

Papel das Proteínas Precoces do Papilomavírus Humano na Carcinogênese

Role of the Human Papillomavirus Early Proteins in the Carcinogenesis

El papel de las Proteínas Tempranas del Virus del Papiloma Humano en la Carcinogénesis

Marcos Antonio Pereira de Lima¹; Cláudio Gleidiston Lima da Silva²; Silvia Helena Barem Rabenhorst³

Resumo

Introdução: O Papilomavírus Humano (HPV) é um agente epiteliotrópico que apresenta mais de 100 genótipos. Destes, alguns são considerados de alto risco devido ao potencial para induzir o surgimento de lesões malignas, como o carcinoma cervical, cujo percentual de associação com o referido vírus é de aproximadamente 90%. Nas células infectadas, duas proteínas virais desempenham papel fundamental na tumorigênese. **Objetivo:** Realizar uma revisão dos trabalhos existentes na literatura científica internacional com enfoque no papel das proteínas virais do HPV na carcinogênese. **Método:** Os artigos utilizados para a realização da presente revisão foram selecionados e obtidos na íntegra nos portais eletrônicos Pubmed e Periódicos Capes. Os descritores utilizados na busca incluíram: *Human Papillomavirus, HPV, viral proteins, E5, E6 e E7*. **Resultados:** As proteínas virais E6 e E7 são amplamente conhecidas por promoverem a degradação das proteínas celulares p53 e pRb, respectivamente, efeito que responde por grande parte do potencial oncogênico dos genótipos de alto risco de HPV, sendo funcionalmente equivalentes a mutações dos referidos genes celulares, que são comumente observadas em diversos tumores. Contudo, novos estudos têm demonstrado que essas proteínas virais também estão envolvidas em diversas outras vias tumorais, denotando novamente a relevância das mesmas nesse processo. Ademais, alguns trabalhos apontam a proteína E5 como coadjuvante na carcinogênese. **Conclusão:** Os diversos efeitos constatados das proteínas precoces virais culminam no favorecimento da proliferação celular descontrolada, imortalização, regulação da diferenciação celular, suscetibilidade à metástase e escape da vigilância imunológica.

Palavras-chave: Humanos; Infecções por Papillomavirus; Papillomaviridae-classificação; Carcionógenos; Proteínas Oncogênicas Virais

¹ Doutor em Biotecnologia em Saúde; Mestre em Microbiologia Médica; Professor-Adjunto da Faculdade de Medicina do Cariri da Universidade Federal do Cariri. Barbalha (CE), Brasil. *E-mail:* marcosantonio@ufc.br.

² Doutor em Farmacologia; Mestre em Patologia; Médico Patologista; Professor-Adjunto da Faculdade de Medicina do Cariri da Universidade Federal do Cariri. Barbalha (CE), Brasil. *E-mail:* claudiogleidiston@ufc.br.

³ Pós-Doutora em Genética Molecular; Doutora e Mestra em Ciências Biológicas (Genética); Professora-Associada da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, Campus Porangabussu. *E-mail:* srabenhorst@yahoo.com.br.

Endereço para Correspondência: Marcos Antonio Pereira de Lima. Rua Divino Salvador, 284 - Rosário Barbalha (CE), Brasil. CEP: 63180-000.

INTRODUÇÃO

Os Papilomavírus (PVs) compreendem uma família de patógenos conhecidos por infectar tecidos epiteliais de anfíbios, répteis, pássaros e mamíferos. Quase todos os vírus são estritamente relacionados aos seus hospedeiros específicos não infectando outros, mesmo espécies estreitamente relacionadas^{1, 2}. Atualmente, os PVs são incluídos na família *Papillomaviridae*, que, por sua vez, é dividida em 16 gêneros (alfa, beta, gama, delta, epsilon, zeta, eta, theta, iota, kappa, lambda, mu, nu, xi, omikron, pi), sendo que os Papilomavírus Humanos (HPVs) estão distribuídos em cinco gêneros: alfa (com 15 espécies), beta (5 espécies), gama (5 espécies), Mu (2 espécies) e Nu (1 espécie); e cada espécie pode apresentar vários genótipos virais³.

As dificuldades no estabelecimento de sistemas de cultura *in vitro* ou de modelos xenotrópicos de hospedeiros para os HPVs impediram a elaboração de um sistema robusto de classificação sorológica, de modo que, desde o início, a tipagem genética passou a ser o método mais viável para esses vírus⁴. Um novo tipo de PV é definido quando a sequência de DNA do quadro de leitura aberta L1 ou ORF L1 diferir mais de 10% da sequência do PV filogeneticamente mais próximo. Enquanto diferenças entre 2% a 10% definem os subtipos virais e, por fim, diferenças menores que 2%, as variantes. O ORF L1 é o gene mais conservado dentro do genoma dos PVs e tem sido utilizado por mais de 15 anos para a tipagem³.

Estruturalmente, os HPVs são caracterizados como vírus icosaédricos não envelopados, com diâmetro de 52 a 55 nm, apresentando um capsídeo formado por 72 capsômeros pentaméricos constituídos pelas proteínas L1 e L2². O cerne viral contém uma única molécula de DNA linear de fita dupla, que varia de 7.600 a aproximadamente 8.000 pb de extensão^{1, 5}.

