO e rapamicina. A marcação observada apresenta as mesmas características descritas para o epitélio gerado a partir de queratinócitos contendo o vetor vazio. O mesmo é observado para a forma fosforilada da proteína AKT, cuja marcação é representada nas figuras 27G e H.

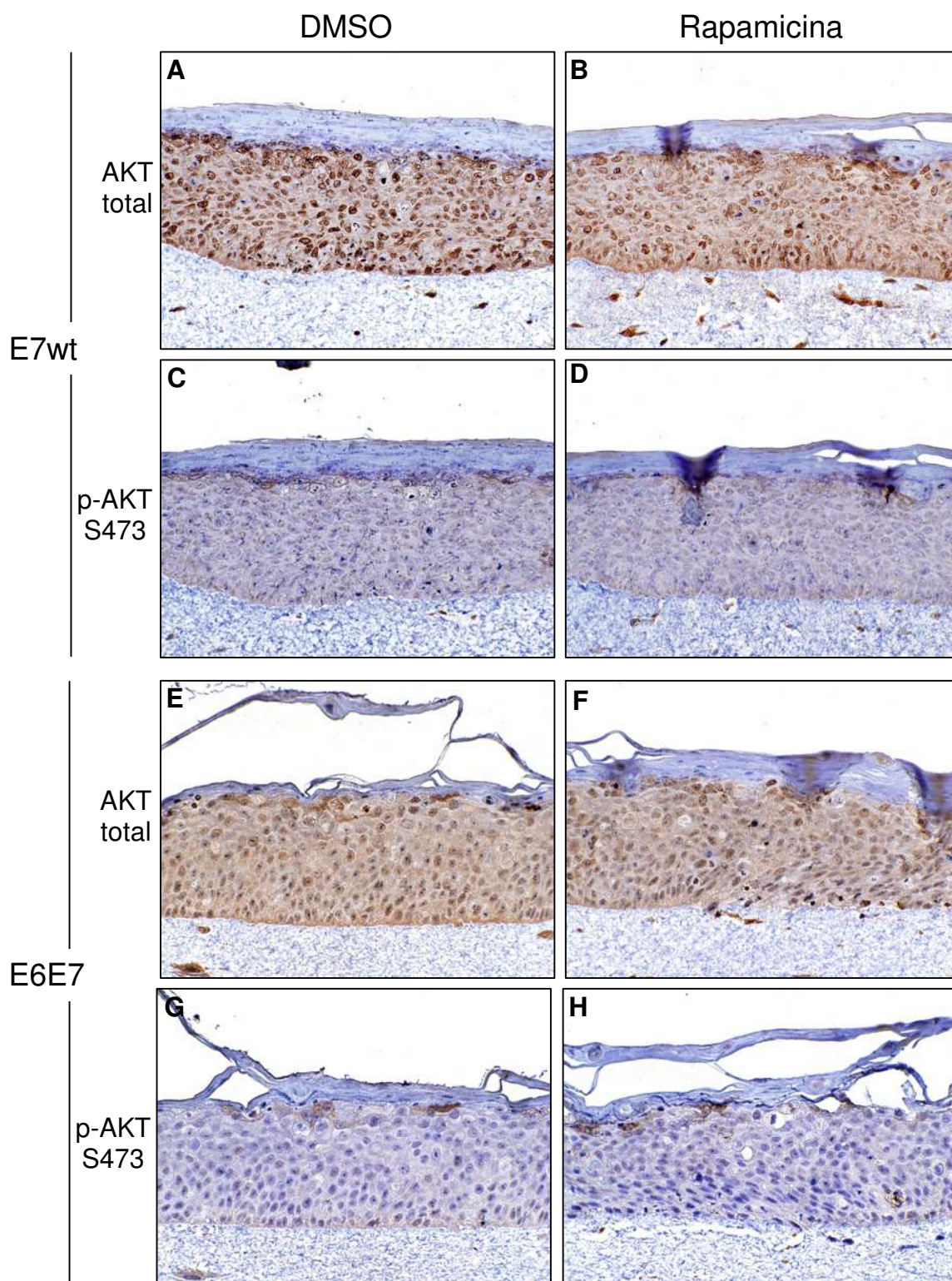


**Figura 27.** Imagem de cortes transversais de culturas organotípicas de QPH contendo o vetor vazio pLXSN ou expressando a oncoproteína E6 de HPV-16 expostos a DMSO ou rapamicina. A marcação observada representa células onde a proteína AKT total ou AKT fosforilada (ser473) foi detectada por imunohistoquímica. As setas brancas indicam onde a marcação para a proteína AKT fosforilada é mais evidente. Aumento de 400X.



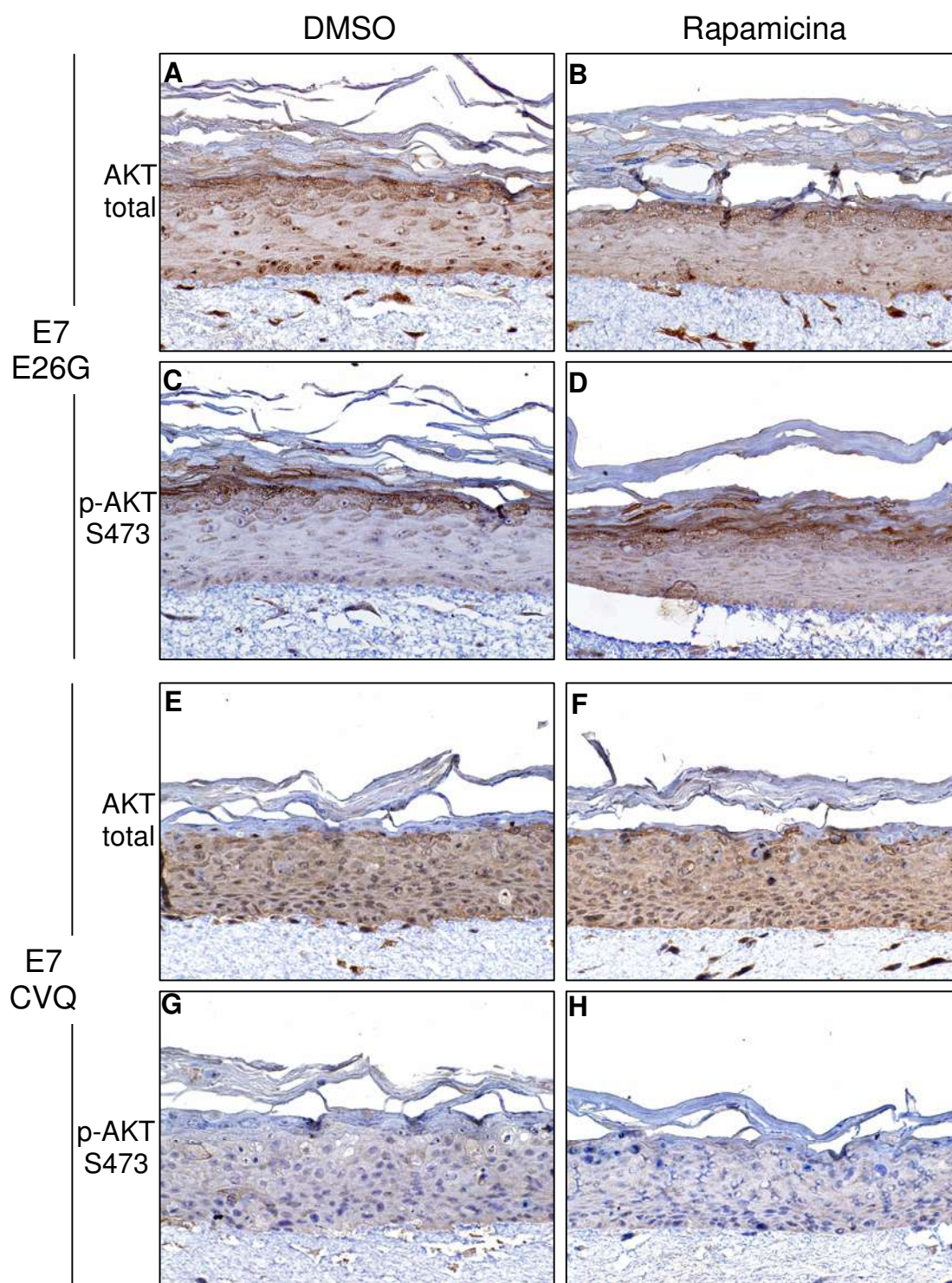
A figura 28 apresenta os resultados obtidos em culturas organotípicas de queratinócitos contendo a oncoproteína E7 de HPV-16 sozinha ou em conjunto com a oncoproteína E6. As figuras 28A e B ilustram a marcação para a proteína AKT total em amostras de culturas submetidas a DMSO e rapamicina. Através da marcação é possível constatar que esta proteína também localiza-se por todo epitélio, tanto no núcleo quanto no citoplasma das células. O tratamento com rapamicina não alterou a distribuição desta proteína pelo tecido. As figuras 28C e D ilustram o resultado da imunohistoquímica para a forma fosforilada da proteína AKT em cortes de culturas tratadas com DMSO ou rapamicina. Através desta análise foi possível constatar que a forma fosforilada da proteína AKT apresenta-se de maneira muito sutil pelo citoplasma das células. As figuras 28E e F ilustram a marcação para a proteína AKT total. Através da marcação é possível constatar que a esta proteína distribui-se de maneira muito homogênea pelo núcleo e pelo citoplasma das células. As figuras 28G e H, por outro lado mostram que a forma fosforilada desta proteína é identificada em um número muito pequeno de células localizadas na região subbasal do epitélio, na região que corresponderia à camada granulosa se esta fosse passível de identificação neste tecido. Esta marcação é predominantemente citoplasmática.

As figuras 29 A, B, C e D apontam a marcação da forma total da proteína AKT em queratinócitos contendo a forma de E7 incapaz de induzir a degradação de pRb (E7E26G). O resultado obtido tanto para a forma total quanto para a forma fosforilada de AKT, é semelhante àquele observado para as culturas de queratinócitos que expressam o vetor vazio. A forma mutada da proteína E7 que é capaz de induzir a degradação de pRb mas não é capaz de induzir proliferação em resposta à sinais de parada do ciclo celular (E7CVQ68-70AAA) apresenta as mesmas características indicadas para as culturas que expressam a proteína E7 selvagem (Figuras 29 E, F, G e H).



**Figura 28.** Imagem de cortes transversais de culturas organotípicas de QPH expressando a oncoproteína E7 de HPV-16 sozinha ou em conjunto com a oncoproteína E6, expostos a DMSO ou Rapamicina. A marcação observada representa células onde a proteína AKT total ou AKT fosforilada (ser473) foi detectada por imunohistoquímica. Aumento de 400X.



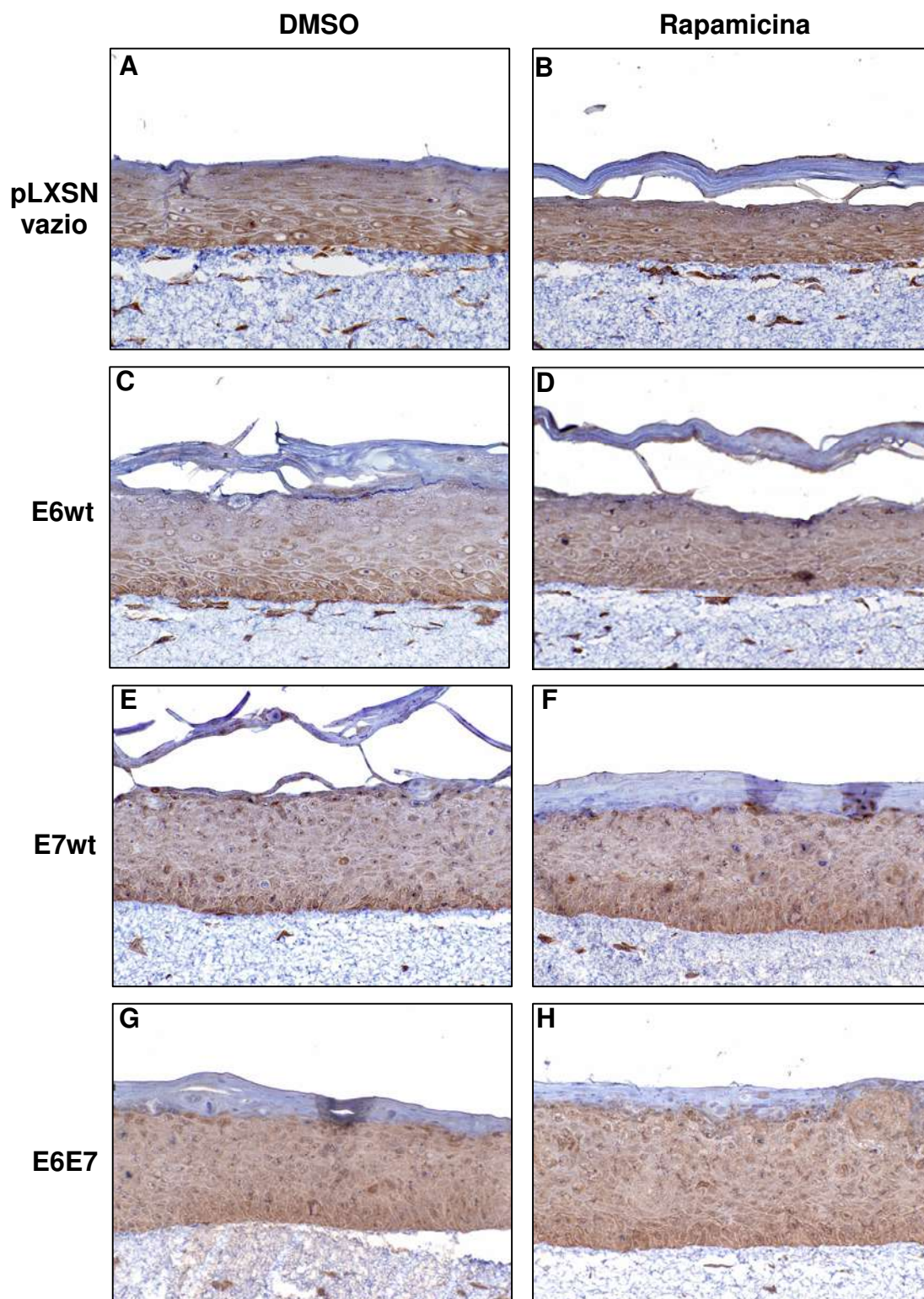


**Figura 29.** Imagem de cortes transversais de culturas organotípicas de QPH expressando as formas mutadas de E7: E7E26G (incapaz de induzir a degradação de pRb) e CVQ68-70AAA (capaz de induzir a degradação de pRb e incapaz de induzir proliferação em resposta a sinais de parada do ciclo celular, tratados com DMSO ou Rapamicina. A marcação observada representa células onde a proteína AKT total ou AKT fosforilada (ser473) foi detectada por imunohistoquímica. Aumento de 400X.

