

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

**PAPEL DE REPIN-1 COMO MARCADOR TUMORAL EM NEOPLASIA  
CERVICAL INDUZIDA POR PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)**

**Vanessa Valentini**

Trabalho de Conclusão do Curso de  
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de  
Ciências Farmacêuticas da  
Universidade de São Paulo.

Orientador(a)

Prof.(a). Dr(a) Silvy Stuchi Maria-  
Engler

Co-Orientadora:

Pós doutoranda Érica Aparecida de  
Oliveira.

São Paulo

2020

## SUMÁRIO

	Pág.
Lista de Abreviaturas .....	1
RESUMO .....	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. OBJETIVOS	5
3. MATERIAIS E MÉTODOS	6
4. RESULTADOS	7
5. DISCUSSÃO	7
6. CONCLUSÃO	8
7. BIBLIOGRAFIA	8

**LISTA DE ABREVIATURAS**

HPV	Papilomavírus Humano
REPIN-1	Iniciador de replicação 1
LCR	Região longa de controle
NIC	Neoplasias intraepiteliais cervicais
pRb	Proteína de suscetibilidade ao retinoblastoma
HIF-1 $\alpha$	Subunidade $\alpha$ do fator de indução de hipóxia 1
GLUT1	Transportadores de glicose 1
M2PK	Isoforma M2 da piruvato quinase
PKM	Piruvato quinase
PEP	Fosfoenolpiruvato
MycBP	Proteína de ligação de Myc
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase
cDNA	DNA complementar

## RESUMO

VALENTINI, V. **Papel de repin-1 como marcador tumoral em neoplasia cervical induzida por papilomavírus humano (HPV)**. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Palavras-chave: REPIN-1, HPV, efeito Warburg, oncogenes, metabolismo

**INTRODUÇÃO:** O câncer cervical está etiológicamente associado à infecção pelo papilomavírus humano (HPV) de alto risco oncogênico, particularmente, 16 e 18. Os oncogenes virais E6 e E7 atuam em vias metabólicas, mais especificamente, modulando transportadores de glicose a fim de promover o efeito Warburg, para suprir a grande demanda energética da proliferação tumoral. Um gene que pode estar potencialmente envolvido nesse mecanismo é o REPIN-1, que é altamente expresso no fígado e tecido adiposo e está diretamente relacionado às vias metabólicas de lipídios e glicose.

**OBJETIVO:** Neste estudo, investigamos os níveis de expressão de REPIN-1 nas linhagens de carcinoma cervical induzido por HPV de alto risco, como um possível modulador entre a infecção por HPV e a progressão tumoral no câncer cervical.

**MATERIAIS E MÉTODOS:** Células tumorais cervicais CaSki, HeLa, SiHa, C33A e queratinócitos primários (usados como controle) foram cultivados e utilizados para realizar PCR em tempo real quantitativo e Western Blotting para avaliação dos níveis de mRNA e de proteína de REPIN-1. Amostras de pacientes foram utilizadas para a investigação de REPIN-1 por imunohistoquímica.

**RESULTADOS:** Os experimentos preliminares revelaram maior nível de mRNA de REPIN-1 nas células CaSki, quando comparadas aos queratinócitos. As células SiHa, HeLa e C33A apresentaram expressões variáveis em relação ao controle. Em amostras de biópsias cervicais infectadas por HPV16, observamos que a expressão imunohistoquímica de REPIN-1 aumenta progressivamente de NIC 1 para NIC 3, porém é menor no Carcinoma Invasor.

**CONCLUSÃO:** Nossos resultados contribuem com a discussão sobre o papel de REPIN-1 de que sua superexpressão pode ser um modulador entre a infecção por HPV e a progressão do tumor no câncer cervical, encorajando novos estudos na área.

## 1. INTRODUÇÃO

Dentre os diversos tipos celulares existentes, podemos destacar dois tipos de comportamentos básicos: as células que surgem na embriogênese e permanecem, quantitativamente, inalteradas; e as que necessitam de constante reposição. Para tal reposição, se faz necessário um mecanismo conhecido como ciclo celular, sendo a mitose a fase mais importante. Esta consiste numa divisão celular capaz de gerar duas células filhas idênticas. Normalmente, sinais químicos internos e externos controlam o comprimento e a duração do ciclo celular e de cada fase deste, respectivamente. Além disso, com a finalidade de assegurar uma divisão correta do material genético nas células filhas, conta-se com a existência de vários pontos de checagem, responsáveis por interromper o ciclo celular até que algum dano no DNA ou algum processo crítico seja reparado. Se o reparo não for possível, a célula danificada entra em processo de apoptose, que é o processo de morte celular programada, ou senescência, que é a perda da capacidade proliferativa celular de forma estável e duradora, mesmo que haja atividade metabólica (ALTERS & ALTERS, 2005; KUILMAN et al., 2010).

Todavia, se a capacidade de controle sobre a multiplicação e divisão celular, e a natureza responsiva aos sinais de morte são perdidas, combinado com a ausência de diferenciação, as células descendentes transformam-se em neoplasias, com capacidade de evoluir para uma neoplasia maligna invasiva, ou seja, um câncer metastático. Este fenômeno pode ocorrer devido a uma série de alterações genéticas, principalmente nos proto-oncogenes e supressores de tumor, sendo os primeiros responsáveis por regular as atividades relacionadas com divisão celular, crescimento e diferenciação por meio de sinais bioquímicos; e o último possui produtos gênicos que impedem eventos que direcionam para o câncer, por exemplo, paralisação do ciclo celular, encaminhamento das células anormais para apoptose e estabilização do genoma, levando a uma maior precisão da replicação, do reparo e da segregação correta do DNA, minimizando, assim, as taxas de mutações (THERMAN & MILLER, 2001).

Alterações nos proto-oncogenes, como mutações em seu DNA, deixam estes ativos, transformando-os em oncogenes. Os oncogenes são estimuladores positivos do crescimento de células, diminuem os níveis de diferenciação celular e são supressores de apoptose. Já quando acontecem alterações nos genes supressores de tumor, estes tornam-se inativos, permitindo o crescimento celular desordenado de células neoplásicas (THERMAN & MILLER, 2001; ALTERS & ALTERS, 2005). Ambos, quando ativos, induzem processos de senescência prematura, a fim de tentar barrar a progressão da neoplasia (KUILMAN et al., 2010). Tais mutações supracitadas podem ser herdadas geneticamente, porém, também podem ser adquiridas pelo contato com agentes químicos, radiação e por infecções virais.

Dando maior ênfase às infecções virais, é sabido que alguns vírus são dotados de oncogenes, capazes de transferir características de malignidade à células infectadas, de maneira geral, por meio da inserção de sua informação genética no genoma da célula hospedeira, que será, posteriormente, ativada e transcrita gerando um produto oncogênico (OXFORD & COLLIER, 2006).