O genoma pode ser dividido esquematicamente em três regiões principais: a) URR (do inglês, *Upstream Regulatory Region*), também conhecida como LCR (do inglês, *Long Control Region*), é uma região não codificante de cerca de 400 a 900 pb que, em geral, desempenha funções regulatórias como o próprio nome sugere, essa região contém a origem da replicação (ORI), promotores precoces e sítios de ligação para fatores de transcrição e proteínas reguladoras; b) região precoce, que contém seis ou mais ORFs (E1, E2, E4, E5, E6 e E7), envolvidos na transativação gênica, replicação, transformação e adaptação viral a diversos ambientes celulares; c) região tardia, que contém dois ORFs codificadores das proteínas tardias L1 e L2. Ademais, ambas as regiões precoces e tardias são imediatamente seguidas de sequências poli-A^{1, 2, 4-6}.

Diferente de outros vírus, somente uma das fitas do DNA viral apresenta ORFs, de forma que a transcrição

ocorre apenas num sentido, isto é, da esquerda para a direita quando se toma como referência o mapa linear convencional ou sentido horário no mapa circular. Acerca dos promotores, o genoma viral pode apresentar até quatro deles (P1, P2, P3, P4), sendo que todos os genótipos de HPV apresentam pelo menos dois promotores principais: P1 (ou P97), localizado imediatamente a montante do gene E6; e o P2 (ou P670), localizado dentro do gene E7 (Figura 1)¹.

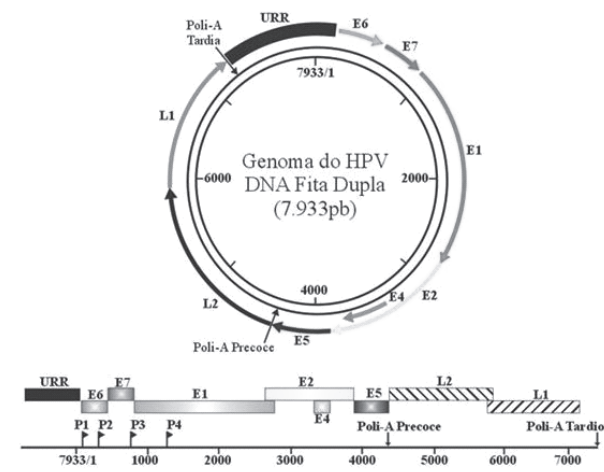


Figura 1. Representação esquemática do genoma do Papilomavírus Humano

O genoma viral é dividido em três regiões: uma região não codificante denominada URR; e duas codificantes, conhecidas como região precoce e região tardia. Os ORFs da região precoce são apresentados através de setas ou barras, enquanto os da região tardia através de setas cinza ou preta e barras listradas. Os quatro promotores (P1, P2, P3 e P4) e os dois sítios de poliadenilação (Poli-A) também estão indicados. Adaptado de Chow, Broker e Steinberg¹; Burk, Chen e Van Doorslaer²; Hebner e Laimins⁷

Os PVs exibem um tropismo específico por células epiteliais escamosas, os queratinócitos; porém, como somente as células basais são capazes de se dividir, os vírus precisam invadi-las para promoverem uma infecção perdurável. O acesso a tais células é viabilizado por lesões ou microlacerações do epitélio. Quanto à infecção, sabe-se que as partículas virais se ligam à superfície da célula hospedeira e induzem a internalização em vacúolos citoplasmáticos, seguido da liberação das mesmas no citoplasma, onde, provavelmente, as proteínas que constituem o capsídeo são degradadas e, subsequentemente, o genoma viral é conduzido ao núcleo, permanecendo na forma epissomal, isto é, não integrado ao genoma hospedeiro^{1, 2, 5}.

De fato, o ciclo viral demonstra uma completa dependência do estado de diferenciação da célula epitelial hospedeira, de modo que se pode considerar que a infecção pelos HPVs pode ser dividida em duas fases: precoce e tardia². A fase precoce ocorre enquanto o vírus permanece em células basais, nas quais a replicação viral ocorre em baixo nível, em geral, acompanhando a

divisão celular, sendo regulada por fatores do hospedeiro e por proteínas precoces virais. Não obstante, conforme as células-filhas oriundas da divisão de células basais e parabasal vão progredindo para camadas mais superiores do epitélio, estas param de se dividir, diferenciam-se e produzem queratinas de elevado peso molecular. Esses eventos tornam as condições desfavoráveis à manutenção dos HPVs, levando-os a impedir a saída fisiológica do ciclo celular que ocorre nessas células diferenciadas, através da ação de proteínas virais, principalmente da E6 e E7, para permitir a replicação vegetativa do genoma viral e transcrição dos genes estruturais L1 e L2, fenômenos típicos da fase tardia. Ademais, é nas camadas mais superiores do epitélio que o DNA viral é empacotado em capsídeos e a progênie viral é então liberada⁷.

Em geral, o contato direto é a principal forma de transmissão, incluindo o contato sexual e autoinoculação. Em todos os casos, a ocorrência de microlacerções no epitélio é imprescindível para que os vírus alcancem a camada basal². No presente artigo, foi realizada uma revisão dos trabalhos existentes na literatura científica mundial com enfoque no papel das proteínas virais do HPV na carcinogênese. O trabalho se inicia com uma descrição da biologia do referido agente e segue com uma atualização sobre os novos efeitos atribuídos às proteínas precoces virais, bem como um aprofundamento daqueles já conhecidos, que contribuem para a transformação neoplásica.