## **7. A expressão das oncoproteínas de HPV-16 não altera os níveis totais das proteínas 4EBP1, eIF4E e eIF4G1 e em culturas organotípicas de queratinócitos.**

A baixa expressão da proteína 4EBP1 foi correlacionada à resistência ao efeito antiproliferativo da rapamicina por Dilling e colaboradores (2002). Diante deste fato optamos por avaliar se os níveis totais desta proteína poderiam estar alterados em células que expressam as oncoproteínas de HPV-16, mais precisamente a oncoproteína E7.

A figura 30 ilustra o resultado obtido em culturas organotípicas de queratinócitos que apresentam o vetor vazio pLXSN e que expressam as oncoproteínas E6 e E7, isoladamente ou em conjunto. Através da marcação observada podemos concluir que a proteína é expressa de maneira homogênea por todo epitélio. Além disso, a expressão desta proteína em queratinócitos de culturas organotípicas é predominantemente citoplasmática. Através do resultado obtido foi possível concluir que a expressão das oncoproteínas de HPV-16 não altera a expressão de 4EBP1 em culturas organotípicas quando comparadas àquelas geradas por queratinócitos contendo o vetor vazio.

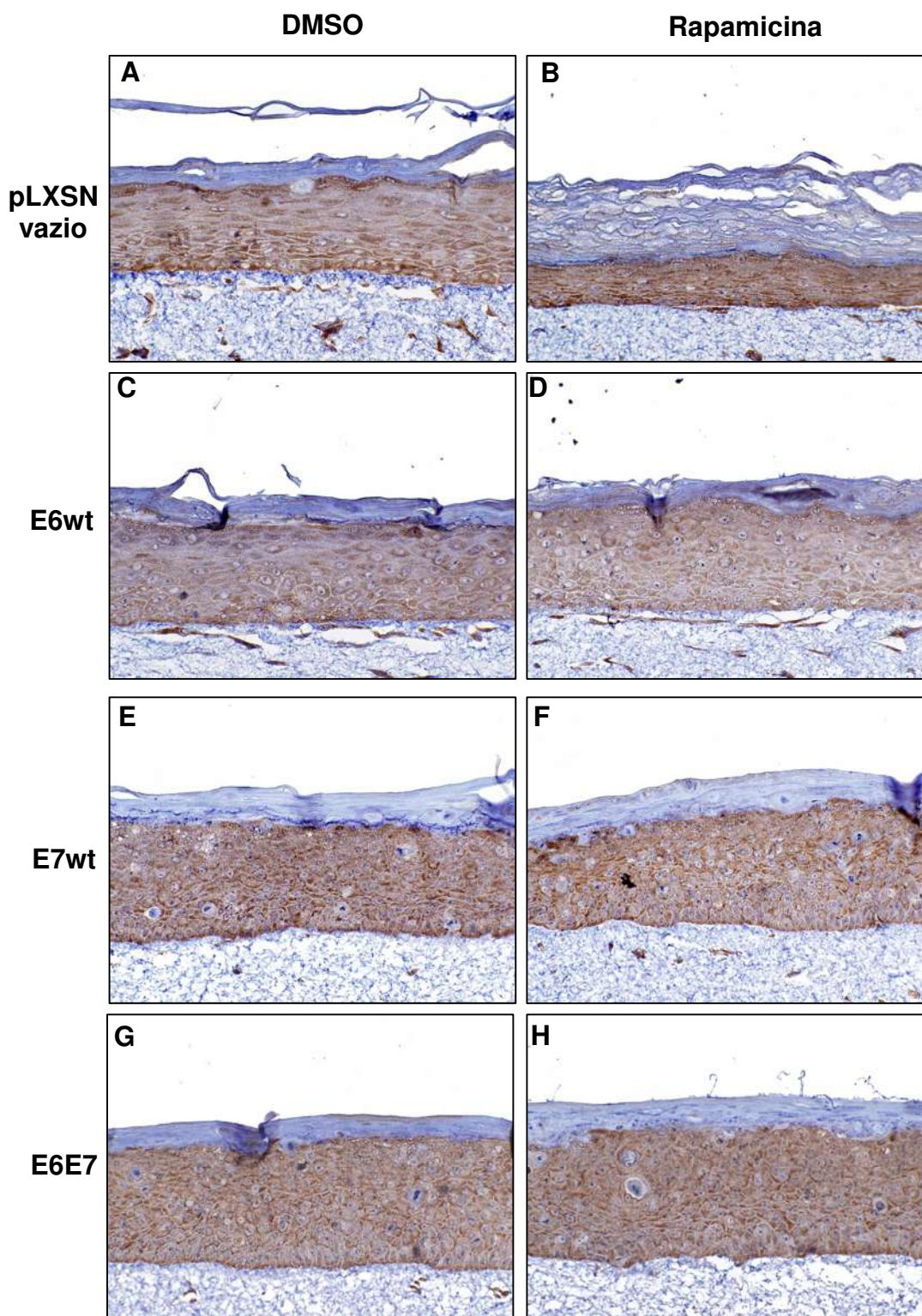


**Figura 30.** Imagem de cortes transversais de culturas organotípicas de QPH contendo o vetor vazio pLXSN ou expressando as oncoproteínas de HPV-16 expostos a DMSO ou rapamicina. A marcação observada representa células onde a proteína 4EBP1 total foi detectada por imunohistoquímica. Aumento de 400X.



A superexpressão do fator de tradução eIF4E tem sido observada em diversas neoplasias incluindo as de bexiga (CREW, *et al.*, 2000), mama (KEREKATTE, *et al.*, 1995), cólon (ROSENWALD, *et al.*, 1999), próstata (WILLIAMS, *et al.*, 1998), cabeça e pescoço (NATHAN, *et al.*, 1997) e colo uterino (MATTHEUS-GREER *et al.*, 2005; TURBAT-HERRERA, *et al.*, 1999). Diante deste fato optamos por avaliar se a expressão das oncoproteínas de HPV-16 em culturas organotípicas de queratinócitos poderia interferir nos níveis deste fator de tradução.

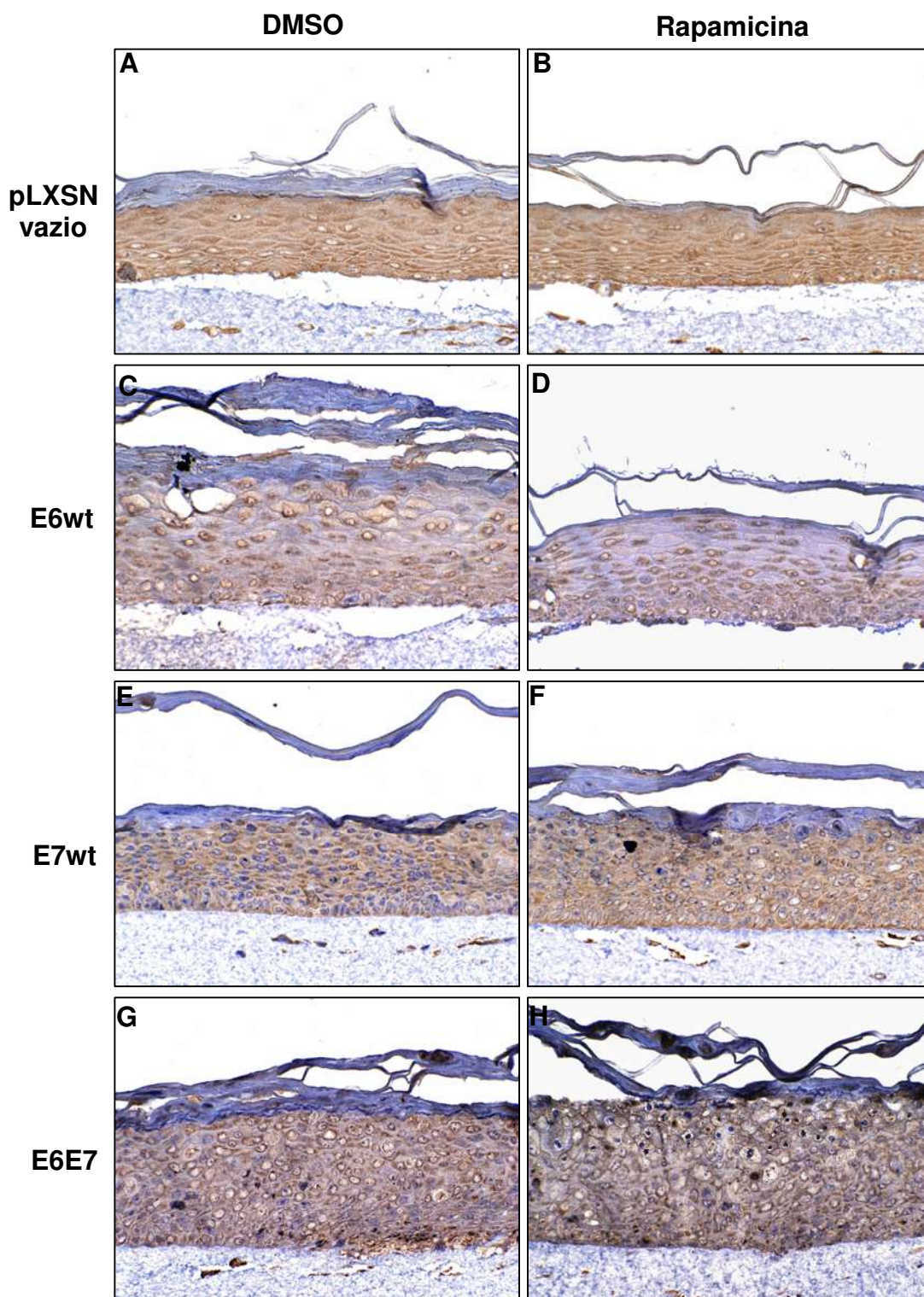
O resultado apresentado na figura 31 ilustra que esta proteína apresenta expressão homogênea por todo epitélio. Além disso, a expressão desta proteína em queratinócitos de culturas organotípicas é predominantemente citoplasmática. Através da comparação entre as culturas geradas a partir de queratinócitos contendo o vetor vazio e queratinócitos contendo as oncoproteínas de HPV-16 foi possível constatar que não ocorrem alterações dos níveis desta proteína nos diferentes tecidos. O tratamento com rapamicina também não promoveu alterações dos níveis deste fator de tradução.



**Figura 31.** Imagem de cortes transversais de culturas organotípicas de QPH contendo o vetor vazio pLXSN ou expressando as oncoproteínas de HPV-16 expostos a DMSO ou rapamicina. A marcação observada representa células onde a proteína eIF4E total foi detectada por imunohistoquímica. Aumento de 400X.

A expressão artificial de eIF4G1 em fibroblastos murinos da linhagem NIH3T3 induze o seu crescimento independente de ancoragem e indução de tumores em camundongos atímicos (FUKUCHI-SHIMOGORI *et al.*, 1997). Além disso, esta proteína encontra-se normalmente em altos níveis em amostras de carcinoma de células escamosas do pulmão (BAUER *et al.*, 2001; BAUER *et al.*, 2002). Para verificar se esta proteína poderia ser encontrada em altos níveis em culturas organotípicas de queratinócitos expressando os oncogenes de HPV-16 optamos por avaliar sua expressão através de imunohistoquímica.

O resultado apresentado na figura 32 ilustra que esta proteína apresenta expressão homogênea por todo epitélio. Além disso, a expressão desta proteína em queratinócitos de culturas organotípicas é predominantemente citoplasmática. Através da comparação entre as culturas geradas a partir de queratinócitos contendo o vetor vazio e queratinócitos contendo as oncoproteínas de HPV-16 foi possível constatar que não ocorrem alterações dos níveis desta proteína nos diferentes tecidos. O tratamento com rapamicina também não promoveu alterações dos níveis deste fator de tradução.



**Figura 32.** Imagem de cortes transversais de culturas organotípicas de QPH contendo o vetor vazio pLXSN ou expressando as oncoproteínas de HPV-16 expostos a DMSO ou rapamicina. A marcação observada representa células onde a proteína eIF4G1 total foi detectada por imunohistoquímica. Aumento de 400X.

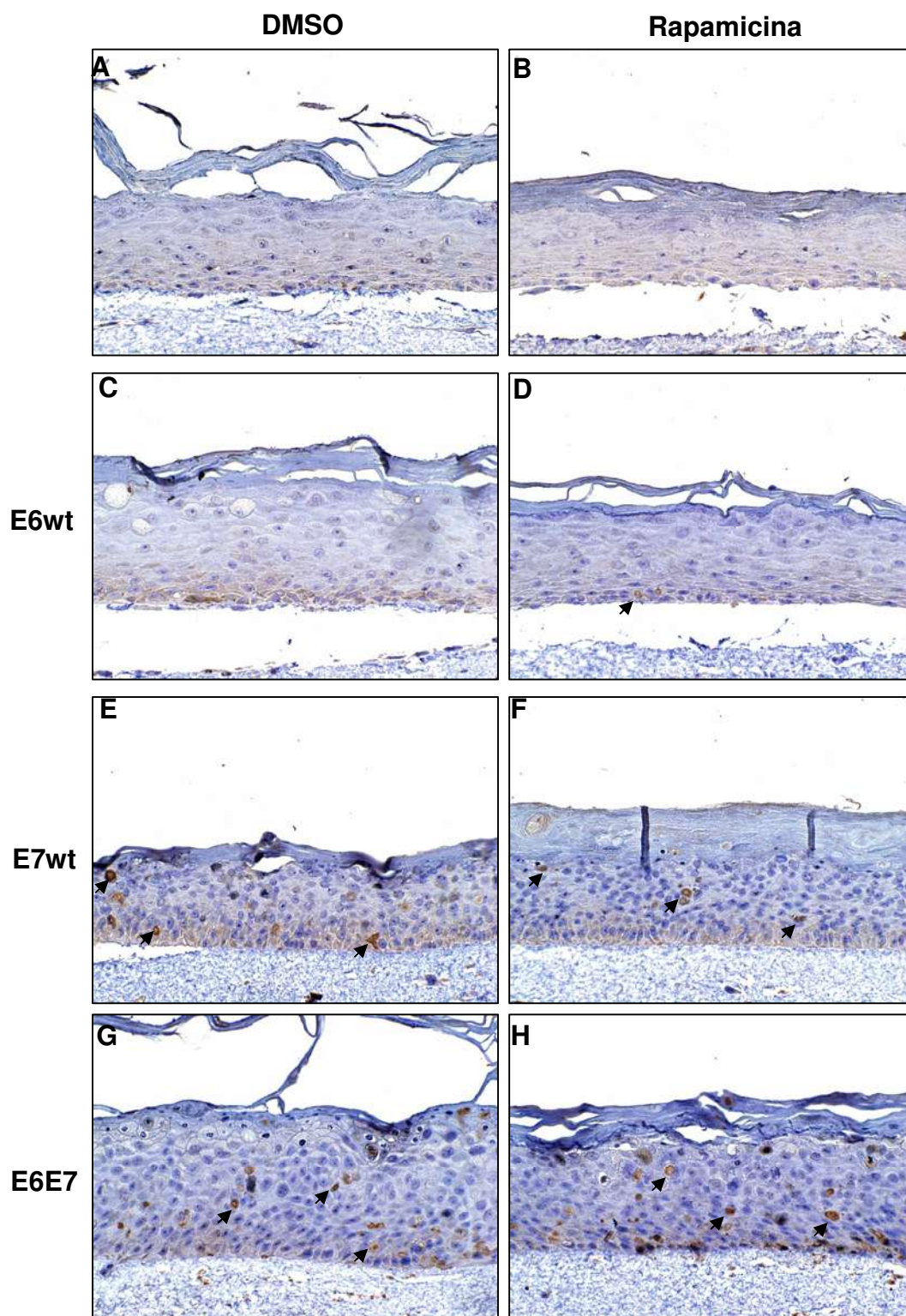


## **8. A Rapamicina não é capaz de induzir apoptose em queratinócitos de culturas organotípicas que expressam oncogenes de HPV-16.**

A ativação de caspase-3 é um dos mecanismos centrais que regulam o processo apoptótico (THORNBERRY & LAZEBNIK, 1998). Através de sua ativação, a caspase 3 é capaz de induzir a clivagem proteolítica de várias proteínas celulares tais como PARP (poli ADP-ribose polimerase) e induzir apoptose de maneira irreversível (TYAS *et al.*, 2000). A detecção de caspase-3 ativada por imunohistoquímica vem sendo amplamente utilizada na detecção de apoptose (DiCUNTO *et al.*, 2000; GOWN & WILLINGHAM, 2002; OLNEY *et al.*, 2002) e foi utilizada nos cortes de culturas organotípicas de queratinócitos para verificar se a rapamicina era capaz de induzir apoptose em queratinócitos que expressam os oncogenes de HPV-16.