Um dos mais importantes vírus indutores de neoplasia é o Papilomavírus Humano (HPV). Estruturalmente, o HPV é composto pelo vírion, que é o material genético, e uma capa proteica, o capsídeo. As proteínas que compõe o capsídeo são responsáveis pela imunogenicidade do vírus, pois carregam determinantes antigênicos gênero-específicos. O genoma da partícula viral é formado por duas fitas circulares de DNA ligadas covalentemente e associadas a histonas de origem celular. O genoma possui oito genes na região não codificadora, também chamada região longa de controle (LCR), que regula a transcrição viral; e a região precoce E que codifica várias proteínas – E1, E2, E4, E5, E6 e E7– que regulam a transcrição e a replicação viral e controlam o ciclo celular, que confere a este vírus o potencial para transformar e imortalizar as células hospedeiras, principalmente a pele e as mucosas por ser epiteliotrópico (CÂMARA et al., 2003; HOWLEY, 1996; MCMURRAY et al., 2001; DOORBAR, 2006).

Existem diversas cepas de HPV já descritas, e a forma de lesão que este acomete está associado ao tipo do vírus, por exemplo, os HPVs 1, 2 e 4 causam

geralmente verrugas comuns nas mãos e nos pés. Os HPVs 6 e 11 causam verrugas genitais e os HPVs 16 e 18 são encontrados em neoplasias intraepiteliais cervicais (NIC) e em carcinomas escamosos de colo do útero e de pênis (CÂMARA et al., 2003). O ciclo biológico tem início quando as partículas virais penetram nas células da camada profunda do epitélio escamoso, devido à presença de fissuras, atingindo células menos diferenciadas que ainda têm capacidade mitótica ativa. O vírion entra na célula pela interação das proteínas do capsídeo com receptores específicos da superfície celular. Estudos *in vitro* apontaram para a alfa-6 integrina como um receptor celular para os papilomavírus (EVANDER et al., 1997; MCMILLAN et al., 1999). Depois de penetrar na célula, o vírion perde seu capsídeo, expondo seu DNA à ação de enzimas nucleares, o que favorece a expressão dos genes virais (CÂMARA et al., 2003). O DNA do HPV pode permanecer quiescente na célula, antes ou depois de uma infecção produtiva (CÂMARA et al., 2003).

As proteínas traduzidas a partir desses RNAs mensageiros vão interferir na função de proteínas celulares que controlam o ciclo normal da célula, a diferenciação celular e a apoptose. Nos HPV de alto risco, como o 16 e o 18, dois genes virais, as proteínas E6 e E7 tem a capacidade de transformar células primárias epiteliais em células neoplásicas. A E6 do HPV oncogênico induz a degradação prematura do supressor de tumor p53, através de um complexo com a ubiquitina –ligase E6AP, interferindo no ciclo celular e nas funções pró-apoptóticas e tal acontecimento acarreta na liberação do fator transcripcional E2F, levando a um aumento de ciclinas A e E que promovem a progressão do ciclo celular (SWANTON & JONES, 2001; HEILMANN & KREIENBERG, 2002; LONGWORTH; YUGAWA & KIYONO, 2009). No caso da E7, esta associa-se e desestabiliza a pRb (proteína de suscetibilidade ao retinoblastoma), que é um regulador negativo do ciclo celular na passagem de G1 para S, promovendo a proliferação celular (CÂMARA et al., 2003; DUCATMAN & CIBAS, 2014).

Estudos semelhantes evidenciaram também a interação destes oncogenes virais com outras proteínas supressoras tumorais, p16 e p21, sendo que a primeira desempenha um papel importante no ciclo celular, encarregada da regulação

deste, pela desaceleração da progressão de células de fase G1 para a fase S, por ser um inibidor de quinases dependentes de ciclina, tais como CDK4 e CDK6, capazes de fosforilar o pRb, o que, geralmente, leva ao avanço do ciclo celular. Além de que um acúmulo de p16 em níveis celulares funciona como gatilho para o processo de senescência (RAYESS et al., 2012). Juntamente com este, o supressor tumoral p21 desempenha uma incumbência semelhante, sendo também inibidor de quinases dependentes de ciclina, porém, desta vez as CDK2 e CDK1. Atua também nos mecanismos de apoptose e senescência, lembrando que esta é subordinada ao p53 (GARTEL et al., 2005).

De acordo com Portari et al. (2013), no momento em que E6 interage com p53 inativando-o, o gene de transcrição da p21 é inibido, o que paralisa os pontos de checagem do ciclo celular da fase G1 para S e de G2 para M; e altera a estabilidade do DNA. Ademais, o oncogene E7 também exerce interação com p21, bloqueando sua habilidade de inibir a atividade das CDK. Em relação a p16, a inativação da pRb por E7 dispara um mecanismo compensatório que promove uma superexpressão de p16 e a aglutinação de seu produto proteico na célula. Todos estes fatores corroboram para apontar os oncogenes virais do HPV, E6 e E7, como essenciais para a imortalização, transformação e carcinogênese celular (ZUR HAUSEN, 2009).

Foi evidenciada a participação dos oncogenes E6 e E7 em vias metabólicas, mais especificamente, na promoção da expressão da subunidade  $\alpha$  do fator de indução de hipóxia 1 (HIF-1 $\alpha$ ) (LI et al., 2011). Um fator de transcrição de suma importância na resposta celular à deficiência de oxigênio. A subunidade  $\alpha$  é responsável por uma elevação na taxa de glicólise e na atenuação do ciclo do ácido cítrico e fosforilação oxidativa (CHEN et al., 2001; MATHUPALA et al. 2001), atuando também na estimulação da proliferação de células cancerígenas, resistência a apoptose, migração e invasão (HU et al., 2014), além de ligar-se a região promotora dos transportadores de glicose 1 (GLUT1), e induzindo tanto a expressão de mRNA quanto proteica de GLUT1 e, também sua translocação para a membrana plasmática de adipócitos (KIHIRA et al., 2011). O trabalho realizado por FAN e colaboradores (2016), cujo enfoque era em HPV 16, revelou a

participação de E6 e E7 na modulação de GLUT1 via HIF-1 $\alpha$  em câncer de pulmão. Tal mecanismo ilustra o efeito Warburg, no qual ocorre a produção de lactato a partir de glicose, mesmo em condições aeróbicas, visando suprir a grande demanda energética da proliferação tumoral e síntese de macromoléculas (MOHD et al., 2014).

Um elemento central intermediador de glicólise e aporte de glicose para as células tumorais é a isoforma M2 da piruvato quinase (M2PK), que resulta do *splicing* do gene da piruvato quinase (PKM), sendo esta dominante em células proliferativas. Ela ocorre em forma de tetrâmero com grande afinidade por seu substrato fosfoenolpiruvato (PEP) e também em forma de dímero, sendo esta afinidade por PEP mais baixa (MAZUREK et al., 1997; EINGBRODT et al., 1994). Foi descrita como alvo dos oncogenes de HPV 16, que acabam por promover a forma dímero, que devido à falta de afinidade por PEP, acaba sendo responsável pelo acúmulo de todos os intermediários glicolíticos acima do piruvato, e estes são destinados a uma via de síntese de ácidos nucleicos, fosfolipídios e aminoácidos, os quais são benéficos ao metabolismo tumoral (EINGBRODT et al., 1992). Ensaios clínicos efetuados em pacientes com câncer cervical mostraram níveis elevados de M2PK em amostras de plasma (KAURA et al. 2004).