MÉTODO

Os artigos utilizados para a realização da presente revisão de literatura foram selecionados no portal eletrônico Pubmed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>). Todos os artigos foram obtidos na íntegra no referido portal ou, quando não disponível, foram obtidos no portal de periódicos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (<http://www.periodicos.capes.gov.br/>), abrangendo trabalhos publicados entre os anos de 1987 e 2010. Os descritores utilizados na busca incluíram: *Human Papillomavirus*, *HPV*, *viral proteins*, *E5*, *E6* e *E7*. Seguem os critérios de inclusão da revisão: 1) abordar mecanismos carcinogênicos do HPV; 2) demonstrar evidências do papel tumorigênico de alguma(s) das oncoproteínas do HPV; 3) estar escrito em língua inglesa, espanhola ou portuguesa. Critérios de exclusão: 1) não abordar os mecanismos do HPV na carcinogênese; 2) não envolver proteínas precoces virais. A busca inicial resultou no recrutamento de 42 artigos. Após perscrutar seus resumos, 12 artigos foram excluídos, pois as informações que são julgadas mais relevantes para serem apontadas nesta revisão podiam ser obtidas de artigos mais atuais e, por vezes, com achados complementares. Para a introdução do artigo, também foram incluídos: um

capítulo de livro e dois artigos consagrados para contribuir na descrição geral dos HPVs.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

INFECÇÃO PELO HPV

Baseado no potencial de indução de transformação maligna, os vários genótipos de HPV são classificados como de “baixo risco” ou “alto risco” para o desenvolvimento de neoplasia maligna. Os mecanismos que levam um HPV de alto risco a induzir a progressão neoplásica de lesões benignas estão relacionados, principalmente, à capacidade desses genótipos de integrarem seu genoma ao do hospedeiro (integração viral), resultando na ruptura de um segmento do DNA viral que contém o gene E2, o qual, entre outras funções, controla a expressão dos genes E6 e E7, resultando na superexpressão destes. A consequência dessa sucessão de eventos abrange uma excessiva e desregulada proliferação celular com comprometimento de mecanismos de reparo de DNA, que favorecem o acúmulo de mutações e o surgimento de aberrações cromossômicas, bem como bloqueio da apoptose⁵. Atualmente, 15 genótipos de HPV são considerados de alto risco para o desenvolvimento de carcinoma cervical, a saber: HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82; além destes, três outros são considerados prováveis tipos de alto risco, HPV-26, 53 e 66⁶.

PAPEL DAS PROTEÍNAS PRECOSES DO HPV

a) Proteína E5

É uma proteína pequena de localização membranar, constituída por 83 aminoácidos, encontrada predominantemente em retículo endoplasmático onde interage com uma próton-ATPase vacuolar bloqueando a acidificação de endossomos precoces, que resulta na alteração do tráfico, *turnover* e transdução de sinais do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e receptores tirosino quinases relacionados, portanto, participando da regulação do crescimento celular⁸. Tem sido proposto que a E5 pode se ligar diretamente ao EGFR potencializando a sinalização induzida por esse receptor incluindo a atividade da proteína-quinase ativada por mitógeno (MAPK)⁹. Apesar das propriedades conhecidas, o papel dessa proteína precoce no ciclo de vida dos HPVs ainda não está claro. Ademais, a E5 não é expressa em cânceres HPV-positivos, devendo contribuir apenas para as etapas iniciais da carcinogênese¹.

b) Proteína E6

A E6 do HPV-16 é uma proteína básica constituída de 151 aminoácidos que possui duas regiões do tipo *zinc finger*. Em cada uma das regiões mencionadas, são observados dois motivos, contendo duas cisteínas (C-X-X-C), capazes de interagir com zinco. Esses motivos são conservados em todos os tipos de HPV⁶. A E6 pode

ser encontrada tanto no núcleo como no citoplasma de queratinócitos infectados⁷. As proteínas dos genótipos de alto e de baixo risco nem sempre compartilham propriedades similares, possivelmente, devido a diferenças nas sequências de seus genes¹⁰.

A propriedade mais conhecida da E6 de HPVs de alto risco é a de se ligar a um componente da família E3 de ubiquitina ligase, denominado E6-AP (do inglês, *E6-associated protein ligase*) e induzir a formação de um complexo trimérico com a proteína p53, promovendo a degradação proteolítica desta última através da via da ubiquitina, com redução dos níveis de p53 na célula e impedimento de suas atividades regulatórias sobre o ciclo celular. Para o agente infeccioso, esse efeito pode aliviar as restrições na síntese de DNA, permitindo sua replicação⁷. Vale notar que a indução da degradação de p53 parece ser uma propriedade exclusiva da E6 de genótipos de alto risco. Não obstante, a anulação de p53 através desse mecanismo deve ter um papel capital na carcinogênese semelhante a outras neoplasias malignas, cujo gene *TP53* mostra-se frequentemente mutado⁶. Evidências demonstram que a E6 pode reprimir a transcrição induzida por p53, através da inibição da acetilação de p53 e de histonas mediadas pelo coativador p300, esse efeito foi observado tanto em genótipos de baixo risco (HPV-11) como de alto risco (HPV-16 e 18)¹¹. De modo correlato, Patel et al.¹² constataram que a E6 do HPV-16 liga-se e inibe a habilidade transcricional intrínseca dos coativadores CBP e p300.