A figura 33 apresenta a marcação para caspase-3 ativada em cortes de culturas organotípicas de queratinócitos que expressam as oncoproteínas de HPV-16 antes e após o tratamento com rapamicina. Através da identificação de corpúsculos apoptóticos foi possível evidenciar que a rapamicina não promoveu um aumento dos níveis de apoptose nas culturas organotípicas de queratinócitos normais (Figura 33 A e B). Através da contagem de corpúsculos apoptóticos em relação ao número total de núcleos, em um corte histológico de cultura organotípica de queratinócitos contendo o vetor vazio, foi possível constatar que células apoptóticas eram raramente identificadas. De fato, aproximadamente 1% das células totais apresentavam marcação positiva para a forma ativada de caspase-3, tanto nas culturas expostas a DMSO ou rapamicina. A expressão da oncoproteína E6 também não tornou os queratinócitos de culturas organotípicas mais sensíveis à possível ação citotóxica da rapamicina (Figura 33C e D). A quantificação revelou que aproximadamente 3% das células apresentavam morfologia apoptótica antes e após o tratamento com a droga. A expressão da proteína E7 também não favoreceu a ação citotóxica da rapamicina (Figura 33E e F). Os

cortes de culturas organotípicas de queratinócitos que expressam essa oncoproteína apresentaram aproximadamente 7% de corpúsculos apoptóticos, mesmo após o tratamento com rapamicina. A rapamicina também não favoreceu a indução de apoptose em células que expressavam ambas oncoproteínas de HPV-16 (Figura 33G e H). Nessas culturas de queratinócitos a taxa de apoptose esteve por volta de 11%, mesmo após o tratamento com a droga.



**Figura 33.** Imagem de cortes transversais de culturas organotípicas de QPH contendo o vetor vazio pLXSN ou expressando as oncoproteínas de HPV-16 expostas a DMSO ou rapamicina. As setas indicam células com marcação positiva para a forma ativada da proteína caspase-3, detectadas por Imunohistoquímica. Aumento de 400X.

## DISCUSSÃO

A proliferação celular é um processo complexo e multifacetado que requer a síntese de proteínas regulatórias essenciais envolvidas não só na transdução de estímulos autócrinos para proliferação, mas também na transdução de estímulos parácrinos ou endócrinos. A perda do controle de proliferação celular está na base de alterações que podem levar ao aparecimento de tumores. Dessa forma, uma série de substâncias terapêuticas que interferem com elementos essenciais do controle do ciclo celular estão sendo desenvolvidas como agentes anti tumorais (HIDALGO & ROWINSKY, 2000). Um destes agentes, a rapamicina, vem sendo extensivamente estudada nos últimos cinco anos como potencial agente antitumoral. Ao bloquear a progressão do ciclo celular na transição G1/S essa droga é capaz de impedir a proliferação celular induzida por alterações genéticas presentes em diversos tipos de neoplasias (FAIVRE *et al.*, 2006).

A primeira evidência de que a rapamicina seria capaz de inibir a proliferação de queratinócitos normais foi feita por Duncan em 1994. Em 1997, Javier e colaboradores demonstraram que o tratamento de queratinócitos derivados de queratoma com rapamicina promovia a parada do ciclo celular especificamente na fase G1. Em 2002, Law e colaboradores apontaram que queratinócitos humanos imortalizados espontaneamente (HaCat) apresentavam inibição de proliferação da ordem de 50% após o tratamento por 24 horas com essa droga.

Ao induzir a imortalização de queratinócitos humanos normais, os HPV de alto risco promovem alterações de proliferação e de diferenciação celular. Estas alterações são normalmente atribuídas à expressão das oncoproteínas E6 e E7. Recentemente, vários estudos têm apontado a interação dessas oncoproteínas virais com reguladores da via que controla a atividade de mTOR, alvo celular da rapamicina (GLAUSINGER *et al.*, 2000; MANNHARDT *et*



*al.*, 2000; HORTON *et al.*, 2002; THOMAS *et al.*, 2002; LU *et al.*, 2004; PIM *et al.*, 2005; MENGES *et al.*, 2006). Diante desses aspectos, este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito da rapamicina em culturas organotípicas de queratinócito que expressam as oncoproteínas E6 e E7 de HPV-16.

A primeira observação feita por esse trabalho foi que o tratamento de culturas organotípicas de queratinócitos normais com rapamicina promovia um ligeiro achatamento do tecido gerado. Apesar do fato de todas as camadas do epitélio serem passíveis de identificação, as células presentes no tecido tratado apresentavam-se ligeiramente menores. Isso poderia indicar que a rapamicina, ao inibir a síntese protéica, seria capaz de reduzir o tamanho celular e, por fim, contribuir para o achatamento geral do epitélio. Esses resultados estão de acordo com o observado por Fingar e colaboradores (2002) que demonstraram que o tamanho celular é controlado pela proteína mTOR através da atividade de seus alvos efetores S6K1 e 4EBP/eIF4E. Também observamos que o aumento do tamanho celular e da espessura da camada espinhosa (acantose), característicos do epitélio expressando a oncoproteína E6, pode ser revertido por ação da rapamicina. Esses resultados apontam, mais uma vez, que o tamanho das células pode ser correlacionado com a atividade da proteína mTOR (FINGAR *et al.*, 2002; CORRADETTI & GUAN, 2006). Interessantemente, a proteína E6 é capaz de induzir a degradação da proteína celular TSC-2, regulador negativo de mTOR (LU *et al.*, 2004). É possível, dessa forma, que o aumento do tamanho celular, observado após a expressão da proteína E6, esteja relacionado a maior atividade da proteína mTOR, já que seu regulador negativo não encontra-se presente nas células contendo essa proteína viral. Além disso, vale ressaltar que a degradação de p53, induzida por E6, parece ser importante para aumento da espessura da camada espinhosa e o aumento do tamanho celular. Isso porque em queratinócitos expressando a forma mutada E6, incapaz de induzir a degradação de p53, esses fenômenos não foram observados.

Ao contrário do que foi observado para queratinócitos normais e queratinócitos contendo o gene E6 de HPV-16, o tratamento com rapamicina não promoveu alterações morfológicas nas culturas de queratinócitos contendo o gene E7. De fato, o epitélio apresentou-se ligeiramente mais espesso após o tratamento com essa droga. Este aumento indica que a oncoproteína E7 poderia interferir na ação da rapamicina sobre a proliferação de queratinócitos em culturas organotípicas. O mesmo foi observado em culturas organotípicas contendo ambas oncoproteínas virais. Vale ressaltar que o achatamento do epitélio promovido pelo tratamento com rapamicina parece ser dependente da degradação da proteína pRb já que o mutante de E7 que preserva essa característica não sofreu alterações na espessura do tecido após o tratamento com essa droga.

O efeito da rapamicina em culturas organotípicas de queratinócitos nunca havia sido avaliado anteriormente. Contudo, o achatamento do epitélio observado após o tratamento com rapamicina já havia sido descrito para culturas organotípicas de queratinócitos tratados com a citocina pró-inflamatória TNF (BOCCARDO *et al.*, 2004) e com inibidores das proteínas AKT e PI3K (OYAMA *et al.*, 2006). Assim como a rapamicina, os agentes descritos acima também promovem uma diminuição de proliferação dessas células. Isso poderia indicar que a inibição de proliferação poderia contribuir para o característico achatamento do epitélio. Vale ressaltar que no trabalho de BOCCARDO e colaboradores (2004) a expressão do gene E7 de HPV-18 promove resistência ao efeito antiproliferativo do TNF e o achatamento observado após o tratamento de queratinócitos normais com essa citocina não é compartilhado por culturas expressando essa oncoproteína viral. Sendo assim podemos inferir que o achatamento epitelial evidenciado após o tratamento com rapamicina pode estar relacionado à sua capacidade de inibir a proliferação celular e que a habilidade da proteína E7 de induzir a degradação de pRb pode apresentar um importante papel na resposta à rapamicina.

Através da avaliação do efeito da rapamicina na proliferação de culturas de queratinócitos normais e expressando as oncoproteínas de HPV-16 foi possível constatar que a rapamicina foi capaz de inibir a proliferação dessas células queratinócitos normais ou que expressavam a oncoproteína E6. Contudo, após o tratamento de culturas expressando o gene E7 com essa droga foi possível evidenciar um aumento da quantidade de células que incorporaram BrdU. Este resultado não só mostra que a proteína E7 é capaz de induzir resistência ao efeito antiproliferativo da rapamicina, mas também aponta que esta droga pode, eventualmente, aumentar o potencial proliferativo das células que expressam E7. É possível que, ao inibir a tradução dependente de cap 5', a rapamicina propicie a tradução do RNAm que codifica a proteína E7 de maneira independente desta estrutura. Esse mecanismo de tradução, preconiza a necessidade de uma sequência IRES (*Internal Ribosome Entry Sites*) no RNAm de E7. No entanto, a sequência IRES nunca foi identificada neste transcrito uma vez que a maioria dos estudos que avaliam como ocorre a tradução dos RNAm de HPV considera apenas o transcrito bicistrônico, que inclui também a sequência que codifica a proteína E6, à montante da região que codifica E7 (STACEY *et al.*, 2000; TANG *et al.*, 2006). Vale ressaltar que nesses trabalhos os autores apontam que a tradução de E7 só ocorre quando uma forma truncada da proteína E6 é sintetizada. Esse mecanismo permite que a proteína E7 seja expressa de forma controlada. Contudo, esse dado não é suficiente para explicar porque após o tratamento com rapamicina ocorre um aumento da síntese de DNA. De qualquer forma, o efeito observado não pode ser estendido para a condição onde a expressão de E7 ocorre naturalmente já que nesse caso a proteína E6 também é produzida. De fato, no tratamento de culturas de queratinócitos contendo ambas oncoproteínas o aumento da detecção de núcleos positivos para incorporação de BrdU não foi observado.

Ao avaliar o efeito da rapamicina em culturas de queratinócitos que expressam as formas mutadas do gene E7 foi possível constatar que a resistência ao efeito citostático da rapamicina

parece ser dependente da degradação da proteína pRb. Isso porque em culturas organotípicas de queratinócitos expressando a forma mutada E7E26G (incapaz de induzir a degradação de pRb) a rapamicina foi capaz de exercer seu efeito antiproliferativo. O mesmo não foi observado para o mutante E7CVQ68-70AAA, que apesar de não ser capaz de induzir proliferação em resposta a sinais de parada é capaz de induzir a degradação de pRb. Contudo, ao contrário do observado em culturas contendo E7 selvagem, a rapamicina não promoveu um aumento da quantidade de núcleos marcados nas culturas que expressam esse mutante. É possível, dessa forma, que a região C-terminal de E7, onde a mutação acima está localizada, seja importante para indução de proliferação mediada por rapamicina nas culturas organotípicas de queratinócitos que expressam a proteína E7 selvagem. O resultado acima também aponta a importância da degradação de pRb para a indução de resistência ao efeito antiproliferativo da rapamicina. Recentemente, Kurmasheva e colaboradores (2006) descreveram em sua revisão que fibroblastos embrionários murinos (*MEFs*), que não apresentavam a proteína pRb funcional, seriam extremamente resistentes ao efeito antiproliferativo da rapamicina. Vale ressaltar que a parada do ciclo celular induzida por essa droga pode ser correlacionada com a sua capacidade de alterar os níveis de ciclina D. Essa ciclina, ao se complexar com as quinases dependentes de ciclina -4 ou -6 (CDK4/6), é capaz de induzir a fosforilação de pRb e promover a liberação do fator de transcrição E2F permitindo a transição G1/S (BOONSTRA, 2003). De fato, a rapamicina é capaz de inibir a transição G1/S por alterar tanto a estabilidade da proteína quanto do RNAm que codifica para ciclina D (HASHEMOLHOSSEINI *et al.*, 1998). A rapamicina também interfere na tradução dessa ciclina e ao reduzir seus níveis essa droga faz com que as células não consigam entrar na fase S do ciclo celular (MUISE-HELMERICKS *et al.*, 1998). Considerando que células que possuem o gene pRb deletado ou inativado pela expressão de oncogenes virais apresentam níveis reduzidos de ciclina D (LUKAS *et al.*, 1994; PEI *et al.*, 1998) é razoável supor que a

inibição de proliferação por ação da rapamicina não seja eficaz já que esta ciclina parece não ser necessária para a transição G1/S nas células que expressam E7.

A importância da degradação de pRb para a indução de resistência ao efeito antiproliferativo da rapamicina também foi confirmada após o tratamento de queratinócitos contendo a oncoproteína E7 cultivados em monocamada. Em todas as células onde a proteína E7 era capaz de induzir a degradação de pRb foi observada uma resistência, de pelo menos duas vezes, ao efeito antiproliferativo da rapamicina. Esses resultados apontam pela primeira vez que o a degradação de pRb, induzida por uma proteína viral, pode tornar as células resistentes à rapamicina.

Recentemente, Oh e colaboradores (2006) demonstraram que ao induzir a diferenciação de queratinócitos contendo genoma de HPV-16, através de seu cultivo em suspensão (meio de cultura contendo metil-celulose), havia um aumento considerável nos níveis da oncoproteína E7. Este aumento foi correlacionado a um aumento das taxas de sua tradução uma vez que os autores não verificaram aumento nos níveis do transcrito desse oncogene. Além disso, a possibilidade da proteína ter se tornado mais estável foi descartada já que sua meia vida não foi alterada nestas condições de cultivo. Neste trabalho os autores constataram que ao induzir a diferenciação de queratinócitos ocorria um aumento dos níveis de fosforilação da proteína 4EBP1 e, conseqüentemente, um aumento dos níveis de tradução de E7. Além disso, ao tratar células diferenciadas com rapamicina, os níveis de E7 apresentavam uma ligeira queda. Esses resultados demonstram que a diferenciação epitelial apresenta importante papel na tradução de E7 e que a rapamicina poderia ser utilizada para inibir a tradução de E7.