Um outro fator que age sobre o *splicing* de PKM, por meio de uma maquinaria que garante a inclusão de um exon 10, promovendo a expressão da isoforma M2PK, é o proto-oncogene c-Myc, que é um fator transcricional envolvido na progressão do ciclo celular, proliferação, metabolismo, transformação e apoptose, também é afetado pela presença dos oncogenes virais. Durante a proliferação e diferenciação celular a expressão proteica de c-Myc está bem regulada. Entretanto, quando c-Myc sofre ação da E6 e E7, os níveis do primeiro tornam-se aumentados o que modula p21, diminuindo sua expressão (WANG et al., 2006; GARTEL et al., 2005).

Adicionalmente, estudos apontaram que a proteína de ligação de Myc (MycBP), que se liga a cauda N-terminal de c-Myc, afim de ampliar a capacidade deste último de formar um homodímero que se liga à E-box (locais do DNA com a sequência consenso CANNTGA com papel regulador de genes-alvo, ativando ou

reprimindo a transcrição destes) (HU et al., 1990; JUNG & HERMEKING, 2009) também está associado ao gene REPIN-1 (KRISTENSEN et al., 2012).

REPIN-1, iniciador de replicação 1, é uma proteína dedo de zinco que foi inicialmente descoberta em um estudo investigativo de proteínas ligantes de DNA envolvidas na replicação e ativação do gene diidrofolato redutase em hamster chinês (DAILEY et al., 1990). É altamente expresso no fígado e em tecido adiposo, estando diretamente relacionado a vias metabólicas de lipídeos e glicose atuando sobre a regulação de moléculas chaves nestes processos (KERN et al., 2014). Ensaios de *knockdown* de REPIN-1 em adipócitos implicam na redução significativa dos transportadores de glicose GLUT1 (RUSCHKE et al., 2010).

Desta maneira, ao analisar os resultados e estudos realizados até o presente momento, estes se mostram condizentes com a hipótese de que REPIN-1 teria um papel no estabelecimento e progressão de uma neoplasia maligna, associada a uma infecção prévia por HPV de alto grau em cérvix, funcionando como regulador metabólico, o qual poderia funcionar como marcador prognóstico e diagnóstico, ou até mesmo, possível alvos moleculares terapêuticos para um câncer que é um grande problema de saúde pública, pois representa a quarta causa de morte por câncer entre as mulheres em todo o mundo (FERLAY et. al, 2018).

## 2. OBJETIVO(S)

Diante do exposto, neste projeto, investigamos o papel de REPIN-1 como marcador tumoral em câncer cervical. Nesse estudo utilizamos experimentos com cultura de células tumorais cervicais como SiHa, Caski e HeLa que são positivas para HPV dos tipos 16, com exceção de HeLa, que é positiva para HPV 18; amostras de queratinócitos primários humanos transduzidos com vetor retroviral contendo oncogenes de HPV16; amostras de cortes histológicos apresentando neoplasias intraepiteliais cervicais de diferentes graus. Avaliamos, portanto, os níveis de mRNA e proteicos de REPIN-1 bem como sua localização celular buscando-se compreender o papel deste gene no câncer cervical.

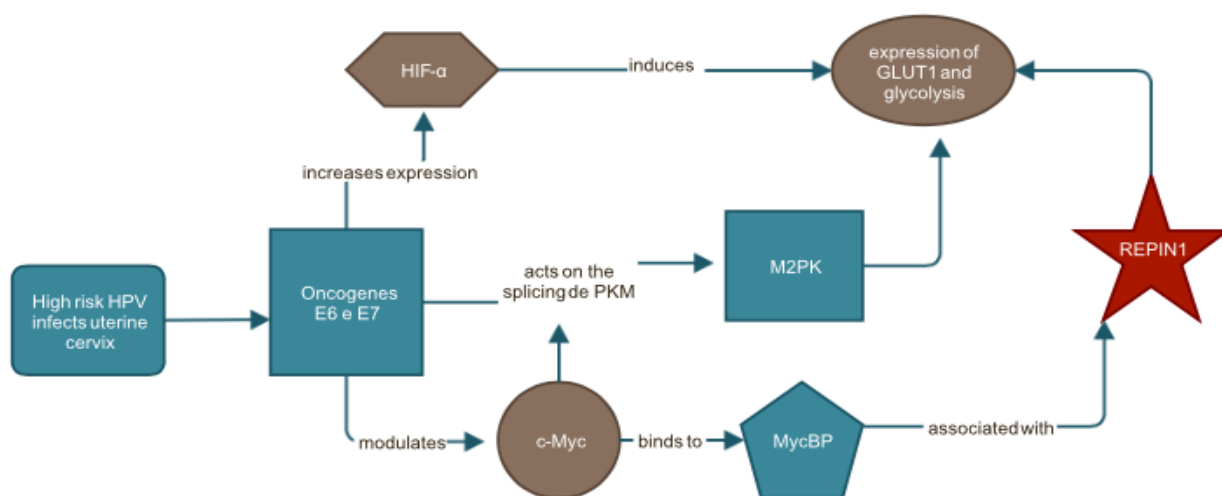


Figura 1: Mecanismo hipotético de REPIN-1

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1- Linhagens Celulares (doadas pela Dra. Luísa Lina Villa, Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer - SP/Brasil).

SiHa: Linhagem celular de origem de neoplasia de cérvix uterina escamosa humana, com propriedade aderente, morfologia semelhante à célula epitelial. Tumorigênica em camundongos nude, formando carcinoma epidermal pouco

diferenciado (grau III). Contém uma cópia genoma do papilomavírus humano do tipo 16. Genes p53 e pRB sem mutações (ATCC; SCHEFFER et al, 1991).

HeLa: Linhagem celular de origem neoplasia de cérvix uterina humana metastática, com propriedade aderente, morfologia semelhante à célula epitelial. Contém aproximadamente 10 a 50 cópias do genoma do papilomavírus humano do tipo 18. Genes p53 alterado e pRB sem mutações (ATCC; SCHEFFER et al, 1991).

CaSki: Linhagem celular de origem de neoplasia de cérvix uterina humana metastática, com propriedade aderente, morfologia semelhante à célula epitelial. Contém aproximadamente 500 cópias do genoma do papilomavírus humano do tipo 16. Genes p53 e pRB sem mutações (ATCC; SCHEFFER et al, 1991).

C33A: Linhagem celular de origem de neoplasia de cérvix uterino humano metastática, com propriedade aderente, morfologia semelhante à célula epitelial. Tumorigênica em camundongos *nude*, formando carcinomas indiferenciados. Negativa para DNA e RNA do papillomavirus humano (HPV). Genes p53 e pRB com mutações (ATCC; SCHEFFER et al, 1991).

### **3.2- Condições de cultura e manutenção das linhagens celulares**

As células foram cultivadas a 37°C em frascos plásticos descartáveis contendo meio de crescimento DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 25 µg/ml de ampicilina e 100µg/ml de estreptomicina, em atmosfera úmida de 5% de CO<sub>2</sub> e 7,5% para queratinócitos. As células foram sub-cultivadas sempre que atingiram 80% de confluência utilizando tripsina a 0,1% em PBSA (tampão fosfato livre de Cálcio e Magnésio) contendo 1mM EDTA, em cultura previamente lavada com solução de PBSA. Os estoques celulares foram mantidos no meio de cultivo contendo 10% DMSO (dimetilsulfóxido) a -190°C, em reservatório contendo nitrogênio líquido.