A E6 do HPV-16 apresenta um motivo formado por quatro aminoácidos (148-ETQL-151), localizado na extremidade carboxi-terminal, que também é capaz de se ligar e induzir a degradação de uma série de proteínas celulares que contenham os domínios PDZ (PSD-95/Discs large/ZO-1), incluindo os membros da família MAGUK, tais como: hDlg, hScribble, MUPP I, MAGI e proteínas como TIP-2/GIPC, cujas funções incluem transdução de sinais, contato célula a célula via junções *tight* e regulação da polaridade celular¹³. É provável que essa propriedade da E6 possa também contribuir para a carcinogênese considerando que, para algumas das proteínas PDZ, como hDlg, MUPP I, MAGI, já foram constatadas funções de supressor tumoral⁷. A MAGI-1 também está relacionada com a regulação da sinalização de β -catenina¹⁰. Ademais, a região carboxi-terminal de ligação ao domínio PDZ de proteínas celulares não é encontrada em E6 de genótipos de baixo risco⁶.

A E6 também tem sido relacionada com a indução da degradação de E6TP1, Bak e Myc¹⁴. Entretanto, já foi demonstrado elevado nível de expressão de Myc na presença de E6¹⁵. No que se refere ao efeito antiapoptótico, a E6 do HPV-16 também é capaz de induzir a expressão dos inibidores da apoptose como c-IAP2 e survivin através de uma via que envolve o NF- κ B, além de interagir com

o TNFR-1, FADD e a caspase-8 inibindo a sinalização apoptótica envolvida⁶. Também já foi reportada resistência à apoptose em células de câncer de laringe associadas a uma baixa expressão de Bak acompanhada de elevada expressão de Bcl-2¹⁶.

Além disso, foi reportado que a E6 de HPV de alto risco pode estender o comprimento dos telômeros em células epiteliais pela ativação da subunidade catalítica do complexo telomerase (hTERT). A E6 de HPV-16 promove a degradação do repressor transcricional NFX1-91, através da associação com o E6-AP, resultando na ativação transcricional do *hTERT*¹⁰. Não obstante, a E6 pode se ligar diretamente ao promotor do gene *hTERT* e recrutar c-Myc aumentando a eficiência deste último em ativar a transcrição¹⁷. A ativação da telomerase é um passo fundamental para o desenvolvimento de qualquer câncer, permitindo a proliferação indefinida e evasão da senescência celular, assim esses achados sugerem que o HPV utilize vários mecanismos simultaneamente para assegurar a ativação da telomerase⁷.

A proteína E6 de HPV-16 contribui ainda para alterar a diferenciação de queratinócitos através da intervenção na via de sinalização Notch. Sabe-se que o gene *Notch1* é alvo da p53, assim a degradação de p53 mediada por E6 pode regular negativamente a expressão do referido componente da via Notch¹⁸. Também pode controlar a sinalização da proteína G pela degradação de proteínas GAP e inibir a degradação da família Src de quinases¹⁴.

Embora experimentos revelem que a expressão de E7 de HPV-16 em linhagens de células epiteliais de roedores seja suficiente para transformá-las, a imortalização eficiente de fibroblastos e queratinócitos primários humanos requer a combinação das proteínas E6 e E7, denotando a importância da E6².

c) Proteína E7

A E7 do HPV-16 é uma proteína ácida, relativamente pequena, de 98 aminoácidos, que apresenta três regiões conservadas conhecidas como: CR1, situada na porção N-terminal; CR2, que contém um motivo LXCXE; e CR3, que contém um domínio do tipo *zinc finger* com dois motivos CXXC na porção C-terminal⁶. A CR2 possui ainda um sítio de fosforilação para a caseína quinase II (CKII), constituído de dois resíduos de serina (31-SS-32), que, apesar de a real função não estar esclarecida, a inativação da CKII e, portanto, da fosforilação da proteína viral, em linhagens infectadas pelo HPV, tem resultado no impedimento do crescimento celular⁷.

Talvez a função mais relevante da E7 dos HPVs de alto risco é sua habilidade de se ligar e promover a degradação via proteossomo de membros da família Rb, tais como: proteína pRb (proteína do retinoblastoma), p107 e p130⁴. Esse efeito resulta na liberação de fatores E2F, que transativam diversos genes relacionados com a transição da fase G1/S do ciclo celular, suprimindo o

controle exercido, sobretudo, pela pRb hipofosforilada nessa etapa do ciclo¹⁷. Notavelmente, o motivo LXCXE é necessário para a ligação da E7 à pRb; no entanto, os resíduos essenciais para a degradação da pRb estão localizados na região N-terminal¹⁹.

Em mais um exemplo acerca das diferenças entre os genótipos de baixo e de alto riscos, as proteínas E7 dos genótipos 6 e 11 (baixo risco) demonstram um potencial dez vezes menor de se combinar com a pRb, quando comparadas às proteínas de HPV-16 e -18. Esse efeito é atribuído a uma diferença na sequência das proteínas; enquanto a E7 do HPV-16 apresenta um resíduo de ácido aspártico, a proteína do HPV-6 possui uma glicina na posição correspondente⁶. Mas, apesar de alguns genótipos de baixo risco, como o HPV-1 (cutâneo) e HPV-32 (de mucosa), exibirem elevada eficiência de ligação da E7 à pRb, a habilidade de induzir degradação da pRb, via ubiquitina, é aparentemente exclusiva dos HPVs de alto risco¹⁹.

A E7 também se liga à histona deacetilase classe I (uma enzima que age como correpressor transcricional ao remodelar a cromatina), com consequente aumento dos níveis de transcrição induzidos pelo fator E2F2 em células em diferenciação, influenciando novamente, de uma forma alternativa, a ação de fatores E2F²⁰. Ademais, já foi demonstrado que a E7 liga-se diretamente ao E2F1 potencializando sua atividade transcricional²¹. Possivelmente, os efeitos descritos convergem para favorecer a passagem para a fase S do ciclo celular.