Os resultados aqui apresentados apontam que a rapamicina não foi capaz de alterar a expressão de E7 a ponto de interferir na degradação de pRb. Também não verificamos redução dos níveis dessa oncoproteína por Western-blot nesse modelo (dados não apresentados). Isso

poderia indicar que no modelo de cultura organotípica a rapamicina talvez não seja capaz de interferir na expressão de E7. Dessa forma, podemos concluir que essa droga não poderia ser utilizada para atenuar as alterações celulares induzidas pela degradação de pRb promovida por E7. De fato, como apresentado acima, a expressão da oncoproteína E7 é suficiente para impedir que a rapamicina induza a parada do ciclo celular.

A tradução do transcrito bicistrônico que codifica para E6 e E7 é dependente de fatores de tradução controlados por mTOR (STACEY *et al.*, 2000). Dessa forma, o tratamento com rapamicina poderia interferir na tradução da oncoproteína E6 e, indiretamente, alterar os níveis de degradação da proteína p53. Os resultados apresentados nesse trabalho apontam que rapamicina não foi capaz de promover um aumento dos níveis da proteína p53 em queratinócitos expressando a oncoproteína E6. Isso indica que a rapamicina não é capaz de alterar os níveis de E6 a ponto de promover uma redução da degradação de p53. De fato, apenas quando a expressão de E6 é completamente bloqueada por RNA de interferência é possível constatar um aumento dos níveis de p53. Esse aumento é correlacionado com a indução de apoptose em células derivadas de carcinomas do colo uterino (BUTZ *et al.*, 2003).

Uma observação interessante foi feita ao avaliar os níveis da proteína p53 em culturas organotípicas de queratinócitos que expressavam apenas o gene E7. Sabe-se que a expressão da oncoproteína E7 correlaciona-se com um aumento da estabilidade da proteína p53 (DEMERS *et al.*, 1994). Este aumento foi evidenciado com clareza na camada basal e parabasal do epitélio de culturas organotípicas expressando essa oncoproteína. Interessantemente, o tratamento com rapamicina promoveu uma realocização de p53. As células marcadas passaram a ser evidenciadas nas camadas mais superiores do epitélio. Apesar da proteína p53 encontrar-se em altos níveis em células que expressam a oncoproteína E7, sua atividade transcricional não está aumentada (MASSIMI & BANKS *et al.*, 1997). De fato, em células que expressam a

oncoproteína E7 a proteína p53 não é capaz de induzir a parada do ciclo celular em resposta à indução de dano no DNA por luz ultravioleta, (SEAVEY *et al.*, 1999). Sendo assim, mesmo que a rapamicina induza uma realocização da marcação de p53 em culturas de queratinócitos contendo o gene E7, a relevância dessa observação permanece obscura, uma vez que a importância da expressão de p53 nestas condições ainda não está perfeitamente esclarecida.

A inibição de proliferação induzida por rapamicina correlaciona-se com a inibição de fosforilação das proteínas 4EBP1 (WANG *et al.*, 2005) e eIF4G1 (RAUGHT *et al.*, 2000). Os resultados obtidos apontam que em culturas organotípicas de queratinócitos, onde a expressão da oncoproteína E7 induzia a degradação de pRb, a rapamicina não era capaz de inibir a atividade de mTOR. Esses dados indicam que E7 impede que mTOR seja inativado e, possivelmente, impede que a rapamicina exerça seu efeito antiproliferativo. Uma importante observação está relacionada ao fato da rapamicina ser capaz de inibir parcialmente a atividade da proteína eIF4G1 em culturas de queratinócitos contendo a forma mutada E7CVQ68-70AAA. De fato, ao compararmos a fosforilação desta proteína no tecido gerado por queratinócitos contendo a forma selvagem do gene E7 com o tecido gerado por queratinócitos contendo a forma mutada E7CVQ68-70AAA é possível notar uma diferença de marcação na camada basal do epitélio. Enquanto o tratamento com rapamicina não alterou a fosforilação de eIF4G1 na camada basal do epitélio contendo o gene E7 selvagem, o mesmo tratamento faz com a marcação da camada basal desapareça no tecido gerado a partir do gene E7 mutado. Essa observação pode revelar importantes indícios a respeito do mecanismo utilizado por E7 para impedir que a rapamicina inative a proteína mTOR. Dessa forma, além da degradação da proteína pRb, é possível que a região de E7 correspondente à substituição dos aminoácidos CVQ68-70AAA tenha relevância na indução de resistência ao efeito antiproliferativo da rapamicina. Vale lembrar que a expressão dessa forma mutada apresentou resistência ao efeito antiproliferativo da rapamicina, mas não compartilhou o aumento

de proliferação observado pela cultura contendo E7 selvagem após seu tratamento com rapamicina. Dessa forma, o aumento do número de células capazes de sintetizar DNA em culturas de queratinócitos contendo o gene E7 selvagem pode ter relação com a fosforilação de eIF4G1.

Também é possível que a resistência ao efeito antiproliferativo da rapamicina, conferido por E7, esteja relacionado ao aumento de atividade de fosfolipase D (PLD). O aumento da atividade de PLD promove uma elevação dos níveis de ácido fosfatídico, um composto que se liga ao domínio FRB de mTOR. Ao se ligar a este domínio, o ácido fosfatídico impede que a rapamicina se ligue a mTOR e bloqueie sua atividade (FANG *et al.*, 2001). Níveis aumentados da atividade desta enzima estão relacionados não só à resistência à rapamicina, mas também ao aumento da capacidade proliferativa da células (CHEN *et al.*, 2003). Essa observação poderia explicar porque em condições onde a proliferação celular é induzida por E7, a rapamicina não é capaz de inibir a atividade de mTOR. Infelizmente, o modelo de cultura organotípica não permite a quantificação de ácido fosfatídico. De qualquer forma esses resultados podem indicar que a proteína E7 pode interferir na atividade de outros alvos que controlam a atividade de mTOR e a avaliação da atividade de PLD em outros modelos de cultura poderia contribuir para a compreensão de como a expressão de E7 interfere na sensibilidade à rapamicina.

A baixa expressão da proteína 4EBP1 também foi associada por Dilling e colaboradores (2002) à resistência à rapamicina em células de rabdomiossarcoma e células de carcinoma de cólon. Os resultados obtidos em culturas organotípicas de queratinócitos normais ou que expressam as oncoproteínas de HPV-16 não corroboram os achados desses autores. De fato, não ocorreram alterações significativas nos níveis totais dessa proteína nos tecidos gerados. Vale ressaltar que Noh e colaboradores (2004) não encontraram a mesma correlação entre a diminuição dos níveis de 4EBP1 e a resistência à rapamicina em vários tipos de linhagens



derivadas de carcinoma de mama. De fato, esses autores propõem que a forma fosforilada de AKT poderia ser considerada um marcador de sensibilidade à essa droga e apontam que mudanças nos níveis de ciclina D deveriam ser avaliados antes de se indicar análogos da rapamicina para tratamento de carcinoma de mama.

Alguns trabalhos têm apontado que a perda de expressão de PTEN ou a ativação de AKT promovem um aumento de sensibilidade à rapamicina. Estes trabalhos foram realizados numa série de linhagens celulares derivadas de tumores de cérebro, próstata e mama e também em tumores gerados em camundongos atímicos (YU *et al.*, 2001). Na maioria das células tumorais que apresentaram resistência a esta droga os níveis de ativação de AKT eram baixos ou moderados. Assim, um dos marcadores moleculares que pode indicar a resistência à rapamicina pode ser a diminuição de ativação de AKT (SHI *et al.*, 2005).

Os resultados obtidos apontam que nas culturas organotípicas onde a expressão da proteína E7 conferiu resistência ao efeito antiproliferativo da rapamicina a proteína AKT encontrava-se inativada. Esses resultados corroboram o fato da inativação da proteína AKT estar relacionada à resistência ao efeito antiproliferativo da rapamicina (SHI *et al.*, 2005). Contudo, contrariam o resultado publicado por Menges e colaboradores (2006) que indicam que a oncoproteína E7 de HPV-16 é capaz de aumentar a fosforilação de AKT de maneira dependente da degradação da proteína pRb. Neste trabalho os autores demonstram que, em culturas organotípicas de queratinócitos, a expressão de E7 induz um aumento da fosforilação de AKT na serina 473. Vale ressaltar que o anticorpo utilizado para detecção desta proteína foi o mesmo utilizado por este trabalho. A principal diferença entre os dois métodos de detecção se atém ao fato do trabalho de Menges e colaboradores ter realizado a identificação da fosforilação da proteína AKT através de anticorpo secundário fluorescente. Podemos ressaltar também que o vetor utilizado para expressão de E7 não foi o mesmo utilizado por este trabalho. No trabalho de

Menges e colaboradores a expressão da oncoproteína E7 foi realizada a partir de um vetor onde havia um códon de parada no gene E6 que favoreceria a tradução de E7. Contudo, as diferenças apontadas não são suficientes para justificar as diferenças nos resultados. Vale ressaltar que os resultados aqui demonstrados indicam que a proteína AKT fosforilada encontra-se predominantemente na camada granulosa. Essa observação é compatível com o observado anteriormente por O'Shaughnessy e colaboradores (2007a) que aponta que a fosforilação de AKT nessa camada é importante para a formação da camada córnea da epiderme. Além disso, em outro trabalho, O'Shaughnessy e colaboradores (2007b) apontaram que os HPV cutâneos são capazes de regular negativamente a atividade de AKT1 e aumentam a atividade de AKT2 na epiderme de camundongos portadores desses vírus. Dessa forma, outros estudos são necessários para verificar se a fosforilação da proteína AKT pode ser induzida após a expressão de E7 e se, eventualmente, a degradação de pRb poderia contribuir para a ativação dessa proteína.

Adicionalmente também avaliamos os níveis totais dos fatores que controlam o início da tradução eIF4E e eIF4G. O aumento dos níveis dessas proteínas é correlacionado com eventos de transformação maligna (LAZARIS-KARATZAS *et al.*, 1990; RUGGERO *et al.*, 2004; WENDEL *et al.*, 2004). Os resultados obtidos apontam que não ocorrem alterações relevantes nos níveis dessas proteínas em culturas organotípicas de queratinócitos normais ou contendo as oncoproteínas de HPV-16. Vale ressaltar que queratinócitos que expressam as oncoproteínas virais E6 e E7 não podem ser consideradas células transformadas (HEBNER & LAIMINS, 2006). Apesar das culturas de queratinócitos apresentarem características compatíveis com neoplasias intraepiteliais cervicais, essas características não podem ser atribuídas a diferenças de expressão desses fatores. De fato, a capacidade da proteína E7 de induzir a degradação de pRb é suficiente para indução desse fenótipo e sua expressão tem a capacidade de induzir apenas a imortalização dessas células (MÜNGER *et al.*, 1989; BARBOSA *et al.*, 1991).

Em muitas linhagens celulares a exposição à rapamicina induz uma diminuição da síntese de proteínas em torno de 15 a 20% levando estas células a uma parada de proliferação celular, mais precisamente na fase G1 do ciclo (HUANG *et al.*, 2004). Entretanto, estudos recentes têm apontado que, sob condições autócrinas, a rapamicina promove apoptose em células que não apresentam p53 ou p21<sup>cip1</sup> funcionais (HOSOI *et al.*, 1999; HUANG *et al.*, 2001). Pelo fato da oncoproteína E6 de HPV-16 ser capaz de induzir a degradação de p53 (WERNESS *et al.*, 1990) e a proteína E7 ser capaz de inativar a proteína p21 (FUNK *et al.*, 1997; JONES *et al.*, 1997) avaliamos se a rapamicina poderia atuar de maneira citotóxica em culturas organotípicas de queratinócitos expressando as oncoproteínas de HPV-16. Através da identificação de células positivas para a forma ativada da proteína caspase 3. A detecção de caspase-3 ativada por imunohistoquímica vem sendo amplamente utilizada para detecção de apoptose (DiCUNTO *et al.*, 2000; GOWN & WILLINGHAM, 2002; OLNEY *et al.*, 2002). A ativação desse tipo de caspase 3 é considerada um evento central no processo de indução de apoptose uma vez que essa proteína é capaz de induzir a clivagem proteolítica de várias proteínas celulares (THORNBERRY & LAZEBNIK, 1998). Além disso, uma vez ativada essa caspase é capaz de induzir apoptose de maneira irreversível (TYAS *et al.*, 2000). O resultado apresentado aponta que a rapamicina não é capaz de induzir apoptose em culturas de queratinócitos normais ou expressando as oncoproteínas virais E6 e E7. Vale ressaltar que nas culturas organotípicas expressando as oncoproteínas de HPV-16 foi possível constatar um aumento do número de corpúsculos apoptóticos quando comparados com culturas de queratinócitos normais. Esse aumento é compatível com os dados da literatura que apontam que a desestabilização de pRb e estabilização de p53 favorecem a indução de apoptose (JONES *et al.*, 1997).

No trabalho de Huang e colaboradores (2001) foi demonstrado que quando células de rabdomiossarcoma eram tratadas por 4 a 6 dias com rapamicina, na ausência de soro, havia um aumento de 20% do número de células apoptóticas. Este aumento de citotoxicidade foi atribuído à inativação nessas células do gene p53. Para confirmar esse dado, os autores trataram MEF (*Mouse Embryonary Fibroblasts*), com os genes p53 e p21<sup>cip1</sup> deletados, por 5 dias com rapamicina na ausência de soro. O resultado obtido foi semelhante ao observado anteriormente e demonstrou que, na ausência de fatores de crescimento presentes no soro, a rapamicina é capaz de induzir apoptose em células que apresentam os genes p53 e p21<sup>cip1</sup> inativados. Dessa forma, para que a rapamicina seja capaz de exercer seu efeito citotóxico, é necessário que as células sejam cultivadas em condições livres de soro. No caso de culturas de queratinócitos expressando oncoproteínas de HPV-16 foi possível constatar que a rapamicina não promoveu um aumento dos níveis de apoptose. Esse efeito pode ter sido influenciado pelo fato das culturas organotípicas terem sido geradas na presença de soro. Além disso, vale ressaltar que a apoptose induzida por rapamicina é completamente inibida em condições onde o receptor da insulina encontra-se ativado (PETER HOUGHTON, comunicação pessoal). Dessa forma, como a insulina é utilizada como suplemento necessário para geração de culturas organotípicas sua ação poderia proteger as células da apoptose induzida por rapamicina. De qualquer forma, diante dos resultados obtidos não podemos afirmar que a rapamicina seja capaz de induzir apoptose quando os genes p53 e p21<sup>cip1</sup> tem sua atividade inibida pela ação de oncogenes virais nesse sistema.