### **3.3- Amostras de proteínas de queratinócitos primários infectados por oncogenes E6 e E7 (doadas pelo Prof. Doutor Enrique Mario Boccardo**

**Pierulivo, Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. - SP/Brasil).**

PHK: Queratinócitos primários humanos originados de prepúcio de recém-nascidos, Lonza, Basel, Suíça.

PHKE6: Queratinócitos transduzidos com vetor retroviral contendo a sequência E6 de HPV16.

PHKE7: Queratinócitos transduzidos com vetor retroviral contendo a sequência E7 de HPV16.

PHKE6&E7: Queratinócitos transduzidos com vetor retroviral contendo a sequência E6 e E7 de HPV16.

### **3.4- Extração de RNA total**

As quatro linhagens celulares foram plaqueadas na densidade de  $10^6$  células/placa 100 mm. As coletas foram realizadas após 5 dias de cultivo. Para a coleta foi removido meio e as células lavadas por 3 vezes com PBSA.

O ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) foi extraído utilizando-se o *Kit RNeasy Plus Mini* (Qiagen, Hilden, Germany), segundo instruções do fabricante.

### **3.5- Preparação dos cDNAs**

Para a reação de transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), foi utilizado o kit comercial *High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit* (ThermoFisher Scientific), seguindo as orientações do fabricante. Em seguida, as amostras foram colocadas no termociclador no seguinte programa: 10 min a 25°C, 120 min a 37°C, 5 min a 85°C e mantidos a 4°C. As amostras de DNA complementar (cDNA) não foram quantificadas, visto que o produto da reação continha, além de cDNA, diversos dNTPs, que poderiam indicar um falso positivo na quantificação. Portanto, considerou-se que todo o RNA mensageiro contido no RNA total inicial foi convertido em cDNA. Para uso na

placa de Real-Time PCR, o cDNA utilizado não foi diluído. Os cDNAs foram armazenados em freezer -20°C.

### 3.6- Reação de Real Time PCR

Para a reação de real time PCR foram utilizados 9µL da solução de *Taqman® Master Mix II* com UNG (Thermo Fischer Scientific) e 1µL de cDNA por poço em placa de 96 poços (MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate). Foram utilizados primers dos genes de interesse REPIN-1, cuja sequência genômica é: [AAAGCAGCTTCGAGCTCATCTGCGG[C/T]GGTGCCACCCTCCCGCCCCGGAG GC] e o gene endógeno B-actina, ambos da Taqman®.

O ensaio de Real-time PCR foi realizado no aparelho Gene Amp 5700 Sequence Detection System (PE - Applied Biosystems) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, desnaturação a 95°C por 10 segundos, anelamento dos primers e extensão a 60 °C por 1 minuto. Cada amostra foi feita em triplicata biológica, usando duplicata de poços. Como controle negativo para a reação de real-time PCR foram utilizados poços que continham o mix da reação mais os primers, na ausência do template (cDNA).

A análise das curvas de *melting* e de dissociação foram feitas ao final de cada corrida como controle da qualidade da amplificação gênica. O *threshold* (cycle threshold -Ct) de cada corrida foi padronizado como 0.1, ponto no qual a amplificação observada estava na fase logarítmica.

Para análise da expressão gênica através de Real-time PCR foi utilizado o método Delta-Delta Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ) (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Calculamos inicialmente o  $\Delta Ct$  de cada amostra, subtraindo-se os valores de CT (threshold cycle ou limiar do ciclo) do gene controle (GAPDH ou Tubulina) dos valores de CT do gene alvo. Após, determinar o  $\Delta Ct$  da amostra, escolhemos como amostra normalizadora o cDNA de C33A (HPV negativa) cultivada na ausência de substrato. Para o cálculo do  $\Delta\Delta Ct$  se utilizou da fórmula seguinte: [ACT (amostra) - (amostra normalizadora)]. Uma vez determinado o  $\Delta\Delta Ct$ , aplicou-se a fórmula  $2^{\Delta\Delta Ct}$ , que resultou no valor da expressão gênica relativa.

Para utilizar o método comparativo ou  $2\Delta\Delta CT$ -, foi necessário determinarmos inicialmente a eficiência de amplificação do gene alvo e do controle interno. Para tanto, foram feitas curvas de diluições seriadas dos pools de cDNAs para cada um dos genes estudados, partindo dos cDNAs diluídos na proporção 1:3 v/v. Para comparar a eficiência de amplificação dos dois genes, foram subtraídos os valores de CT do gene controle dos valores de CT do gene alvo.

A diferença foi plotada contra o logaritmo da diluição de cDNA. Se a inclinação da reta (slope), for menor ou igual que 0,1 a eficiência de amplificação é comparável, podendo-se assim utilizar este método.

### **3.7- Imunomarcção**

Para a imunomarcção, lâminas contendo cortes histológicos de NIC 1, NIC 2, NIC 3 e Carcinoma Invasor de colo de útero de mulheres infectadas com HPV16 foram fixadas com 4% (peso /vol) de paraformaldeído (Sigma # P6148) (PFA) em DPBS durante 20 minutos e depois lavadas durante 15-20 min três vezes em DPBS recém preparado, permeabilizadas por meio de tratamento com 0,2% (vol/vol) Triton X-100 em DPBS durante 10 minutos, feito isso, lavadas durante 15-20 min três vezes em DPBS e tratadas com 0,5% (p/v) de SDS durante 5 minutos para a recuperação de antígeno. As lâminas foram lavadas durante 15-20 minutos três vezes em DPBS e bloqueadas com 5% (vol/vol) de soro de cabra + 0,5% (p/v) de BSA (albumina sérica bovina) em DPBS durante pelo menos 2 h (solução de bloqueamento). As lâminas foram então incubadas com o anticorpo primário REPIN-1 policlonal provindo de IgG de coelho 1:100 (SIGMA # HPA036022) durante a noite a 4 ° C. No dia seguinte, os poços foram lavados durante 15-20 minutos três vezes DPBS, Os anticorpos secundários utilizados foram da DakoEnVision™+ Dual Link System-HRP. aplicados durante 2 h à temperatura ambiente. Após lavagem em DPBS, as lamínulas foram removidas e montadas em reagente antidesbotamento Prolong Gold com DAPI (Life Technologies) para corar os núcleos das células. Um microscópio Zeiss Imager Z.1 com ApoTome foi utilizado para analisar e fotografar s imunofluorescência, utilizando uma objetiva de 63x.

### 3.8- Western Blotting para REPIN-1

Quantidades de proteínas foram quantificadas usando o método de Bradford, sendo utilizado cerca de 40ug de amostra de cada linhagem celular (CaSki, SiHa, HeLa, C33A, PHKE6, PHKE7, PHKE6&E7 e queratinócitos primários (PHK) como controle. Estas juntamente com um padrão de massa molecular (BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder, Invitrogen) foram ressuspensas em 50 µL de tampão de amostra para eletroforese (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8; SDS 2,0%; glicerol 20%; β-mercaptoetanol 1,96%; azul de bromofenol 0,01%). A eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS foi feita segundo Laemmli (Laemmli, 1970), onde o gel de corrida era constituído de acrilamida 7,5%; o de empilhamento 3% e a espessura do gel era de 1,5 mm. As amostras de eletroforese foram aplicadas no gel imerso em tampão de eletroforese (Tris-base 25 mM pH 7,3; glicina 192 mM).