Além da interação com a pRb, a E7 pode se ligar à p107 e à p130, também conhecidas como proteínas *pocket*. Em geral, ambas as proteínas podem se associar ao E2F4 e histona deacetilases, enquanto a p130 associa-se ainda ao E2F5, todavia, agindo como correpressores da expressão gênica, ao contrário dos fatores E2F1-3. Nesse caso, a interação da E7 com as proteínas *pocket* bloqueia seus efeitos repressores favorecendo a progressão do ciclo celular, já que a p130 está envolvida na regulação da transição da fase G0/G1 e a p107 com a transição G1/S e com a fase G2⁶.

Igualmente, a E7 liga-se a alguns complexos de quinases dependentes de ciclinas (CDK) e a alguns inibidores de CDK (CDKI). Entre os complexos de CDKs estão ciclina A/CDK2 e ciclina E/CDK2; neste último, a E7 interage indiretamente através da p107. Entretanto, nessas interações, a E7 parece potencializar os efeitos dos complexos citados, mesmo porque essa proteína precoce também pode aumentar os níveis de ciclinas A e E em células epiteliais⁷. Por outro lado, a ligação da E7 com os CDKIs, como o p21^{WAF1/CIP1} e p27^{KIP1}, bloqueia os efeitos desses supressores tumorais. Sabe-se que o p27^{KIP1} está envolvido com a retenção do crescimento celular em queratinócitos através do TGF- β , enquanto o p21^{WAF1/CIP1}, que é normalmente expresso durante a diferenciação desse tipo celular, está

envolvido na inibição de quinases dependente de ciclinas, assim como na replicação de DNA dependente de PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*)^{22,23}. Destarte, é razoável pressupor que a inativação dos supressores tumorais supracitados contribua na adequação do ambiente celular para permitir a replicação de DNA viral em células diferenciadas.

Em experimentos realizados com fibroblastos primários de roedores, foi observado que a E7 induz transformação em cooperação com o oncogene *ras*²⁴. A E7 demonstra um envolvimento importante na instabilidade genômica, numa via aparentemente independente da inativação de pRb, mas com significativo impacto na progressão neoplásica. Já foram demonstradas alterações do número de centrômeros em células neoplásicas expressando E7, bem como tetrassomia em culturas *raft* organotípicas estratificadas derivadas de células que expressavam E7^{25,26}.

A maioria dos autores concordam que os efeitos da E6 e E7 sobre os dois principais supressores tumorais p53 e pRb, respectivamente, entre outras proteínas hospedeiras, respondem por grande parte do potencial oncogênico dos genótipos de alto risco de HPV, sendo funcionalmente equivalentes a mutações dos referidos genes celulares, que são comumente observadas em diversos tumores¹⁰. Além disso, esse sinergismo parece ser determinante, pois a expressão de E7 na ausência de E6 resulta num aumento do nível de p53, provavelmente, decorrente da ativação do p19^{ARF} induzido pelo E2F1 que, por sua vez, interfere na atividade do MDM2, culminando no aumento do nível de p53. De forma que a E6 mostra-se indispensável para evitar os estímulos de parada do ciclo celular ou apoptótico advindos da p53³. De toda forma, a E7 de HPVs de alto risco parece contribuir na condução de vias de sobrevivência celular pelo aumento da fosforilação por Akt²⁷.

ESCAPE DA RESPOSTA IMUNE MEDIADA PELO HPV

Quando se tratam de neoplasias relacionadas ao HPV, pode-se dizer que o sistema imune tem importância especial na prevenção, pois é responsável tanto por reconhecer e eliminar células atípicas como também o agente infeccioso, que é um carcinógeno. No entanto, essa é uma tarefa difícil considerando que o HPV apresenta algumas características em seu ciclo de vida que permitem o escape da vigilância imunológica pela redução da exposição, incluindo o ciclo de replicação não lítico, baixa expressão proteica em células de indivíduos imunocompetentes e a liberação apical de partículas virais. Além de tudo, as proteínas precoces virais, especialmente a E6 e E7, exercem determinados efeitos que modulam a resposta imune do hospedeiro⁶. Esses efeitos colaboram para a ocorrência de outra característica desses vírus, a infecção persistente, que é essencial para os efeitos progressivos de transformação neoplásica, induzidos pelos HPVs de alto risco. Por outro lado, a atividade viral é