A rapamicina e seus análogos encontram-se na lista das drogas mais promissoras para o tratamento do câncer (GARBER, 2001). O potencial terapêutico de seus análogos CCI-779 (Wyeth-Ayerst Research) e RAD001 (Novartis) está sendo avaliado em inúmeros ensaios clínicos. Apesar da rapamicina ser capaz de induzir a parada do ciclo celular de vários tipos celulares, algumas linhagens derivadas de tumores são extremamente resistentes ao efeito antiproliferativo da mesma. O maior desafio para o desenho dos ensaios clínicos é a identificação de marcadores moleculares que possibilitem a seleção de pacientes que apresentarão benefício mediante o tratamento com a droga. O critério de inclusão tradicional que utiliza a histologia do tumor e o sítio anatômico de origem pode falhar consideravelmente já que o fenótipo molecular pode não ser identificado através do fenótipo clínico (SAWYERS, 2003). Baseados nestes aspectos, vários centros de pesquisa no mundo todo tentam identificar marcadores moleculares que sejam capazes de diferenciar tumores candidatos ao tratamento com os análogos da rapamicina. Este trabalho mostra pela primeira vez que a expressão da oncoproteína E7 de HPV-16 é capaz de conferir resistência ao efeito antiproliferativo da rapamicina. Mais ainda, essa resistência é correlacionada com a capacidade da proteína E7 de induzir a degradação de pRb. Esse achado pode ser extremamente importante para pacientes com diagnóstico de neoplasia associada ao HPV-16. Nesse caso o tratamento com rapamicina não traria nenhum benefício se utilizado isoladamente. É possível que a rapamicina ainda possa ser utilizada para o tratamento de neoplasias associadas à presença do HPV-16. Contudo, outros estudos são necessários para avaliar se essa droga poderia ser combinada com outros agentes terapêuticos para atenuar o efeito da expressão das oncoproteínas desse vírus nas células.

Os resultados apresentados nesse trabalho também apontam que a oncoproteína E7 de HPV-16 pode ser considerada a primeira proteína viral incluída na lista de genes que reconhecidamente conferem resistência ao efeito antiproliferativo da rapamicina.

## CONCLUSÕES

- ❖ A oncoproteína E7 de HPV-16 confere resistência ao efeito antiproliferativo da rapamicina em culturas organotípicas de queratinócitos e em queratinócitos cultivados em monocamada. Essa resistência é relacionada à capacidade desta oncoproteína de induzir a degradação da proteína pRb.
- ❖ A resistência ao efeito antiproliferativo da rapamicina, em culturas organotípicas de queratinócitos expressando o gene E7 de HPV-16, pode ser correlacionada à inativação da proteína AKT.
- ❖ A expressão da oncoproteína E7 de HPV-16 impede que a proteína mTOR seja inativada pela rapamicina.
- ❖ A oncoproteína E7 de HPV-16 pode ser considerada a primeira proteína viral a conferir resistência ao efeito antiproliferativo da rapamicina.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTS GROUP - THE ATYPICAL SQUAMOUS CELL OF UNDETERMINED SIGNIFICANCE/LOW-GRADE SQUAMOUS INTRAEPITHELIAL LESIONS TRIAGE STUDY. Human Papillomavirus testing for triage of women with cytology evidence of low-grade squamous intraepithelial lesions: Baseline data from a randomized trial. *J. Natl. Cancer Inst.*, Vol. 92, p. 397-402, 2000.
- ANDJELKOVIĆ N, ZOLNIEROWICZ S, VAN HOOFF C, GORIS J, HEMMINGS BA. The catalytic subunit of protein phosphatase 2A associates with the translation termination factor eRF1. *EMBO J.* Dec 16;15(24):7156-67, 1996.
- ARENDS, M.J.; WYLLIE, A.H.; BIRD, C.C.; Papillomavirus and human cancer. *Hum Pathol.*, Vol. 21, p. 686-698, 1990.
- ASHRAFI GH, HAGHSHENAS MR, MARCHETTI B, O'BRIEN PM, CAMPO MS. E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I. *Int J Cancer.* v.113, p.276-83, 2005.
- ATKINS MB, HIDALGO M, STADLER WM, LOGAN TF, DUTCHER JP, HUDES GR, PARK Y, LIOU SH, MARSHALL B, BONI JP, DUKART G, SHERMAN ML. Randomized phase II study of multiple dose levels of CCI-779, a novel mammalian target of rapamycin kinase inhibitor, in patients with advanced refractory renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* Mar 1;22(5):909-18, 2004.
- BADER AG, VOGT PK. An essential role for protein synthesis in oncogenic cellular transformation. *Oncogene.* Apr 19;23(18):3145-50, 2004.
- BANKS L, SPENCE P, ANDROPHY E, HUBBERT N, MATLASHEWSKI G, MURRAY A, CRAWFORD L. Identification of human papillomavirus type 18 E6 polypeptide in cells derived from human cervical carcinomas. *J Gen Virol.* May;68 ( Pt 5):1351-9, 1987.
- BARBOSA, M.S.; SCHLEGEL, R. The E6 and E7 genes of HPV-18 are sufficient for inducing two-stage in vitro transformation of human keratinocytes. *Oncogene*, vol. 4, p. 1529-1532, 1989.
- BASILE JR, ZACNY V, MUNGER K. The cytokines tumor necrosis factor-alpha (tnf-alpha) and tnf-related apoptosis-inducing ligand differentially modulate proliferation and apoptotic pathways in human keratinocytes expressing the human papillomavirus-16 e7 oncoprotein. *J Biol Chem*, 276:22522-22528, 2001.
- BAUER, H.M.; TING, Y.; GREER, C.E.; CHAMBERS, J.C.; TASHIRO, C.J.; CHIMERA, J.; REINGOLD, A.; MANOS, M.M. Genital human papillomavirus infection in students as determined by a PCR-based method. *JAMA* 265: 472-477, 1991.
- BAUER C, DIESINGER I, BRASS N, STEINHART H, IRO H, MEESE EU. Translation initiation factor eIF-4G is immunogenic, overexpressed, and amplified in patients with squamous cell lung carcinoma. *Cancer.* Aug 15;92(4):822-9, 2001.
- BAUER C, BRASS N, DIESINGER I, KAYSER K, GRASSER FA, MEESE E. Overexpression of the eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G-1) in squamous cell lung carcinoma. *Int J Cancer.* Mar 10;98(2):181-5, 2002.
- BEDELL, M.A.; JONES, K.H.; GROSSMAN, S.R.; LAIMINS, L. A. Identification of human papillomavirus type 18 transforming genes in immortalized and primary cells. *J. Virol.*, Vol. 63, p. 1247-1255, 1989.
- BEUVINK I, BOULAY A, FUMAGALLI S, ZILBERMANN F, RUETZ S, O'REILLY T, NATT F, HALL J, LANE HA, THOMAS G. The mTOR inhibitor RAD001 sensitizes tumor cells to DNA-damaged induced apoptosis through inhibition of p21 translation. *Cell.* Mar 25;120(6):747-59, 2005.
- BISCHOF O, NACERDDINE K, DEJEAN A. Human papillomavirus oncoprotein E7 targets the promyelocytic leukemia protein and circumvents cellular senescence via the Rb and p53 tumor suppressor pathways. *Mol Cell Biol.* Feb;25(3):1013-24, 2005.

BOCCARDO, E.; NOYA, F.; BROKER, T.R.; CHOW, L.T.; VILLA, L.L. HPV-18 confers resistance to TNF- $\alpha$  in organotypic cultures of human keratinocytes. *Virology*, 328 (2), p. 233-43, 2004.

BOONSTRA J. Progression through the G1-phase of the on-going cell cycle. *J Cell Biochem*. 2003 Oct 1;90(2):244-52.

BOSCH, X.F.; MANOS, M.M.; MUNÓZ, N.; SHERMAN, M.; JANSEN, A.M.; PETO, J.; SCHIFFMAN, M.H.; MORENO, K.R.; SHAH, K. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J. Natl. Cancer Inst.*, Vol. 87, p. 796-802, 1995.

BRAZIL DP, HEMMING BA. Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci*. Nov;26(11):657-64, 2001.

BREHM A, NIELSEN SJ, MISKA EA, MCCANCE DJ, REID JL, BANNISTER AJ, KOUZARIDES T. The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. *EMBO J*. May 4;18(9):2449-58, 1999.

BROKER, T.R. Structure and genetic expression of papillomavirus. *Obstet. Gynecol. Clin. North Am.*, Vol. 14, p. 329-347, 1987.

BROWN, D.R.; FIFE, K.H. Human papillomavirus infections of the genital tract. *Med. Clin. North Am.*, Vol. 74, p. 1455-1485, 1990.

BROWN EJ, ALBERS MW, SHIN TB, ICHIKAWA K, KEITH CT, LANE WS, SCHREIBER SL. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature*. Jun 30;369(6483):756-8, 1994.

BRUNET A, BONNI A, ZIGMOND MJ, LIN MZ, JUO P, HU LS, ANDERSON MJ, ARDEN KC, BLENIS J, GREENBERG ME. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*. Mar 19;96(6):857-68, 1999.

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

CHAN, W.K.; KLOCK, G.; BERNARD, H.U. Progesterone and glucocorticoid response elements occur in the long control regions of several human papillomaviruses involved in anogenital neoplasia. *J. Virol.*, v. 63, p. 3261-9, 1989.

CHANG, J.C.; WOOTEN, E.C.; TSIMELZON, A. HILSENBECK, S.G.; GUTIERREZ, M.C.; THAM, Y.L.; KALIDAS, M.; ELLEDGE, R.; MOHSIN, S.; OSBORNE, C.K.; CHAMNESS, G.C.; ALLRED, D.C.; LEWIS, M.T.; WONG, H.; O'CONNELL, P. Patterns of resistance and incomplete response to docetaxel by gene expression profiling in breast cancer patients. *J. Clin. Oncol.*, 23: 1169-1179, 2005.

CHELLAPPAN S, KRAUS VB, KROGER B, MUNGER K, HOWLEY PM, PHELPS WC, NEVINS JR. Adenovirus E1A, simian virus 40 tumor antigen, and human papillomavirus E7 protein share the capacity to disrupt the interaction between transcription factor E2F and the retinoblastoma gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A*. May 15;89(10):4549-53, 1992.

CHEN, J.J.; REID, C.E.; BAND, V.; ANDROPHY, E.J. Interaction of papillomavirus E6 oncoprotein with a putative calcium-binding protein. *Science* 269: 529-531, 1995.

CHEN Y, ZHENG Y, FOSTER DA. Phospholipase D confers rapamycin resistance in human breast cancer cells. *Oncogene*. Jun 19;22(25):3937-42, 2003.

CHENG, G.; ICENOGLE, J.P.; KIRNBAUER, R.; HUBBERT, N.L.; LOUIS, M.E.S.; HAN, C.; SVARE, E.I.; KJAER, S.K.; LOWY, D.R.; SCHILLER, J.T. Divergent human papillomavirus type 16 are serologically cross-reactive. *J. Infect. Dis*. 172: 1584-1587, 1995.



CHIU MI, KATZ H, BERLIN V. RAPT1, a mammalian homolog of yeast Tor, interacts with the FKBP12/rapamycin complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 20;91(26):12574-8, 1994.

CHOW LT, BROKER TR. In vitro experimental systems for HPV: epithelial raft cultures for investigations of viral reproduction and pathogenesis and for genetic analyses of viral proteins and regulatory sequences. *Clin Dermatol*, 15:217-227, 1997.

CONGER KL, LIU JS, KUO SR, CHOW LT, WANG TS. Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human dna polymerase alpha/primase. *J Biol Chem*. Jan 29;274(5):2696-705, 1999.

CORRADETTI MN, GUAN KL. Upstream of the mammalian target of rapamycin: do all roads pass through mTOR? *Oncogene*. Oct 16;25(48):6347-60, 2006.

CRESPO JL, HALL MN. Elucidating TOR signaling and rapamycin action: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*. Dec;66(4):579-91, 2002.

CREW, J.P.; FUGGLE, S.; BICKNELL, R.; CRANSTON, D.W.; DE BENEDETTI, A.; HARRIS, A.L. Eukaryotic initiation factor-4E in superficial and muscle invasive bladder cancer and its correlation with vascular endothelial growth factor expression and tumour progression. *Br. J. Cancer*. Vol. 82, p. 161-6, 2000.

CRIFE TP, HAUGEN TH, TURK JP, TABATABAI F, SCHMID PG 3RD, DURST M, GISSMANN L, ROMAN A, TUREK LP. Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis. *EMBO J*. Dec 1;6(12):3745-53, 1987.

CROOK T, TIDY JA, VOUSDEN KH. Degradation of p53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and trans-activation. *Cell*, 67:547-556, 1991.

CRUZ MC, GOLDSTEIN AL, BLANKENSHIP J, DEL POETA M, PERFECT JR, MCCUSKER JH, BENNANI YL, CARDENAS ME, HEITMAN J. Rapamycin and less immunosuppressive analogs are toxic to *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* via FKBP12-dependent inhibition of TOR. *Antimicrob Agents Chemother*. Nov;45(11):3162-70, 2001.

DAN HC, SUN M, YANG L, FELDMAN RI, SUI XM, OU CC, NELLIST M, YEUNG RS, HALLEY DJ, NICOSIA SV, PLEDGER WJ, CHENG JQ. Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway regulates tuberous sclerosis tumor suppressor complex by phosphorylation of tuberin. *J Biol Chem*. Sep 20;277(38):35364-70, 2002.

DANCEY JE. Clinical development of mammalian target of rapamycin inhibitors. *Hematol Oncol Clin North Am*. Oct;16(5):1101-14, 2002.

DAVIES R, HICKS R, CROOK T, MORRIS J, VOUSDEN K. Human papillomavirus type 16 E7 associates with a histone H1 kinase and with p107 through sequences necessary for transformation. *J Virol*. May;67(5):2521-8, 1993.

DE BENEDETTI, A.; HARRIS, A.L. eIF4E expression in tumors: its possible role in progression of malignancies. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. Vol. 31, p. 59-72, 1999.

DE SANJOSE S, DIAZ M, CASTELLSAGUE X, CLIFFORD G, BRUNI L, MUNOZ N, BOSCH FX. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. Jul;7(7):453-9, 2007.

DE VILLIERS, E.M. Taxonomic classification of human papillomaviruses. *Papillomavirus Report* 12: 57-63, 2001.

DE VILLIERS EM, FAUQUET C, BROKER TR, BERNARD HU, ZUR HAUSEN H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. v. 324, p. 17-27, 2004.