Após a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS, as proteínas contidas no gel foram transferidas para uma membrana de PVDF (Immobilon-P Transfer Membrane, Millipore). A membrana foi previamente tratada com metanol 100% por 2 minutos, água MilliQ por 2 minutos e equilibrada em tampão de transferência (Tris base 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%) por pelo menos 5 minutos. Para a transferência utilizamos um sistema tipo sanduíche, submerso em tampão de transferência, sobre o qual foi aplicada uma corrente elétrica de 350 mA durante aproximadamente duas horas. Em seguida, a membrana foi corada por 10 minutos com Ponceau (Ponceau S – Sigma - 0,1%; ácido acético 10%) e descorada com água MilliQ, até que as bandas desejadas possam ser visualizadas. As posições correspondentes aos padrões de massa molecular foram marcadas para posteriormente auxiliarem na identificação.

Após a transferência, a membrana foi colocada numa solução de bloqueio (NaCl 150mM; fosfato de sódio monobásico 2,8 mM; fosfato de sódio dibásico 7,2 mM; leite em pó desnatado 5%, Tween-20 0,1%) durante uma hora, para bloquear possíveis ligações inespecíficas. Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo primário mantendo-o de um dia para o outro a 4°C com leve agitação. Foram feitas a seguir cinco lavagens, de 10 minutos cada, com solução de tampão de lavagem (TBS-T). A membrana foi então incubada por uma hora com anticorpo

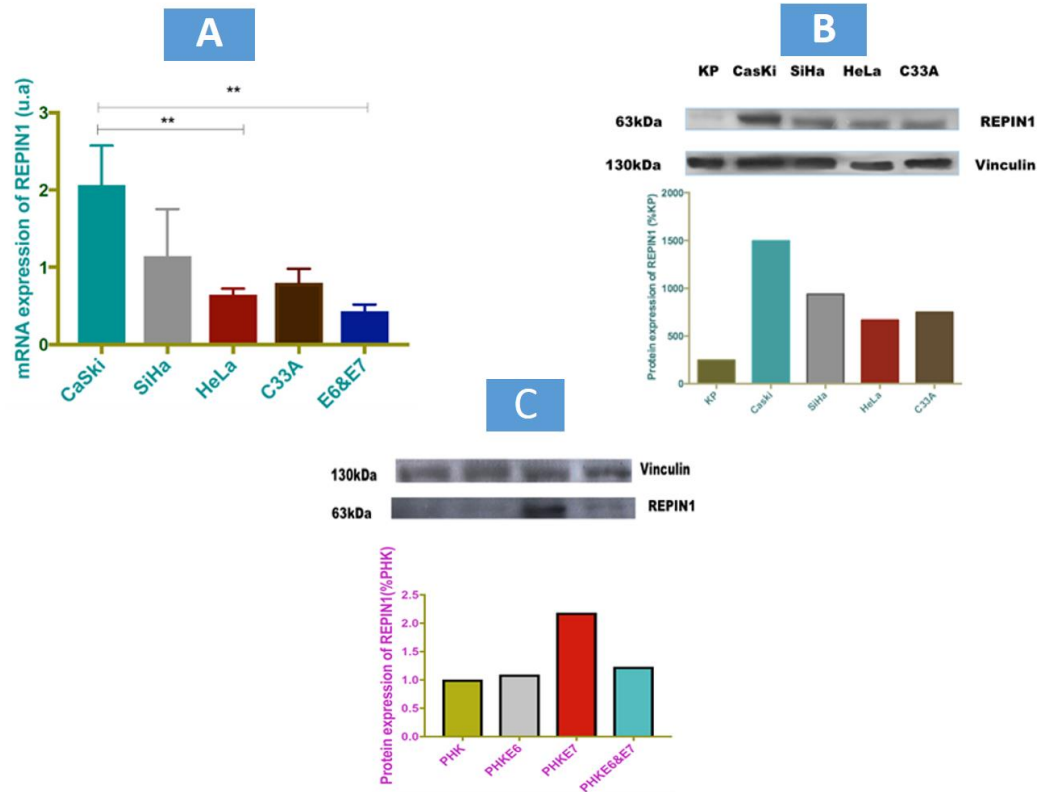
secundário, anticorpo anti-IgG conjugado a peroxidase, em solução de bloqueio à temperatura ambiente. A membrana foi novamente lavada, por cinco vezes, como acima descrito. Em seguida, incubamos a membrana durante 1 minuto, sob leve agitação, com ECL (Amersham), reagente para imuno-deteccção através de quimioluminescência. Logo após, a membrana foi exposta utilizando o digitalizador de imagens ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare, USA).

### **3.9- Análise dos resultados**

Os resultados foram representados pela média e desvio padrão relativo. Para análise dos dados das curvas de crescimento foi aplicado o teste de variância One-Way Anova seguido do teste de múltiplas comparações (Teste de Tukey) utilizando o programa GraphPad InStat software (versão 5.01 para Windows 95, GraphPad Software, San Diego, California, USA). Para análise de expressão gênica relativa foi aplicado o Teste-t em cada par de condições. Os resultados dos p-values foram demonstrados com ( $P=x$ ) utilizando o programa R software (versão 2.2.1 para Windows, R-project). A significância estatística de ambos os testes foi considerada como  $P^* < 0.05$ ,  $P^{**} < 0.01$  e  $P^{***} < 0.001$ .

## **4. RESULTADOS**

Visando testar a hipótese de que o REPIN-1 teria um papel no estabelecimento e progressão de uma neoplasia maligna, associada a uma infecção prévia por HPV de alto grau em cérvix uterina, funcionando como regulador metabólico e auxiliando na demanda energética de glicose necessária para a progressão tumoral, avaliamos os níveis gênicos de REPIN-1 em diferentes linhagens de células neoplásicas de colo de útero infectadas por HPV, sendo elas CaSki, com mais de 600 cópias de HPV 16, SiHa com HPV 16, HeLa com HPV 18 e C33A, sem HPV, porém, ainda uma linhagem neoplásica de colo de útero; queratinócitos transfectados com os oncogenes E6 & E7; além de queratinócitos que foram usados como controle. Os resultados obtidos estão apresentados na figura 2.



**Figura 2: Expressão gênica e proteica de REPIN-1 (A)** A expressão de mRNA de REPIN-1 (u.a) em amostras de CaSki, SiHa, HeLa, C33A e E6&E7. Os ensaios de RT-PCR foram realizados em triplicata e normalizados por queratinócitos. Valores são médias  $\pm$  SD \*\*\* P <0,0001; \*\* P <0,001; \* P <0,05. **(B) e (C):** Expressão proteica de REPIN-1 (u.a) nas amostras de queratinócitos primários humanos (PHK), CaSki, SiHa, HeLa C33A, PHKE6 (queratinócitos primários humanos infectados com E6), PHKE7 (queratinócitos primários humanos infectados com E7) e PHKE6&E7 (queratinócitos primários humanos infectados com E6&E7). As membranas foram incubadas com anticorpos policlonais anti-REPIN-1 (1:200) e anti-vinculina (1:1000). A representação gráfica se refere ao aumento percentual dos níveis de REPIN-1 sobre queratinócitos (PHK). Tanto o experimento B quanto C se referem a uma única replicata experimental.