Tabela 1. Sumário dos principais efeitos das proteínas precoces do HPV

Proteínas precoces	Principais efeitos
E1	-Forma hexâmeros que atuam como helicases ATP-dependente ¹
E2	-Recruta a DNA polimerase α /primase hospedeira ¹ -Controla a replicação viral ²⁸ -Regula a transcrição dos genes virais, entre eles o E6 e E7 ²⁸
E1 ^ E4	-Relacionada ao colapso da rede de citoqueratinas, sugerindo uma participação na liberação viral ¹
E5	-Liga-se a uma próton-ATPase vacuolar bloqueando a acidificação de endossomos precoces, que resulta na alteração do tráfego, <i>turnover</i> e transdução de sinais do EGFR e receptores tirosino quinases relacionados ⁸ -Liga-se diretamente ao EGFR potencializando a sinalização induzida por esse receptor ⁹
E6	-Induz a degradação de p53 via proteossomos ⁷ -A degradação de p53 pode regular negativamente a expressão do componente Notch1, podendo alterar a diferenciação de queratinócitos ¹⁸ -Pode reprimir a transcrição induzida por p53, através da inibição da acetilação de p53 e de histonas, mediada pelo coativador p300 ¹¹ -Induz degradação de E6TP1, Bak e Myc ¹⁴ -A E6 de HPV de alto risco pode estender o comprimento dos telômeros pela ativação da subunidade catalítica do complexo telomerase (hTERT) ¹⁰ -Liga-se diretamente ao promotor do gene hTERT e recruta c-Myc aumentando a eficiência deste último em ativar a transcrição ¹⁷ Efeitos observados com o HPV-16: -Liga-se e inibe a habilidade transcricional intrínseca dos coativadores CBP e p300 ¹² -Liga-se e induz a degradação de uma série de proteínas celulares que contenham os domínios PDZ ¹³ -Induz a expressão dos inibidores da apoptose como c-IAP2 e survivin ⁶
E7	-Genótipos de alto risco induzem degradação de proteínas da família pRb, tais como: pRb, p107 e p130 ⁴ -A degradação de pRb resulta na liberação de fatores E2F, que transativam diversos genes relacionados com a transição da fase G1/S do ciclo celular ^{1, 7} -A degradação de p107 e p130 cessa seus efeitos repressores, favorecendo a progressão do ciclo celular ⁶ -Liga-se à histona deacetilase classe I, com consequente aumento dos níveis de transcrição induzidos pelo fator E2F ²⁰ -Liga-se diretamente ao fator E2F1 potencializando sua atividade transcricional ²¹ -Liga-se aos complexos ciclina A/CDK2 e ciclina E/CDK2 potencializando seus efeitos ⁷ -Liga-se e bloqueia os efeitos dos supressores tumorais p21 ^{WAF1/CIP1} e p27 ^{KIP1} ^{22, 23} -E7 de HPV de alto risco parece contribuir na condução de vias de sobrevivência celular pelo aumento da fosforilação por Akt ²⁷

distintamente aumentada em pacientes com desordens imunossupressoras, reafirmando a importância da imunidade no controle da infecção¹.

Acerca dos efeitos das proteínas do HPV sobre a resposta imune, foi verificado que as proteínas E6 e E7 de HPV-16 inibem, por um mecanismo ainda não esclarecido, a expressão de TLR9, um membro da

família de receptores do tipo *toll* - TLR, envolvido no reconhecimento de sequências específicas de DNA de fita dupla de vírus e bactérias²⁹. Já foi demonstrado que a proteína E6 de genótipo de alto risco é capaz de se combinar com o IRF-3 (*Interferon Regulatory Factor-3*), bloqueando seus efeitos de ativação transcricional, que inclui a regulação positiva do promotor do IFN- β que,

por sua vez, é ativado em resposta a infecções virais³⁰. A E6 de HPVs de alto risco interage com Tyk2 e impede a ativação da via Jak-STAT mediada pelo IFN- α ³¹.

A E6 pode reduzir os níveis de E-caderina na superfície de queratinócitos e como essa glicoproteína celular também auxilia na adesão entre queratinócitos e células apresentadoras de antígenos, a apresentação antigênica é comprometida favorecendo a permanência do vírus na epiderme³². Nesse contexto, a E7 é capaz de reduzir a expressão de TAP1 (*transporter associated with antigen protein 1*), um componente importante na via de processamento de antígeno, interferindo significativamente na atividade citotóxica linfocitária dependente de apresentação de antígeno por MHC-I³³.

Ademais, em lesões cancerígenas cervicais, o HPV parece regular negativamente a expressão da citocina pró-inflamatória TNF- α , ao passo que estimula a expressão de interleucina-10 (IL-10) que desempenha um papel contrário à primeira, isto é, anti-inflamatório, concorrendo para coibir a resposta imune local⁶.

CONCLUSÃO

É notória a relevância das proteínas precoces dos HPVs na carcinogênese, em especial da E6 e E7, cujas evidências provêm de inúmeros estudos, realizados *in vitro* e *in vivo*, demonstrando efeitos que vão desde a inativação de supressores tumorais, potencialização da atividade de quinases dependente de ciclina, participação na transdução de sinais entre a membrana citoplasmática e o genoma, regulação da expressão de fatores envolvidos na apoptose e no destino celular, ativação da telomerase e de oncogenes, estímulo à expressão de citocinas anti-inflamatórias em detrimento das de efeito pró-inflamatório, até a redução da expressão de moléculas de adesão intercelular, culminando no favorecimento da proliferação celular descontrolada, imortalização, regulação da diferenciação celular, suscetibilidade à metástase e escape da vigilância imunológica. Provavelmente, a combinação desses efeitos concorrem para o desenvolvimento e progressão tumoral. Os estudos indicam também que a E5 desempenha um papel importante nesse processo; porém, aparentemente limitado à fase pré-neoplásica. Ademais, nota-se que as proteínas dos genótipos de alto risco demonstram potencial superior, ou exclusivo, para efeitos que contribuem para a transformação maligna, quando comparadas às dos vírus de baixo risco.

A compreensão dos mecanismos moleculares relacionados às proteínas do HPV pode orientar na busca de marcadores tumorais confiáveis, permitindo caracterizar melhor os casos, somando, aos tradicionais estadiamentos clínico e patológico, novas informações relativas à agressividade e ao prognóstico tumoral. Seguindo o mesmo raciocínio, pode possibilitar a identificação

de novos alvos terapêuticos ou o aperfeiçoamento da terapêutica já aplicada.