- DEMERS GW, HALBERT CL, GALLOWAY DA. Elevated wild-type p53 protein levels in human epithelial cell lines immortalized by the human papillomavirus type 16 E7 gene. *Virology*; 198;169-174, 1994.
- DEMERS GW, ESPLING E, HARRY JB, ETSCHIED BG, GALLOWAY DA. Abrogation of growth arrest signals by human papillomavirus type 16 E7 is mediated by sequences required for transformation. *J Virol.* Oct;70(10):6862-9, 1996.
- DI CUNTO F, IMARISIO S, HIRSCH E, BROCCOLI V, BULFONE A, MIGHELI A, ATZORI C, TURCO E, TRIOLO R, DOTTO GP, SILENGO L, ALTRUDA F. Defective neurogenesis in citron kinase knockout mice by altered cytokinesis and massive apoptosis. *Neuron.* Oct;28(1):115-27, 2000.
- DILLING MB, DIAS P, SHAPIRO DN, GERMAIN GS, JOHNSON RK, HOUGHTON PJ. Rapamycin selectively inhibits the growth of childhood rhabdomyosarcoma cells through inhibition of signaling via the type I insulin-like growth factor receptor. *Cancer Res.* Feb 15;54(4):903-7, 1994.
- DILLING MB, GERMAIN GS, DUDKIN L, JAYARAMAN AL, ZHANG X, HARWOOD FC, HOUGHTON PJ. 4E-binding proteins, the suppressors of eukaryotic initiation factor 4E, are down-regulated in cells with acquired or intrinsic resistance to rapamycin. *J Biol Chem.* Apr 19;277(16):13907-17, 2002.
- DIPAULO JA, WOODWORTH CD, POPESCU NC, KOVAL DL, LOPEZ JV, DONIGER J. HSV-2-induced tumorigenicity in HPV16-immortalized human genital keratinocytes. *Virology.* Aug;177(2):777-9, 1990.
- DOUROS J, SUFFNESS M. New antitumor substances of natural origin. *Cancer Treat Rev.* Mar;8(1):63-87, 1981.
- DUMONT FJ, STARUCH MJ, KOPRAK SL, MELINO MR, SIGAL NH. Distinct mechanisms of suppression of murine T cell activation by the related macrolides FK-506 and rapamycin. *J Immunol.* Jan 1;144(1):251-8, 1990.
- DUNCAN, J. Differential Inhibition of Cutaneous T-Cell-Mediated Reactions and Epidermal Cell Proliferation by Cyclosporin A, FK-506, and Rapamycin. *Journal of Investigative Dermatology*, 102, 84-88; p.1523-1747, 1237-1737, 1994.
- DURST M, GALLAHAN D, JAY G, RHIM JS. Glucocorticoid-enhanced neoplastic transformation of human keratinocytes by human papillomavirus type 16 and an activated ras oncogene. *Virology.* Dec;173(2):767-71, 1989.
- DYSON, N.; HOWLEY, P.M.; MÜNGER, K.; HARLOW, E. The human papillomavirus 16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*, 243: 934-7, 1989.
- EASTON JB, HOUGHTON PJ. mTOR and cancer therapy. *Oncogene.* Oct 16;25(48):6436-46, 2006.
- EBERLE J, KRASAGAKIS K, ORFANOS CE. Translation initiation factor eIF-4A1 mRNA is consistently overexpressed in human melanoma cells in vitro. *Int J Cancer.* May 2;71(3):396-401, 1997.
- ENG CP, SEHGAL SN, VEZINA C. Activity of rapamycin (AY-22,989) against transplanted tumors. *J Antibiot (Tokyo).* Oct;37(10):1231-7, 1984.
- FAIVRE S, KROEMER G, RAYMOND E. Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents. *Nat Rev Drug Discov.* Aug;5(8):671-88, 2006.
- FANG Y, VILELLA-BACH M, BACHMANN R, FLANIGAN A, CHEN J. Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science.* Nov 30;294(5548):1942-5, 2001.
- FEHRMANN, F.; LAIMINS, L.A. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene*, v. 22, p. 5201-07, 2003.
- FENG Z, ZHANG H, LEVINE AJ, JIN S. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun 7;102(23):8204-9, 2005.

FINGAR DC, SALAMA S, TSOU C, HARLOW E, BLENIS J. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev.* Jun 15;16(12):1472-87, 2002.

FOSTER, S.A.; DEMERS, G.W.; ETSCHIED, B.G.; GALLOWAY, D.A. The ability of human papillomavirus E6 protein to target p53 for degradation in vivo correlates with their ability to abrogate actinomycin D-induced growth arrest. *J. Virol.* 68: 5698-5705, 1994.

FRANCIS DA, SCHMID SI, HOWLEY PM. Repression of the integrated papillomavirus E6/E7 promoter is required for growth suppression of cervical cancer cells. *J Virol*, 74:2679-2686, 2000.

FRATTINI MG, LAIMINS LA. Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 20;91(26):12398-402, 1994.

FRATTINI MG, LIM HB, LAIMINS LA. In vitro synthesis of oncogenic human papillomaviruses requires episomal genomes for differentiation-dependent late expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Apr 2;93(7):3062-7, 1996.

FUKUCHI-SHIMOGORI T, ISHII I, KASHIWAGI K, MASHIBA H, EKIMOTO H, IGARASHI K. Malignant transformation by overproduction of translation initiation factor eIF4G. *Cancer Res.* Nov 15;57(22):5041-4, 1997.

FUNK JO, WAGA S, HARRY JB, ESPLING E, STILLMAN B, GALLOWAY DA. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes & Devel*, 11:2090-2100, 1997.

GAO Q, SRINIVASAN S, BOYER SN, WAZER DE, BAND V. The E6 oncoproteins of high-risk papillomaviruses bind to a novel putative GAP protein, E6TP1, and target it for degradation. *Mol Cell Biol*, 19: 733-744, 1999.

GARAMI A, ZWARTKRUIS FJ, NOBUKUNI T, JOAQUIN M, ROCCIO M, STOCKER H, KOZMA SC, HAFEN E, BOS JL, THOMAS G. Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2. *Mol Cell.* Jun;11(6):1457-66, 2003.

GARDIOL D, KUHNE C, GLAUNSINGER B, LEE SS, JAVIER R, BANKS L. Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the discs large tumour suppressor for proteasome-mediated degradation. *Oncogene.* Sep 30;18(40):5487-96, 1999.

GEOERGER B, KERR K, TANG CB, FUNG KM, POWELL B, SUTTON LN, PHILLIPS PC, JANSS AJ. Antitumor activity of the rapamycin analog CCI-779 in human primitive neuroectodermal tumor/medulloblastoma models as single agent and in combination chemotherapy. *Cancer Res.* Feb 15;61(4):1527-32, 2001.

GIARRE M, CALDEIRA S, MALANCHI I, CICCOLINI F, LEO MJ, TOMMASINO M. Induction of pRb degradation by the human papillomavirus type 16 E7 protein is essential to efficiently overcome p16INK4a-imposed G1 cell cycle Arrest. *J Virol.* May;75(10):4705-12, 2001.

GIBBONS J.J.; DICAFAANI, C.; PETERSON, R.; HERNANDEZ, R.; SKOTNICKI, J.; FROST, J. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, Vol. 40, p. 301, 2000.

GINGRAS, A.C.; RAUGHT, B.; SONENBERG, N. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem.* v. 68, p. 913-63, 1999.

GINGRAS, A.C.; RAUGHT, B.; SONENBERG, N. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev.* 1; 15, p. 807-26, 2001.

GLAUNSINGER BA, LEE SS, THOMAS M, BANKS L, JAVIER R. Interactions of the PDZ-protein MAGI-1 with adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus E6 oncoproteins. *Oncogene.* Nov 2;19(46):5270-80, 2000.

GOODWIN EC, DIMAIO D. Repression of human papillomavirus oncogenes in HeLa cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov 7;97(23):12513-8, 2000.

GOTTSCHALK AR, BOISE LH, THOMPSON CB, QUINTANS J. Identification of immunosuppressant-induced apoptosis in a murine B-cell line and its prevention by bcl-x but not bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jul 19;91(15):7350-4, 1994.

GOWN AM, WILLINGHAM MC. Improved detection of apoptotic cells in archival paraffin sections: immunohistochemistry using antibodies to cleaved caspase 3. *J Histochem Cytochem*. Apr;50(4):449-54, 2002.

GREWE M, GANSAUGE F, SCHMID RM, ADLER G, SEUFFERLEIN T. Regulation of cell growth and cyclin D1 expression by the constitutively active FRAP-p70s6K pathway in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res*. Aug 1;59(15):3581-7, 1999.

HAGHIGHAT A, MADER S, PAUSE A, SONENBERG N. Repression of cap-dependent translation by 4E-binding protein 1: competition with p220 for binding to eukaryotic initiation factor-4E. *EMBO J*. Nov 15;14(22):5701-9, 1995.

HALBERT CL, DEMERS GW, GALLOWAY DA. The E6 and E7 genes of human papillomavirus type 6 have weak immortalizing activity in human epithelial cells. *J Virol* 66:2125-2134, 1992.

HARRIS TE, CHI A, SHABANOWITZ J, HUNT DF, RHOADS RE, LAWRENCE JC JR. mTOR-dependent stimulation of the association of eIF4G and eIF3 by insulin. *EMBO J*. Apr 19;25(8):1659-68, 2006.

HASHEMOLHOSSEINI, S.; NAGAMINE, Y.; MORLEY, S.J.; DESRIVIERES, S.; MERCEP, L.; FERRARI, S. Rapamycin inhibition of the G1 to S transition is mediated by effects on cyclin D1 mRNA and protein stability. *J Biol Chem*. Vol. 273, p. 14424-9, 1998.

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*. 8: 3905-3910, 1989.

HAY N, SONENBERG N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.*, 18, p. 1926-45, 2004.

HEBNER CM, LAIMINS LA. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol*. Mar-Apr;16(2):83-97. 2006.

HEITMAN J, MOVVA NR, HALL MN. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* v. 253, p.905-9, 1991.

HELT AM, GALLOWAY DA. Destabilization of the retinoblastoma tumor suppressor by human papillomavirus type 16 E7 is not sufficient to overcome cell cycle arrest in human keratinocytes. *J Virol*, 75:6737-6747, 2001.

HICKMAN ES, PICKSLEY SM, VOUSDEN KH. Cells expressing HPV16 E7 continue cell cycle progression following DNA damage induced p53 activation. *Oncogene*, 9(8):2177-2181, 1994.

HIDALGO, M.; ROWINSKY, E.K. The rapamycin-sensitive signal transduction pathway as a target for cancer therapy. *Oncogene*. Vol. 19, p. 6680-6, 2000.

HORTON, L.E.; BUSHELL, M.; BARTH-BAUS, D.; TILLERAY, V.J.; CLEMENS, M.J.; HENSOLD, J.O. p53 activation results in rapid dephosphorylation of the eIF4E-binding protein 4E-BP1, inhibition of ribosomal protein S6 kinase and inhibition of translation initiation. *Oncogene*. Vol. 21, p. 5325-34, 2002.

HOSOI H, DILLING MB, SHIKATA T, LIU LN, SHU L, ASHMUN RA, GERMAIN GS, ABRAHAM RT, HOUGHTON PJ. Rapamycin causes poorly reversible inhibition of mTOR and induces p53-independent apoptosis in human rhabdomyosarcoma cells. *Cancer Res.*, 59, p.886-94, 1999.

HOUCHENS, D.P.; OVEJERA, A.A.; RIBLET, S.M.; SLAGEL, D.E. Human brain tumor xenografts in nude mice as a chemotherapy model. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol*. 19, p. 799-805, 1983.

HOWLEY, P.M. Papillomavirinae: the viruses and their replication. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M; editors. *Fundamental virology*, 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; p. 947-977, 1996.

HUANG, S.; LIU, L.N.; HOSOI, H.; DILLING, M.B.; SHIKATA, T.; HOUGHTON, P.J. p53/p21(CIP1) cooperate in enforcing rapamycin-induced G(1) arrest and determine the cellular response to rapamycin. *Cancer Res.* 15, p. 3373-81, 2001.

HUANG, S.; HOUGHTON, P.J. Inhibitors of mammalian target of rapamycin as novel antitumor agents: from bench to clinic. *Curr. Opin. Investig. Drugs.*, 3, p. 295-304, 2002.

HUANG S, SHU L, DILLING MB, EASTON J, HARWOOD FC, ICHIJO H, HOUGHTON PJ. Sustained activation of the JNK cascade and rapamycin-induced apoptosis are suppressed by p53/p21(Cip1). *Mol. Cell.*, 11, p. 1491-501, 2003.

HUANG S, SHU L, EASTON J, HARWOOD FC, GERMAIN GS, ICHIJO H, HOUGHTON PJ. Inhibition of mammalian target of rapamycin activates apoptosis signal-regulating kinase 1 signaling by suppressing protein phosphatase 5 activity. *J Biol Chem.* 279, p. 36490-6, 2004.

HUBBERT NL, SEDMAN SA, SCHILLER JT. Human papillomavirus type 16 E6 increases the degradation rate of p53 in human keratinocytes. *J Virol.* Oct;66(10):6237-41, 1992.

HUDSON, J.B.; BEDELL, M.A.; MCCANCE, D.J.; LAIMINS, L.A. Immortalization and altered differentiation of human keratinocytes in vitro by the E6 and the E7 open reading frames of human papillomavirus type 18. *J. Virol.* 64: 519-526, 1990.

HUGHES FJ, ROMANOS MA. E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. *Nucleic Acids Res.* Dec 25;21(25):5817-23, 1993.

HUIBREGTSE, J.M.; SCHEFFNER, M.; HOWLEY, P.M. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J.*, v. 10, p. 4129-35, 1991.

HUIBREGTSE, J.M.; SCHEFFNER, M.; HOWLEY, P.M. Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins. *Mol Cell Biol.*, v. 13, p. 4918-27, 1993.

HULTSCH T, MARTIN R, HOHMAN RJ. The effect of the immunophilin ligands rapamycin and FK506 on proliferation of mast cells and other hematopoietic cell lines. *Mol Biol Cell.* Sep;3(9):981-7, 1992.

HURLIN PJ, KAUR P, SMITH PP, PEREZ-REYES N, BLANTON RA, MCDUGALL JK. Progression of human papillomavirus type 18-immortalized human keratinocytes to a malignant phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan 15;88(2):570-4, 1991.

HUYNH H, CHOW PK, OOI LL, SOO KC. A possible role for insulin-like growth factor-binding protein-3 autocrine/paracrine loops in controlling hepatocellular carcinoma cell proliferation. *Cell Growth Differ.* Mar;13(3):115-22, 2002.

IARC – International Agency for Research on Cancer. Human papillomavirus, Lyon: IARC; (Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to humans, Vol. 64, 1995.

IARC – International Agency for Research on Cancer. Human papillomavirus, Lyon: IARC; (Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to humans, 2006.

INCA – INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil; Rio de Janeiro, 2006.

INOKI K, LI Y, ZHU T, WU J, GUAN KL. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol.* Sep;4(9):648-57, 2002.

INOKI K, ZHU T, GUAN KL. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell.* Nov 26;115(5):577-90, 2003.

INOUE, H.; NOJIMA, H.; OKAYAMA, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28, 1990.

JACINTO E, HALL MN. Tor signalling in bugs, brain and brawn. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Feb;4(2):117-26, 2003.

JIANG, M.; MILNER, J. Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells treated with siRNA, a primer of RNA interference. *Oncogene*, Vol. 21, p. 6041-6048, 2002.

JONES DL, MUNGER K. Analysis of the p53-mediated G1 growth arrest pathway in cells expressing the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *J Virol.* Apr;71(4):2905-12, 1997.

JONES DL, ALANI RM, MÜNGER K. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes & Devel*, 11:2101-2111, 1997.