Com relação aos níveis proteicos de REPIN-1, as proteínas totais foram extraídas das linhagens celulares supracitadas, e submetidas ao procedimento de Western Blot, e logo após foi estimado o aumento percentual das demais linhagens sobre queratinócitos. Os resultados obtidos foram apresentados na imagem B.

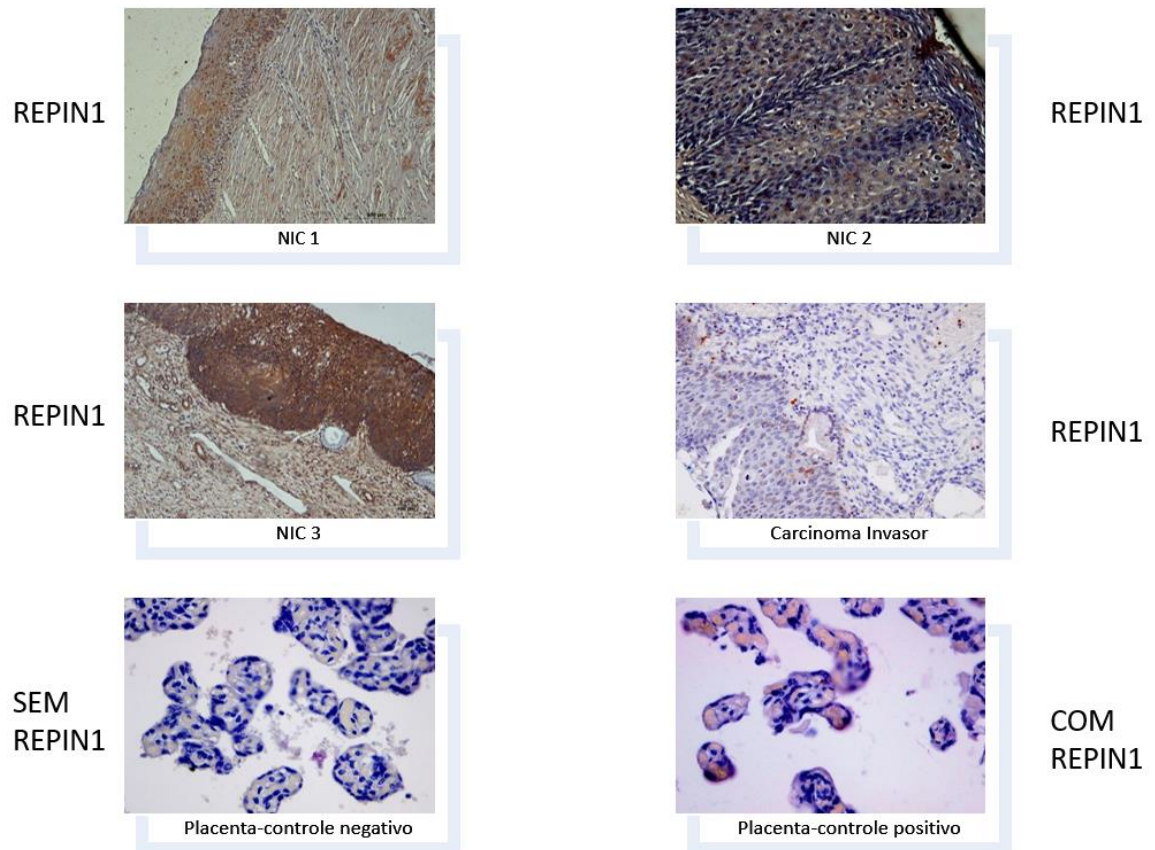
Observando tais resultados notamos que os níveis protéicos de REPIN-1 são maiores do que os queratinócitos em todas as células e acentuando-se em CaSki. Para se ter uma discussão robusta, necessitamos refazer os experimentos em replicatas para avaliarmos estatisticamente, o que não foi possível até o presente momento.

Um dos pontos mais relevantes, apresentados na imagem C, ao analisar a expressão proteica de REPIN-1 em queratinócitos transfectados com E6, E7 e E6&E7, foi que o oncogene E7 parece contribuir para a expressão de proteína de REPIN-1, quando comparado com os queratinócitos transfectados com E6 sozinho ou com E6 e E7.

### **Imunohistoquímica**

Para a imunohistoquímica, lâminas provenientes de biópsias de pacientes foram desparafinizadas e submetidas a incubação anticorpos primários que foram utilizados para a imunocoloração neste estudo

Os cortes utilizados foram Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) 1, NIC 2 e NIC 3, que são diferentes estágios de progressão da neoplasia com caracteres de malignidade cada vez mais presentes; carcinoma invasor e placenta, como controle positivo e negativo.



**Figura 3- Cortes histológicos de NIC 1, NIC 2, NIC 3 e Carcinoma Invasor de colo de útero de mulheres infectadas com HPV16.** Foram incubados com anticorpo policlonal contra REPIN-1 (1:100). Aumento de 40X em NIC2 e nas demais 20x. Em relação aos cortes histológicos de placenta, o primeiro foi utilizado como controle negativo, e o segundo foi incubado com o anticorpo, funcionando como controle positivo. Aumento 40x.

Observando os cortes incubados com REPIN-1 temos que em amostras clínicas, há alta marcação mostrando altos níveis de REPIN-1 na progressão da neoplasia intraepitelial cervical quando comparado ao carcinoma escamoso invasor.

## 5. DISCUSSÃO

O Papilomavírus Humano (HPV) é um vírus epiteliotrópico, associado como agente causal em neoplasias que incluem o colo de útero, anal, vulvar, vaginal, peniana, e da orofaringe. A infecção persistente com os tipos de HPV de alto risco, 16 e 18 são responsáveis pelo desenvolvimento de 70% dos cânceres de colo de útero no mundo (BETIOL et al, 2013). A transformação maligna é frequentemente acompanhada por mudanças metabólicas significativas. Durante as últimas décadas tem aumentado o interesse em pesquisa em metabolismo tumoral. Na literatura há vários trabalhos descrevendo a diferença dos perfis metabólicos entre células tumorais e células normais. Células tumorais têm altas demandas metabólicas e utilizam nutrientes com programação metabólica alterada para suportar suas altas taxas de crescimento proliferativo e se adaptarem ao microambiente tumoral (ZIELINSKI et al., 2017).

Em particular, duas características principais têm chamado muito atenção: o aumento da taxa de glicose acompanhado pelo aumento da secreção de lactato, mesmo na presença de oxigênio, conhecido como efeito Warburg; e o aumento da taxa de glutamina essencial para o crescimento, conhecido como dependência à glutamina. No efeito Warburg, as células cancerígenas, paradoxalmente, convertem a maior parte do piruvato em lactato, com um rendimento extremamente baixo, que, conseqüentemente, exige uma alta taxa de consumo de glicose para satisfazer as suas necessidades energéticas e anabolizantes (ZIELINSKI et al., 2017).

Um trabalho realizado por FAN e colaboradores (2016), cujo enfoque era em HPV 16, revelou a participação de E6 e E7 na modulação de GLUT1 via HIF-1 $\alpha$  em câncer de pulmão. Tal mecanismo ilustra o efeito Warburg, no qual ocorre a produção de lactato a partir de glicose, mesmo em condições aeróbicas, visando suprir a grande demanda energética da proliferação tumoral e síntese de macromoléculas (IQBAL et al., 2014).