CONTRIBUIÇÕES

Marcos Antonio Pereira de Lima trabalhou na concepção do estudo; na obtenção, análise e interpretação dos dados; na redação e revisão crítica. Cláudio Gleidiston Lima da Silva trabalhou na redação e revisão crítica; Silvia Helena Barem Rabenhorst trabalhou no planejamento e concepção do estudo, bem como na redação e revisão crítica do manuscrito.

Declaração de Conflito de Interesses: Nada a Declarar.

REFERÊNCIAS

1. Chow LT, Broker TR, Steinberg BM. The natural history of human papillomavirus infections of the mucosal epithelia. *APMIS*. 2010; 118 (6-7):422-49.
2. Howley PM, Lowy DR. Papillomaviruses and their replication. In: KNIPE DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, et al. *Fields virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins; 2001. 3280p.
3. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324(1):17-27.
4. Burk RD, Chen Z, Doorslaer K. Human papillomaviruses: genetic basis of carcinogenicity. *Public Health Genomics*. 2009; 12(5-6):281-90. Epub 2009 Aug 11.
5. García-Tamayo J, Molina J, Blasco-Olaetxea E. El virus del papiloma humano y el cáncer cervical. Una revisión de la historia actualizada sobre la investigación del cáncer del cuello uterino en Venezuela. *Invest Clin*. 2010; 51(2):193-208.
6. Ghittoni R, Accardi R, Hasan U, Gheit T, Sylla B, Tommasino M. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human Papillomaviruses. *Virus Genes*. 2010; 40(1):1-13. Epub 2009 Oct 17.
7. Hebner CM, Laimins LA. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Rev Med Virol*. 2006; 16(2):83-97.
8. Kivi N, Greco D, Auvinen P, Auvinen E. Genes involved in cell adhesion, cell motility and mitogenic signaling are altered due to HPV 16 E5 protein expression. *Oncogene* 2008; 27(18):2532-41. Epub 2007 Nov 5.
9. Crusius K, Auvinen E, Steuer B, Gaissert H, Alonso A. The human papillomavirus type 16 E5-protein modulates ligand-dependent activation of the EGF receptor family in the human epithelial cell line HaCaT. *Exp Cell Res*. 1998; 241(1):76-83.
10. Pim D, Banks L. Interaction of viral oncoproteins with cellular target molecules: infection with high-risk vs

- low-risk human papillomaviruses. *APMIS*. 2010; 118(6-7):471-93.
11. Thomas MC, Chiang CM. E6 oncoprotein represses p53-dependent gene activation via inhibition of protein acetylation independently of inducing p53 degradation. *Mol Cell*. 2005; 17(2):251-64.
 12. Patel D, Huang SM, Baglia LA, McCance. The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300. *EMBO J*. 1999; 18(18): 5061-72.
 13. Thomas M, Narayan N, Pim D, Tomaic V, Massimi P, Nagasaka K, et al. Human papillomaviruses, cervical cancer and cell polarity. *Oncogene*. 2008; 27(55):7018-30.
 14. Mantovani F, Banks L. The Human Papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* 2001; 20(54):7874-87.
 15. McMurray HR, McCance DJ. Human papillomavirus type 16 E6 activates TERT gene transcription through induction of c-Myc and release of USF-mediated repression. *J Virol*. 2003; 77(18):9852-61.
 16. Du J, Chen GG, Vlantis AC, Chan PK, Tsang RK, van Hasselt CA. Resistance to apoptosis of HPV 16- infected laryngeal cancer cells is associated with decreased Bak and increased Bcl-2 expression. *Cancer Lett*. 2004; 205(1):81-8.
 17. 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 USA*. 2003; 100(14):8211-6. Epub 2003 Jun 23.
 18. Yugawa T, Handa K, Narisawa-Saito M, Ohno S, Fujita M, Kiyono T. Regulation of Notch1 gene expression by p53 in epithelial cells. *Mol Cell Biol* 2007; 27(10):3732-42. Epub 2007 Mar 12.
 19. Gonzalez SL, Stremlau M, He X, Basile JR, Münger K. Degradation of the retinoblastoma tumor suppressor by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is important for functional inactivation and is separable from proteasomal degradation of E7. *J Virol*. 2001; 75(16):7583-91.
 20. Longworth MS, Laimins LA. The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc finger-like motifs of the E7 protein are essential for the life cycle of human papillomavirus type 31. *J Virol*. 2004; 78:3533-41.
 21. Hwang SG, Lee D, Kim J, Seo T, Choe J. Human papillomavirus type 16 E7 binds to E2F1 and activates E2F1-driven transcription in a retinoblastoma protein-independent manner. *J Biol Chem*. 2002; 277(4):2923-30. Epub 2001 Nov 16.
 22. Zerfass-Thome K, Zwerschke W, Mannhardt B, Tindler R, Boltz JW, Jansen-Dürr P. Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene*. 1996; 13(11):2323-30.
 23. 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 the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev*. 1997; 11(16):2090-100.
 24. Matlashewski G, Schneider J, Banks L, Jones N, Murray A, Crawford L. Human papillomavirus type 16 DNA cooperates with activated ras in transforming primary cells. *EMBO J*. 1987; 6(6):1741-6.
 25. Duensing S, Duensing A, Flores ER, Do A, Lambert PF, Münger K. Centrosome abnormalities and genomic instability by episomal expression of human papillomavirus type 16 in raft cultures of human keratinocytes. *J Virol*. 2001; 75(16):7712-16.
 26. Southern SA, Noya F, Meyers C, Broker TR, Chow LT, Herrington CS. Tetrasomy is induced by human papillomavirus type 18 E7 gene expression in keratinocyte raft cultures. *Cancer Res*. 2001; 61(12):4858-63.
 27. Pim D, Massimi P, Dilworth SM, Banks L. Activation of the protein B pathway by the HPV-16 E7 oncoprotein occurs through a mechanism involving interaction with PP2A. *Oncogene* 1995; 24(53):7830-8.
 28. Steger G, Corbach S. Dose-dependent regulation of the early promoter of human papillomavirus type 18 by the viral E2 protein. *J Virol*. 1997; 71(1):50-58.
 29. Hasan UA, Bates E, Takeshita F, Biliato A, Accardi R, Bouvard V, et al. TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. *J Immunol*. 2007; 178(5):3186-97.
 30. 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*. 1998; 12(13):2061-72.
 31. Li S, Labrecque S, Gauzzi MC, Cuddihy AR, Wong AHT, Pellegrini S, et al. The human papilloma virus (HPV)-18 E6 oncoprotein physically interacts with Tyk2 and impairs Jak-STAT activation by interferon- α . *Oncogene*. 1999; 18(42):5727-37.
 32. Caberg JH, Hubert PM, Begon DY, Herfs MF, Roncarati PJ, Boniver JJ, et al. Silencing of E7 oncoprotein restores functional E-cadherin expression in human papillomavirus 16-transformed keratinocytes. *Carcinogenesis*. 2008; 29(7):1441-7. Epub 2008 Jun 19.
 33. Vambutas A, DeVoti J, Pinn W, Steinberg BM, Bonagura VR. Interaction of human papillomavirus type 11 E7 protein with TAP-1 results in the reduction of ATP-dependent peptide transport. *Clin Immunol*. 2001; 101(1):94-9.