JONES DL, THOMPSON DA, SUH-BURGMANN E, GRACE M, MUNGER K. Expression of the HPV E7 oncoprotein mimics but does not evoke a p53-dependent cellular DNA damage response pathway. *Virology.* Jun 5;258(2):406-14, 1999.

JUNQUEIRA, L.C.U. & JUNQUEIRA, L.M.M.S. Técnicas básicas de citologia e histologia. Livraria Editora Santos, p.123 1983.

KAUR, P.; McDOUGALL, J.K. Characterization of primary human keratinocytes transformed by human papillomavirus type 18. *J. Virol.*, Vol. 62, p. 1917-1924, 1988.

KEREKATTE, V.; SMILEY, K.; HU, B.; SMITH, A.; GELDER, F.; DE BENEDETTI, A. The proto-oncogene/translation factor eIF4E: a survey of its expression in breast carcinomas. *Int. J. Cancer.* Vol. 20, p. 27-31, 1995.

KESSIS TD, SLEBOS RJ, NELSON WG, KASTAN MB, PLUNKETT BS, HAN SM, LORINCZ AT, HEDRICK L, CHO KR. Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:3988-3992, 1993.

KIM, D.-H., SARBASSOV, D., ALI, S. M., KING, J. E., LATEK, R. R., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P., AND SABATINI, D. M. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 110, 163-175, 2002.

KIM, D.-H., SARBASSOV, D., ALI, S. M., LATEK, R. R., GUNTUR, K. V. P., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P., AND SABATINI, D. M. GbL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Molecular Cell* 11, 895-904, 2003.

KINO T, INAMURA N, SAKAI F, NAKAHARA K, GOTO T, OKUHARA M, KOHSAKA M, AOKI H, OCHIAI T. Effect of FK-506 on human mixed lymphocyte reaction in vitro. *Transplant Proc.* 1987 Oct;19 (5 Suppl 6):36-9, 1987.

KIRNBAUER, R.; BOOY, F.; CHENG, N.; LOWY, D.R.; SCHILLER, J.T. Papillomavirus L1 major protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 89: 12180-12184, 1992.

KIYONO, T.; HIRAIEA, A.; FUJITA, M.; HAYASHI, Y.; AKIYAMA, T.; ISHIBASHI, M. Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the *Drosophila* disc large tumor suppressor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 94: 11612-11616, 1997.

KLINGELHUTZ, A.J.; FOSTER, S.A.; MCDUGALL, J.K. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* 380: 79-81, 1996.

KO, L.J.; PRIVES, C. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev.*, Vol. 10, p. 1054-1072, 1996.

KOUTSKY LA, AULT KA, WHEELER CM, BROWN DR, BARR E, ALVAREZ FB, CHIACCHIERINI LM, JANSEN KU; Proof of Principle Study Investigators. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N Engl J Med*. Nov 21;347(21):1645-51, 2002.

KULASINGAM SL, HUGHES JP, KIVIAT NB, MAO C, WEISS NS, KUYPERS JM, KOUTSKY LA. Evaluation of human papillomavirus testing in primary screening for cervical abnormalities: comparison of sensitivity, specificity, and frequency of referral. *JAMA*. Oct 9;288(14):1749-57, 2002.

KURMASHEVA RT, HUANG S, HOUGHTON PJ. Predicted mechanisms of resistance to mTOR inhibitors. *Br J Cancer*. Oct 23;95(8):955-60, 2006.

LA THANGUE NB. DP and E2F proteins: components of a heterodimeric transcription factor implicated in cell cycle control. *Curr Opin Cell Biol*. Jun;6(3):443-50, 1994.

LAZARIS-KARATZAS A, MONTINE KS, SONENBERG N. Malignant transformation by a eukaryotic initiation factor subunit that binds to mRNA 5' cap. *Nature*. Jun 7;345(6275):544-7, 1990.

LAW BK, CHYTIL A, DUMONT N, HAMILTON EG, WALTNER-LAW ME, AAKRE ME, COVINGTON C, MOSES HL. Rapamycin potentiates transforming growth factor beta-induced growth arrest in nontransformed, oncogene-transformed, and human cancer cells. *Mol Cell Biol*. Dec;22(23):8184-98, 2002.

LECHNER MS, LAIMINS LA. Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. *J Virol*. Jul;68(7):4262-73, 1994.

LECHNER MS, MACK DH, FINICLE AB, CROOK T., VOUSDEN KH, LAIMINS LA. Human papillomavirus E6 proteins bind p53 in vivo and abrogate p53-mediated repression of transcription. *EMBO J*, 11:3045-3052, 1992.

LIU Y, CHEN JJ, GAO Q, DALAL S, HONG Y, MANSUR CP, BAND V, ANDROPHY EJ. Multiple functions of human papillomavirus type 16 E6 contribute to the immortalization of mammary epithelial cells. *J Virol*, 73:7297-7307, 1999.

LEE, S. S., GLAUNSINGER, B., MANTOVANI, F., BANKS, L., AND JAVIER, R. The multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cellular target for both adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus E6 oncoproteins. *J. Virol*. 74: 9680-9693, 2000.

LEVINE AJ, FENG Z, MAK TW, YOU H, JIN S. Coordination and communication between the p53 and IGF-1-AKT-TOR signal transduction pathways. *Genes Dev*. Feb 1;20(3):267-75, 2006.

LONGWORTH MS, LAIMINS LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev*.;v.68, p.362-72, 2004.

LONGWORTH MS, WILSON R, LAIMINS LA. HPV31 E7 facilitates replication by activating E2F2 transcription through its interaction with HDACs. *EMBO J*. May 18;24(10):1821-30, 2005.

LOWY DR, KIRNBAUER R, SCHILLER JT. Genital human papillomaviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 91, p. 2436-2440, 1994.

LU Z, HU X, LI Y, ZHENG L, ZHOU Y, JIANG H, NING T, BASANG Z, ZHANG C, KE Y. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein interferences with insulin signaling pathway by binding to tuberlin. *J Biol Chem*., v. 279, p. 35664-70, 2004.

LUKAS J, MULLER H, BARTKOVA J, SPITKOVSKY D, KJERULFF AA, JANSEN-DURR P, STRAUSS M, BARTEK J. DNA tumor virus oncoproteins and retinoblastoma gene mutations share the ability to relieve the cell's requirement for cyclin D1 function in G1. *J Cell Biol*. May;125(3):625-38, 1994.

MADER S, LEE H, PAUSE A, SONENBERG N. The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4 gamma and the translational repressors 4E-binding proteins. *Mol Cell Biol*. Sep;15(9):4990-7, 1995.

MANNING BD, TEE AR, LOGSDON MN, BLENIS J, CANTLEY LC. Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Mol Cell.* Jul;10(1):151-62, 2002.

MANNING BD, LOGSDON MN, LIPOVSKY AI, ABBOTT D, KWIATKOWSKI DJ, CANTLEY LC. Feedback inhibition of Akt signaling limits the growth of tumors lacking Tsc2. *Genes Dev.* Aug 1;19(15):1773-8, 2005.

MANNHARDT B, WEINZIMER SA, WAGNER M, FIEDLER M, COHEN P, JANSEN-DURR P, ZWERSCHKE W. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein binds and inactivates growth-inhibitory insulin-like growth factor binding protein 3. *Mol Cell Biol.* v. 20, p. 6483-95, 2000.

MARKOWITZ D, GOFF S, BANK A. Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line. *Virology.* Dec;167(2):400-6, 1988.

MARTIN LG, DEMERS GW, GALLOWAY DA. Disruption of the G1/S transition in human papillomavirus type 16 E7-expressing human cells is associated with altered regulation of cyclin E. *J Virol*, 72:975-985, 1998.

MASSIMI P, BANKS L. Repression of p53 transcriptional activity by the HPV E7 proteins. *Virology.* Jan 6;227(1):255-9, 1997.

MATLASHEWSKI, G.J.; SCHNEIDER, J.; BANKS, L.; JONES, N.; MURRAY, A.; CRAWFORD, L.V. Human papillomavirus type 16 DNA cooperates with activated ras in transforming primary cells. *EMBO J.*, Vol. 6, p. 1741-1746, 1987.

MATTHEWS-GREER J, CALDITO G, DE BENEDETTI A, HERRERA GA, DOMINGUEZ-MALAGON H, CHANONA-VILCHIS J, TURBAT-HERRERA EA. eIF4E as a marker for cervical neoplasia. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* Dec;13(4):367-70, 2005.

McINTYRE MC, RUESCH MN, LAIMINS LA. Human papillomavirus E7 oncoproteins bind a single form of cyclin E in a complex with cdk2 and p107. *Virology.* Jan 1;215(1):73-82, 1996.

McMURRAY, H.R.; NGUYEN, D.; WESTBROOK, T.F.; McANCE, D.J. Biology of human papillomavirus. *Int. J. Exp. Pathol.*, Vol. 82, p. 15-33, 2001.

MENGES CW, BAGLIA LA, LAPOINT R, MCCANCE DJ. Human papillomavirus type 16 E7 up-regulates AKT activity through the retinoblastoma protein. *Cancer Res.* Jun 1;66(11):5555-9, 2006.

MOHR IJ, CLARK R, SUN S, ANDROPHY EJ, MACPHERSON P, BOTCHAN MR. Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science.* Dec 21;250(4988):1694-9, 1990.

MUISE-HELMERICKS RC, GRIMES HL, BELLACOSA A, MALSTROM SE, TSICHLIS PN, ROSEN N. Cyclin D expression is controlled post-transcriptionally via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *J Biol Chem.* Nov 6;273(45):29864-72, 1998.

MÜNGER K, PHELPS WC, BUBB V, HOWLEY PM, SCHLEGEL RJ. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol*, 63:4417-4421, 1989.

MUTHUKKUMAR S, RAMESH TM, BONDADA S. Rapamycin, a potent immunosuppressive drug, causes programmed cell death in B lymphoma cells. *Transplantation.* Aug 15;60(3):264-70, 1995.

NAKAGAWA S, HUIBREGTSE JM. Human scribble (Vartul) is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin-protein ligase. *Mol Cell Biol.* 2000 Nov;20(21):8244-53, 2000.

NATHAN, C.O.; LIU, L.; LI, B.; ABREO, F.; NANDY, I.; DE BENEDETTI, A. Detection of the proto-oncogene eIF4E in surgical margins may predict recurrence in head and neck cancer. *Oncogene.* Vol. 15, p. 579-584, 1997.



- NOH WC, MONDESIRE WH, PENG J, JIAN W, ZHANG H, DONG J, MILLS GB, HUNG MC, MERIC-BERNSTAM F. Determinants of rapamycin sensitivity in breast cancer cells. *Clin Cancer Res.* Feb 1;10(3):1013-23, 2004.
- NOYA F, CHIEN WM, BROKER TR, CHOW LT. p21cip1 Degradation in differentiated keratinocytes is abrogated by costabilization with cyclin E induced by human papillomavirus E7. *J Virol*, 75(13):6121-6134, 2001.
- ODA D, BIGLER L, MAO EJ, DISTECHE CM. Chromosomal abnormalities in HPV-16-immortalized oral epithelial cells. *Carcinogenesis.* Sep;17(9):2003-8, 1996.
- OGAWA T, TOKUDA M, TOMIZAWA K, MATSUI H, ITANO T, KONISHI R, NAGAHATA S, HATASE O. Osteoblastic differentiation is enhanced by rapamycin in rat osteoblast-like osteosarcoma (ROS 17/2.8) cells. *Biochem Biophys Res Commun.* Aug 10;249(1):226-30, 1998.
- OH ST, KYO S, LAIMINS LA. Telomerase activation by human papillomavirus type 16 E6 protein: induction of human telomerase reverse transcriptase expression through Myc and GC-rich Sp1 binding sites. *J Virol.* Jun;75(12):5559-66, 2001.
- OH KJ, KALININA A, PARK NH, BAGCHI S. Deregulation of eIF4E: 4E-BP1 in differentiated human papillomavirus-containing cells leads to high levels of expression of the E7 oncoprotein. *J Virol.* Jul;80(14):7079-88, 2006.
- OLNEY JW, TENKOVA T, DIKRANIAN K, MUGLIA LJ, JERMAKOWICZ WJ, D'SA C, ROTH KA. Ethanol-induced caspase-3 activation in the in vivo developing mouse brain. *Neurobiol Dis.* Mar;9(2):205-19, 2002.
- O'SHAUGHNESSY RF, AKGUL B, STOREY A, PFISTER H, HARWOOD CA, BYRNE C. Cutaneous human papillomaviruses down-regulate AKT1, whereas AKT2 up-regulation and activation associates with tumors. *Cancer Res.* Sep 1;67(17):8207-15, 2007a.
- O'SHAUGHNESSY RF, WELTI JC, COOKE JC, AVILION AA, MONKS B, BIRNBAUM MJ, BYRNE C. AKT-dependent HspB1 (Hsp27) activity in epidermal differentiation. *J Biol Chem.* Jun 8;282(23):17297-305, 2007b.
- OYAMA, K; OKAWA, T.; NAKAGAWA, H.; TAKAOKA, M.; ANDL, C.D.; KIM, S-H; KLEIN-SZANTO, A.; DIEHL, JA; HERLYN, M.; EL-DEIRY, W.; RUSTGI, AK. AKT induces senescence in primary esophageal epithelial cells but is permissive for differentiation as revealed in organotypic culture. *Oncogene*, p. 1-12, 2006.
- OZBUN MA. Human papillomavirus type 31b infection of human keratinocytes and the onset of early transcription. *J Virol.* 2002 Nov;76(22):11291-300, 2002.
- PARKIN DM, BRAY FI, DEVESA SS Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer.* Oct;37 Suppl 8:S4-66, 2001.
- PATEL, D.; HUANG, S.M.; BAGLIA, L.A.; MCCANCE, D.J. The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300. *EMBO J.* 18: 5061-5072, 1999.
- PEI XF, SHERMAN L, SUN YH, SCHLEGEL R. HPV-16 E7 protein bypasses keratinocyte growth inhibition by serum and calcium. *Carcinogenesis.* Aug;19(8):1481-6, 1998.
- PENG XD, XU PZ, CHEN ML, HAHN-WINDGASSEN A, SKEEN J, JACOBS J, SUNDARARAJAN D, CHEN WS, CRAWFORD SE, COLEMAN KG, HAY N. Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2. *Genes Dev.* Jun 1;17(11):1352-65, 2003.
- PIETENPOL JA, STEIN RW, MORAN E, YACIUK P, SCHLEGEL R, LYONS RM, PITTELKOW MR, MUNGER K, HOWLEY PM, MOSES HL. TGF-beta 1 inhibition of c-myc transcription and growth in keratinocytes is abrogated by viral transforming proteins with pRB binding domains. *Cell.* Jun 1;61(5):777-85, 1990.

PIM, D.; MASSIMI, P.; DILWORTH, S.M.; BANKS, L. Activation of the protein kinase B pathway by the HPV-16 E7 oncoprotein occurs through a mechanism involving interaction with PP2A. *Oncogene* 24, p.7830-8, 2005.

PIRISI, L.; YASUMOTO, S.; FELLER, M.; DONIGER, J.; DIPAOLO, J.A. Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. *J. Virol.*, Vol. 61, p. 1061-1066, 1987.