O iniciador de replicação 1 (REPIN-1) é uma proteína ligada ao DNA que permite a iniciação da replicação do mesmo. Os papéis fisiológicos e regulatórios

de REPIN-1 ainda não foram totalmente elucidados, mas descobertas recentes sugeriram suas implicações na obesidade e síndromes metabólicas relacionadas, incluindo transporte de glicose, transporte de ácidos graxos, adipogênese e o formação e fusão de gotículas lipídicas (ANDRADE et. al). Dado que REPIN-1 está envolvido na replicação do DNA, sua desregulação pode ser um mecanismo potencial envolvido na tumorigênese.

Nossos experimentos revelam uma maior expressão de REPIN-1 em linhagens SiHa e CaSki (ambas com HPV16), sendo que CaSki tem aproximadamente 500 cópias do genoma do papilomavírus humano do tipo 16, assim sendo possível que a carga viral tenha influência na magnitude desta expressão, porém, para comprovar de maneira fidedigna serão necessários mais estudos in vitro e clínicos, para verificar de fato se a carga viral influencia na magnitude da resposta metabólica. Observamos também uma maior expressão de REPIN-1 em queratinócitos transfectados com oncogenes E6 e E7 do HPV 16, com participação majoritária do oncogene E7 na modulação de REPIN-1. Em amostras clínicas, há um maior envolvimento de REPIN-1 na progressão da neoplasia intraepitelial cervical quando comparado ao carcinoma escamoso invasor, o que pode ser explicado pelo possível “shift” metabólico observado na invasão e que culmina em decaimento da expressão de REPIN-1.

Isso, potencialmente, poderia estar relacionado a uma regulação pós-transcricional de REPIN-1, talvez modulada por HPV. Além disso, podemos inferir a correlação da glicólise no câncer de colo de útero, juntamente com um aumento do efeito Warburg resultando numa maior atividade metabólica, o que levaria a células mais invasivas e proliferativas.

Um dos pontos mais relevantes, apresentados na imagem C ao analisar a expressão proteica de REPIN-1 em queratinócitos transfectados com E6, E7 e E6&E7, é de que verificamos que o oncogene E7 parece contribuir para a expressão de proteína de REPIN-1, quando comparado com os queratinócitos transfectados com E6 sozinho ou com E6 e E7, devido ao fato de que estar associado com o ciclo reprodutivo do vírus e interagir com os mediadores metabólicos.

Nossos resultados fornecem evidências sobre a ação de REPIN-1 como um possível modulador entre a infecção por HPV e a progressão do tumor no câncer cervical, encorajando mais estudos sobre este gene e se o mesmo poderia atuar como marcador tumoral e auxiliar no seguimento terapêutico da paciente.

## **6. CONCLUSÃO (ÕES)**

- ✓ Possível relação entre REPIN-1 e HPV 16 e HPV18, sendo, aparentemente, mais influenciado pelo HPV 16, assim como pela carga viral.
- ✓ HPV poderia modular os níveis proteicos de REPIN-1 por meio de uma regulação pós-transcricional;
- ✓ REPIN-1 superexpresso poderia atuar como um modulador entre a infecção por HPV de alto risco e a progressão do câncer de colo de útero.
- ✓ HeLa, C33A e queratinócitos transfectados com E6&E7 apresentaram expressões variáveis, mais proeminente em queratinócitos transfectados com oncogenes provenientes de HPV 16.
- ✓ Participação majoritária do oncogene E7 na modulação de REPIN-1
- ✓ Maior envolvimento de REPIN-1 na progressão da neoplasia do que num carcinoma propriamente dito.

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. ALTERS, S.; ALTERS, B. **Biology: Understanding life**. Hoboken, NJ: Wiley, 2005
2. ANDRADE FDE O, DE ASSIS S, JIN L, FONTELLES CC, BARBISAN LF, PURGATTO E, ET AL. **Lipidomic fatty acid profile and global gene expression pattern in mammary gland of rats that were exposed to lard-based high fat diet during fetal and lactation periods associated to breast cancer risk in adulthood**. *Chem Biol Interact* 239:118–128,2015.
3. BETIOL, J.; VILLA, L.;SICHERO, L. **Impact of HPV Infection on the Development of Head and Neck Cancer**. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 46.3 217–226, 2013.
4. CÂMARA, G. N. N. L. et al. **Os papilomavírus humanos -HPV: histórico, morfologia e ciclo biológico**. *Universitas Ciências da Saúde*, v. 01, n. 01, p.149-158, 2003.
5. CHEN, C.; PORE, N.; BEHROOZ, A.; ISMAIL-BEIGI, F.; MAITY, A. **Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H- ras and hypoxia**. *J Biol Chem.*;276(12):9519–25,2001.
6. CIBAS, ES; DUCATMAN, BS. **Cytology: Diagnostic Principles and Clinical Correlates** (4<sup>rd</sup> edition). New York: Saunders/Elsevier, 2014.
7. COLLIER L.; OXFORD J. **Human Virology**. (3<sup>rd</sup> edition) Ed. London. Oxford University Press; 2006. pp: 195-217.
8. DAILEY, L.; CADDLE, MS.; HEINTZ, N.; HEINTZ, NH. **Purification of RIP60 and RIP100, mammalian proteins with origin-specific DNA-binding and ATP-dependent DNA helicase activities**. *Mol Cell Biol*;10:6225–6235, 1990.
9. DOORBAR, J. **Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer**. *Clinical Science*, London, v. 110, p. 525-541, 2006.
10. EIGENBRODT, E.; GERBRACHT, U.; MAZUREK, S.; PRESEK, P; FRIIS, R. **Carbohydrate metabolism and neoplasia: New perspectives for**

- diagnosis and therapy.** In *Biochemical and Molecular Aspects of Selected Cancers*, 2, pp. 311–385, Academic Press, 1994.
11. EIGENBRODT, E.; REINACHER, M., SCHEEFERS-BORCHEL, U.; SCHEEFERS, H.; FRIIS, R. **Double role for pyruvate kinase type M2 in the expansion of phosphometabolite pools found in tumor cells.** *Crit. Rev. Oncog.* **3**, 91–115, 1992.
  12. EVANDER, M.; FRAZER, I.H.; PAYNE, E.; MEY, Q.Y.; HEMGEST K.; MCMILLAN, N.A.J. **Identification of the alpha 6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses.** *J. Virol.* **71**: 149-56, 1997.
  13. FAN, R.; HOU, WJ.; ZHAO, YJ. *et al.* **Overexpression of HPV16 E6/E7 mediated HIF-1alpha upregulation of GLUT1 expression in lung cancer cells.** *Tumour Biol* ,2015;
  14. FERLAY J, COLOMBET M, SOERJOMATARAM. **Global and Regional Estimates of the Incidence and Mortality for 38 Cancers: GLOBOCAN**, 2018.
  15. GARTEL, A. L.; RADHAKRISHNAN, S. K. **Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences.** *Cancer Res.* **65**, 3980–3985, 2005
  16. HEILMANN, V.; KREIENBER, R. **Molecular biology of cervical cancer and its precursors.** *Curr Womens Health Rep* **2**: 27-33, 2002
  17. HOWLEY, PM. **Papillomaviridae: the viruses and their replication.** In: FIELDS, BN.; KNIPE, DM.; HOWLEY, PM. **Virology** (3rd ed.), Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers pp: 947–78, 1996
  18. HU, H.; TAKANO, N.; XIANG, L.; GILKES, DM.; LUO, W.; SEMENZA, GL. **Hypoxia-inducible factors enhance glutamate signaling in cancer cells.** *Oncotarget.* ;**5**(19):8853–68, 2014.
  19. IQBAL, M. A.; GUPTA, V.; GOPINATH, P.; MAZUREK, S.; BAMEZAI, R. N. **Pyruvate kinase M2 and cancer: an updated assessment.** *FEBS Lett.* **588**, 2685-2692, 2014.