Abstract

Introduction: The Human Papillomavirus (HPV) is an epitheliotropic agent which has more than 100 genotypes. Among these, some are considered high-risk due to the potential to induce the onset of malignant lesions, such as cervical carcinoma whose percentage of association with the HPV is around 90%. In the infected cells, two viral proteins play important role in tumorigenesis. **Objective:** A review of papers found in the worldwide scientific literature focusing on the role of HPV viral proteins in carcinogenesis. **Method:** The articles used in the present review were selected and obtained in full from the electronic portals “Pubmed” and “Portal de periódicos da Capes”. The key-words used in the search included: Human Papillomavirus, HPV, viral proteins, E5, E6 and E7. **Results:** The E6 and E7 viral proteins are widely known for promoting degradation of the p53 and pRb cellular proteins, respectively, effect which accounts for the much of the oncogenic potential of the high-risk genotype of HPV, being functionally equivalent to mutations of the mentioned cellular genes, which are commonly observed in several tumors. However, new studies have demonstrated that these proteins are also involved in many other tumor pathways, denoting again their relevance in this process. In addition, some studies have pointed the E5 as an adjuvant in carcinogenesis. **Conclusion:** The diverse effects related to early proteins culminate in the promotion of uncontrolled cell proliferation, immortalization, regulation of the cell differentiation, susceptibility to metastasis and escape from the immune surveillance.

Key words: Humans; Papillomavirus Infections; Papillomaviridae-classification; Carcinogens; Oncogene Proteins, Viral

Resumen

Introducción: El Virus del Papiloma Humano (VPH) es un agente epiteliotrópico que tiene más de 100 genotipos. Entre ellos, algunos están considerados de alto riesgo debido al potencial para inducir al desarrollo de lesiones malignas, tales como el carcinoma de cuello uterino, cuyo porcentaje de asociación con el mencionado virus representa casi el 90%. En las células infectadas, dos proteínas virales desarrollan un papel importante en la tumorigenesis. **Objetivo:** Realizar una revisión de los estudios existentes en la literatura científica internacional centrándose en el papel de las proteínas virales del VPH en la carcinogénesis. **Método:** Los artículos utilizados para la realización de esta revisión fueron seleccionados y conseguidos en su versión completa en los portales electrónicos: Pubmed y Periódicos Capes. Las palabras claves utilizadas en la búsqueda fueron: Virus del Papiloma Humano, VPH, las proteínas virales, E5, E6 y E7. **Resultados:** Proteínas virales E6 y E7 son ampliamente conocidas porque promueven la degradación de las proteínas celulares p53 y pRb, respectivamente, efecto que es responsable por la mayor parte del potencial oncogénico de los genotipos de alto riesgo de PVH, los cuales son funcionalmente equivalentes a las mutaciones de estos genes celulares, que se observan comúnmente en muchos tumores. Sin embargo, otros estudios han demostrado que estas proteínas virales también están implicadas en otras vías tumorales, lo que demuestra una vez más su importancia en este proceso. Por otra parte, algunos estudios señalan a la proteína E5 como un adyuvante en la carcinogénesis. **Conclusión:** Los distintos efectos observados de las proteínas tempranas virales culminan en favor de la proliferación incontrolada de células, la inmortalización, la regulación de la diferenciación celular, la susceptibilidad a la metástasis y el escape de la vigilancia inmunológica.

Palabras clave: Humanos; Infecciones por Papillomavirus; Papillomaviridae-classificación; Carcinógenos; Proteínas Oncogénicas Virales