PISANI, P.; BRAY, F.; PARKIN, D.M. Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. *Int. J. Cancer* 97: 72-81, 2002.

POTTER CJ, PEDRAZA LG, XU T. Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. *Nat Cell Biol.* Sep;4(9):658-65, 2002.

RAUGHT B, GINGRAS AC, GYGI SP, IMATAKA H, MORINO S, GRADI A, AEBERSOLD R, SONENBERG N. Serum-stimulated, rapamycin-sensitive phosphorylation sites in the eukaryotic translation initiation factor 4G1. *EMBO J.* Feb 1;19(3):434-44, 2000.

RONCO LV, KARPOVA AY, VIDAL M, HOWLEY PM. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev.* 12(13):2061-2072, 1998.

ROSENWALD, I.B.; CHEN, J.J.; WANG, S.; SAVAS, L.; LONDON, I.M.; PULLMAN, J. Upregulation of protein synthesis initiation factor eIF-4E is an early event during colon carcinogenesis. *Oncogene.* Vol. 18, p. 2507-17, 1999.

RUESCH MN, LAIMINS LA. Human papillomavirus oncoproteins alter differentiation-dependent cell cycle exit on suspension in semisolid medium. *Virology.* Oct 10;250(1):19-29, 1998.

RUGGERO, D & SONENBERG, N. The AKT of translational control. *Oncogene*, 24. p. 7426-7434, 2005.

SABATINI DM, ERDJUMENT-BROMAGE H, LUI M, TEMPST P, SNYDER SH. RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell*, 78, p. 35-43, 1994.

SABERS CJ, MARTIN MM, BRUNN GJ, WILLIAMS JM, DUMONT FJ, WIEDERRECHT G, ABRAHAM RT. Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells. *J Biol Chem.* Jan 13;270(2):815-22, 1995.

SAMBROOK, J. & RUSSEL, D.W. *Molecular Cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SARBASSOV DD, ALI SM, KIM DH, GUERTIN DA, LATEK RR, ERDJUMENT-BROMAGE H, TEMPST P, SABATINI DM. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol.* Jul 27;14(14):1296-302, 2004.

SARBASSOV DD, GUERTIN DA, ALI SM, SABATINI DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science.* Feb 18;307(5712):1098-101, 2005.

SAWYERS, C.L. Will mTOR inhibitors make it as cancer drugs? *Cancer Cell*, 4, p. 343-8, 2003.

SCHEFFNER, M.; WERNESS, B.A.; HUIBREGTSE, J.M.; LEVINE, A.J.; HOWLEY, P.M. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*, v. 63, p. 1129-36, 1990.

SCHILLER, J.T.; VASS, W.C; VOUSDEN, K.H.; LOWY, D.R. The E5 open reading frame of bovine papillomavirus type 1 encodes a transforming gene. *J. Virol.*, Vol. 57, p. 1-6, 1986.

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

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

SEAVEY SE, HOLUBAR M, SAUCEDO LJ, PERRY ME. The E7 oncoprotein of human papillomavirus type 16 stabilizes p53 through a mechanism independent of p19(ARF). *J Virol.* Sep;73(9):7590-8, 1999.

SEHGAL SN. Rapamune (Sirolimus, rapamycin): an overview and mechanism of action. *Ther Drug Monit.* Dec;17(6):660-5, 1995.

SEUFFERLEIN T, ROZENGURT E. Rapamycin inhibits constitutive p70s6k phosphorylation, cell proliferation, and colony formation in small cell lung cancer cells. *Cancer Res.* Sep 1;56(17):3895-7, 1996.

SHAH SA, POTTER MW, RICCIARDI R, PERUGINI RA, CALLERY MP. FRAP-p70s6K signaling is required for pancreatic cancer cell proliferation. *J Surg Res.* May 15;97(2):123-30, 2001.

SHI Y, FRANKEL A, RADVANYI LG, PENN LZ, MILLER RG, MILLS GB. Rapamycin enhances apoptosis and increases sensitivity to cisplatin in vitro. *Cancer Res.* May 1;55(9):1982-8, 1995.

SHI Y, YAN H, FROST P, GERA J, LICHTENSTEIN A. Mammalian target of rapamycin inhibitors activate the AKT kinase in multiple myeloma cells by up-regulating the insulin-like growth factor receptor/insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase cascade. *Mol Cancer Ther.* Oct;4(10):1533-40, 2005.

SHINOURA N, YOSHIDA Y, NISHIMURA M, MURAMATSU Y, ASAI A, KIRINO T, HAMADA H. Expression level of Bcl-2 determines anti- or proapoptotic function. *Cancer Res.* Aug 15;59(16):4119-28, 1999.

SHUDA M, KONDOH N, TANAKA K, RYO A, WAKATSUKI T, HADA A, GOSEKI N, IGARI T, HATSUSE K, AIHARA T, HORIUCHI S, SHICHITA M, YAMAMOTO N, YAMAMOTO M. Enhanced expression of translation factor mRNAs in hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res.* Jul-Aug;20(4):2489-94, 2000.

SLANSKY JE, FARNHAM PJ. Introduction to the E2F family: protein structure and gene regulation. *Curr Top Microbiol Immunol.* 208:1-30, 1996.

SMOTKIN, D.; PROKOPH, H.; WETTSTEIN, F.O. Oncogenic and nononcogenic human genital papillomaviruses generate the E7 mRNA by different mechanisms. *J. Virol.* Vol. 63, p.1441-7, 1989.

STACEY, S.N.; JORDAN, D.; WILLIAMSON, A.J.; BROWN, M.; COOTE, J.H.; ARRAND, J.R. Leaky scanning is the predominant mechanism for translation of human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein from E6/E7 bicistronic mRNA. *J. Virol.* Vol. 74, p. 7284-97, 2000.

STAMBOLIC V, SUZUKI A, DE LA POMPA JL, BROTHERS GM, MIRTSOS C, SASAKI T, RULAND J, PENNINGER JM, SIDEROVSKI DP, MAK TW Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell.* Oct 2;95(1):29-39, 1998.

STEGER G, CORBACH S. Dose-dependent regulation of the early promoter of human papillomavirus type 18 by the viral E2 protein. *J Virol.* Jan;71(1):50-8, 1997.

STOLER, M.H.; RHODES, C.R.; WHITBECK, A.; WOLINSKY, S.M.; CHOW, L.T.; BROKER, T.R. Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias. *Hum. Pathol.* 23: 117-128, 1992.

STUBENRAUCH F, LIM HB, LAIMINS LA. Differential requirements for conserved E2 binding sites in the life cycle of oncogenic human papillomavirus type 31. *J Virol.* Feb;72(2):1071-7, 1998.

TANG S, TAO M, MCCOY JP JR, ZHENG ZM. The E7 oncoprotein is translated from spliced E6\*I transcripts in high-risk human papillomavirus type 16- or type 18-positive cervical cancer cell lines via translation reinitiation. *J Virol.* May;80(9):4249-63, 2006.

TEE AR, MANNING BD, ROUX PP, CANTLEY LC, BLENIS J. Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. *Curr Biol*. Aug 5;13(15):1259-68, 2003.

THOMAS JT, LAIMINS LA. Human papillomavirus oncoproteins E6 and E7 independently abrogate the mitotic spindle checkpoint. *J Virol*, 72:1131-1137, 1998.

THOMAS M, BANKS L. Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. *J Gen Virol*. Jun;80 ( Pt 6):1513-7, 1999.

THOMAS, M.; PIM, D.; BANKS, L. The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV. *Oncogene*, Vol. 18, p. 7690-7700, 1999.

THOMAS M, LAURA R, HEPNER K, GUCCIONE E, SAWYERS C, LASKY L, BANKS L. Oncogenic human papillomavirus E6 proteins target the MAGI-2 and MAGI-3 proteins for degradation. *Oncogene*. Aug 1;21(33):5088-96, 2002.

THOMPSON DA, BELINSKY G, CHANG TH, JONES DL, SCHLEGEL R, MUNGER K. The human papillomavirus-16 E6 oncoprotein decreases the vigilance of mitotic checkpoints. *Oncogene*; 15:3025-3035, 1997.

THORNBERRY NA, LAZEBNIK Y. Caspases: enemies within. *Science*. Aug 28;281(5381):1312-6, 1998.

TOMMASINO, M.; ADAMCZEWSKI J.P.; CARLOTTI, F.; BARTH, C.F.; MANETTI, R.; CONTORNI, M.; CAVALIERI, F.; HUNT, T.; CRAWFORD, L. HPV-16 E7 protein associates with the protein kinase p33CDK2 and cyclin A. *Oncogene* 8: 195-202, 1993.

TROTTIER H, FRANCO EL. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine*. 2006 (in press); [Epub ahead of print Dec 13, 2005].

TROUSSARD AA, MAWJI NM, ONG C, MUI A, ST -ARNAUD R, DEDHAR S. Conditional knock-out of integrin-linked kinase demonstrates an essential role in protein kinase B/Akt activation. *J Biol Chem*. Jun 20;278(25):22374-8, 2003.

TURBAT-HERRERA, E.; TUCKER, A.; BLACK, D. et al. Increase in eIF4E protein and neovascularization in cervical carcinoma. South Western association for Clinical Microbiology Meeting, Oklahoma City, Oklahoma, Abstract, 1998.

TYAS L, BROPHY VA, POPE A, RIVETT AJ, TAVARE JM. Rapid caspase-3 activation during apoptosis revealed using fluorescence-resonance energy transfer. *EMBO Rep*. Sep;1(3):266-70, 2000.

VAN DEN BRULE, A.; MEIJER, C.; BARKELS, V.; KENEMANS, P.; WALBOOMERS, J. Rapid detection of human papillomavirus in cervical scrapes by combined general primer-mediated and type-specific polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol*. 28: 2739-2743, 1990.

VELDMAN T, LIU X, YUAN H, SCHLEGEL R. Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jul 8;100(14):8211-6, 2003.

VEZINA, C.; KUDELSKI, A.; SEHGAL, S.N. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J. Antibiot. (Tokyo)*. Vol. 28, p. 721-6, 1975.

VILLA LL, VIEIRA KBL, PEI X, SCHLEGEL R. Differential effect of tumor necrosis factor on proliferation of primary human keratinocytes and cell lines containing human papillomavirus types 16 and 18. *Molec Carcinog*, 6:5-9, 1992.

VILLA, L.L. Human papillomaviruses and cervical cancer. *Adv. Cancer Res.*, v. 71, p. 321-41, 1997.

VILLA LL, COSTA RL, PETTA CA, ANDRADE RP, PAAVONEN J, IVERSEN OE, OLSSON SE, HOYE J, STEINWALL M, RIIS-JOHANNESSEN G, ANDERSSON-ELLSTROM A, ELFGREN K, KROGH G, LEHTINEN M, MALM C, TAMMS GM, GIACOLETTI K, LUPINACCI L, RAILKAR R, TADDEO FJ, BRYAN J, ESSER MT, SINGS HL, SAAH AJ, BARR E. High sustained efficacy of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus types 6/11/16/18 L1 virus-like particle vaccine through 5 years of follow-up. *Br J Cancer*. Dec 4;95(11):1459-66, 2006.

WANG, X.; FLYNN, A.; WASKIEWICZ, A.J.; WEBB, B.L.; VRIES, R.G.; BAINES, I.A.; COOPER, J.A.; PROUD, C.G. The phosphorylation of eukaryotic initiation factor eIF4E in response to phorbol esters, cell stresses, and cytokines is mediated by distinct MAP kinase pathways. *J Biol Chem*. Vol. 273, p. 9373-7, 1998.

WANG X, BEUGNET A, MURAKAMI M, YAMANAKA S, AND PROUD CG. Distinct signaling events downstream of mTOR cooperate to mediate the effects of amino acids and insulin on initiation factor 4E-binding proteins. *Mol Cell Biol* 25: 2558–2572, 2005.

WATT FM. Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. Jun 29;353(1370):831-7, 1998.

WENDEL HG, LOWE SW. Reversing drug resistance in vivo. *Cell Cycle*. Jul;3(7):847-9, 2004.

WERNES, B.A.; LEVINE, A.J.; HOWLEY, P.M. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*, v. 248, p. 76-9, 1990.

WILLIAMS, B.J.; EASTAM, J.A.; VENEABLE, D.D; DE BENEDETTI, A.; ACREE, D.T. The effect of the translational initiation factor eIF4E on VEGF and angiogenesis in prostate cancer American Association for Cancer Research Special Conference in Cancer Research: Angiogenesis and Cancer, Orlando, Florida. B69-70 (Abstract), 1998.

WITZIG TE, GEYER SM, GHOBRIAL I, INWARDS DJ, FONSECA R, KURTIN P, ANSELL SM, LUYUN R, FLYNN PJ, MORTON RF, DAKHIL SR, GROSS H, KAUFMANN SH. Phase II trial of single-agent temsirolimus (CCI-779) for relapsed mantle cell lymphoma. *J Clin Oncol*. Aug 10;23(23):5347-56, 2005.

WOODWORTH, C.D.; WAGGONER, S.; BARNES, W.; STOLER, M.H.; DI PAOLO, J.Á. Human cervical and foreskin epithelial cells immortalized by human papillomavirus DNAs exhibit dysplastic differentiation in vivo. *Cancer Res.*, Vol. 50, p. 3709-3715, 1990.

WU X, HEPNER K, CASTELINO-PRABHU S, DO D, KAYE MB, YUAN XJ, WOOD J, ROSS C, SAWYERS CL, WHANG YE. Evidence for regulation of the PTEN tumor suppressor by a membrane-localized multi-PDZ domain containing scaffold protein MAGI-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, v. 97, p. 4233-8, 2000.

WULLSCHLEGER S, LOEWITH R, HALL MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*. Feb 10;124(3):471-84, 2006.

YU K, LUCAS J, ZHU T, ZASK A, GAYDOS C, TORAL-BARZA L, GU J, LI F, CHAUDHARY I, CAI P, LOTVIN J, PETERSEN R, RUPPEN M, FAWZI M, AYRAL-KALOUSTIAN S, SKOTNICKI J, MANSOUR T, FROST P, GIBBONS J. PWT-458, a novel pegylated-17-hydroxywortmannin, inhibits phosphatidylinositol 3-kinase signaling and suppresses growth of solid tumors. *Cancer Biol Ther*. May;4(5):538-45, 2005.

ZERFASS-THOME K, ZWERSCHKE W, MANNHARDT B, TINDLE R, BOTZ JW, JANSEN-DURR P. Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene*. Dec 5;13(11):2323-30, 1996.

ZIMMERMANN H, DEGENKOLBE R, BERNARD HU, O'CONNOR MJ. The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. *J Virol*. Aug;73(8):6209-19, 1999.

ZHOU, J.; FRAZER, I.H. Papovaviridae: capsid structure and capsid protein function. In: LACEY, C. editor. *Papillomavirus s: current research on papillomavirus*. London: Leeds University Press; p. 93-100, 1996.

zur HAUSEN, H. Papillomavirus infections: a major cause of human cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1288, p. 55-78, 1996.

zur HAUSEN, H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* Vol. 92, p. 690-698, 2000.

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

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)