20. KAURA, B.; BAGGA, R.; PATEL, FD. **Evaluation of the pyruvate kinase isoenzyme tumor (Tu M2-PK) as a tumor marker for cervical carcinoma.** *J Obstet Gynaecol Res* ;**30**: 193–6, 2004.
21. KERN, M.; KOSACKA, J.; HESSELBARTH, N.; BRÜCKENER, J.; HEIKER, J.T.; FLEHMIG, G.; KLÖTING, I.; KOVACS, P.; MATZ-SOJA, M.; GEBHARDT, R.; KROHN, K.; SALES, S.; ABSHANGEN, K.; SHEVCHENKO, A.; STUMVOLL, M.; BLÜHER, M.; KLÖTING, N. **Liver-restricted Repin1 deficiency improves whole-body insulin sensitivity, alters lipid metabolism, and causes secondary changes in adipose tissue in mice.** *Diabetes*, 63, pp. 3295–3309, 2014
22. KIHIRA, Y.; YAMANO, N.; IZAWA-ISHIZAWA, Y.; ISHIZAWA, K.; IKEDA, Y.; TSUCHIYA, K. et al. **Basic fibroblast growth factor regulates glucose metabolism through glucose transporter 1 induced by hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in adipocytes.** *Int J Biochem Cell Biol.*;43(11):1602–11, 2011.
23. KUILMAN, T.; MICHALOGLU, C.; MOOI, W.J.; PEEPEER, D.S. **The essence of senescence.** *Genes Dev.*, 24, pp. 2463–2479, 2010
24. LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227,p 680-685, 1970.
25. Li ,G.; HE L.; ZHANG, E.; SHI, J.; ZHANG, Q.; LE, AD.; et al. **Overexpression of human papillomavirus (HPV) type 16 oncoproteins promotes angiogenesis via enhancing HIF-1 $\alpha$  and VEGF expression in non-small cell lung cancer cells.** *Cancer Lett.*;311(2):160–70,2011
26. LIVAK, KJ.; SCHMITTGEN, TD. **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods* 25: 402-408, 2001
27. LOWRY, OH.; ROSEBROUG, NJ.; FARR, A.; RANDALL, RJ. **Protein measurement with folin-phenol reagent.** *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951
28. MATHUPALA, SP.; REMPEL, A.; PEDERSEN, PL. **Glucose catabolism in cancer cells: identification and characterization of a marked**

- activation response of the type II hexokinase gene to hypoxic conditions. *J Biol Chem.*276(46):43407–12, 2001.
- 29.MAZUREK, S.; BOSCHECK, C. B; EIGENBRODT, E. **The role of phosphometabolites in cell proliferation, energy metabolism, and tumor therapy.** *J. Bioenerg. Biomembr.* 29, 315–330, 1997.
- 30.MCMILLAN, N.A.; PAYNE, E.; FRAZER, I.H. & EVANDER, M. **Expression of the alpha 6 integrin confers papillomavirus capsid binding upon receptor-negative B-cells.** *Virology*, 261: 271-9, 1999.
- 31.MCMURRAY, HR.; NGUYEN, D.; WESTBROOK, TF.; MCANCE, DJ. **Biology of human papillomaviruses.** *Int. J. Exp. Pathol.*, 82, 15–33, 2001.
- 32.MILLER, O. J.; THERMAN, E. **Human chromosomes.** (4<sup>rd</sup> ed.) New York: Springer-Verlag,2001
- 33.PORTARI, E.A.; RUSSOMANO, F.B.; DE CAMARGO, M.J.; MACHADO GAYER, C.R.; DA ROCHA GUILLOBEL, H.C.; SANTOS-REBOUÇAS, C.B.; BRITO MACEDO, J.M. **Immunohistochemical Expression of Cyclin D1, p16Ink4a, p21WAF1, and Ki-67 Correlates With the Severity of Cervical Neoplasia.** *Int. J. Gynecol. Pathol.*, v.32, pp. 501–508, 2013
- 34.RAYESS, H.; WANG, MB.; SRIVATSAN, ES. **Cellular senescence and tumor suppressor gene p16.** *International journal of cancer. J Int Cancer.* 130:1715–1725, 2012.
- 35.RUSCHKE, K; ILLES, M.; KERN, M.; KLÖTING, I.; FASSHAUER, M.; SCHÖN, M.R.; KOSACKA, J.; FITZL, G.; KOVACS, P.; STUMVOLL, M.; BLÜHER, M.; KLÖTING, N. **Repin1 maybe involved in the regulation of cell size and glucose transport in adipocytes.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 400, 246–251, 2010.
- 36.SCHEFFNER, M., MÜNGER, K., BYRNE, J. C.; HOWLEY, P. M. **The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(13), 5523–5527, 1991.
- 37.SILVA CARDEAL, L.B.; BROHEM, C.A.; CORREA, T.C.S.; WINNISCHOFER, S.M.B.; NAKANO, F.; BOCCARDO, E.; VILLA, L.L.;

- SOGAYAR, M. C.; MARIA-ENGLER, S. S. **Higher expression and activity of metalloproteinases in human cervical carcinoma cell lines is associated with HPV presence.** *Biochemistry and Cell Biology (Print)*, Canadá, v. 84, p. 713-719, 2006.
38. SWANTON, C.; JONES, N. **Strategies in subversion: deregulation of the mammalian cell cycle by viral gene products.** *Int. J. Exp. Pathol.*, 82, pp. 3–13, 2001
39. WANG, W.; CHANG, H.S.; LIN, C.H.; YU, W.C. **HPV-18 E7 conjugates to c-Myc and mediates its transcriptional activity,** *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39 402–412, 2007.
40. YILMAZ, M.; CHRISTOFORI, G. **EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion.** *Cancer Metastasis Rev.* 28:15–33, 2009.
41. YUGAWA, T.; KIYONO, T. **Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins.** *Reviews in Medical Virology*; 19: 97–113, 2009.
42. ZIELINSKI DC, JAMSHIDI N, CORBETT AJ, BORDBAR A, THOMAS A, PALSSON BO. **Systems biology analysis of drivers underlying hallmarks of cancer cell metabolism.** *Sci Rep.* 25;7:41241,2017.
43. ZUR, HAUSEN.; H. **Papillomaviruses and Cancer: From Basic Studies to Clinical Application.** *Nat. Rev. Cancer* 2: 342-350, 2002



---

Data e assinatura do aluno (a)

14/12/2020



---

Data e assinatura do orientador(a)

14/12/2020