

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS

**DETECÇÃO DE HPV DNA EM AMOSTRAS DE
SANGUE, TECIDO PERIANAL E GÁSTRICO POR
PAPILLOCHECK TEST E BIOANALYZER 2100**

AURELINO CÂNDIDO DA SILVA

Recife
2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS

**DETECÇÃO DE HPV DNA EM AMOSTRAS DE
SANGUE, TECIDO PERIANAL E GÁSTRICO POR
PAPILLOCHECK TEST E BIOANALYZER 2100**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em
Ciências Biológicas da Universidade Federal de
Pernambuco, como parte dos requisitos para
obtenção do grau de Doutor em Ciências
Biológicas.

AURELINO CÂNDIDO DA SILVA

Orientador:

PROF. DR. JOSÉ LUIZ DE LIMA FILHO

Co-orientadora:

PROF^A. DRA. DANYELLY BRUNESKA

Silva, Aurelino Cândido da

Detecção de HPV DNA em amostras de sangue, tecido perianal e gástrico por PapilloCheck Test e BioAnalyzer 2100/ Aurelino Cândido da Silva. – Recife: O Autor, 2010.

123 folhas. il., fig., tab.

Orientador: José Luiz de Lima Filho

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Ciências Biológicas, 2010.

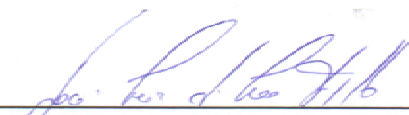
Inclui bibliografia e anexos.

1. Papilomavírus Humano 2. Virose- genética 3. Cancer I. Título.

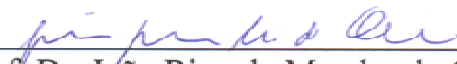
**DETECÇÃO DE HPV DNA EM AMOSTRAS DE
SANGUE, TECIDO PERIANAL E GÁSTRICO POR
PAPILLOCHECK TEST E BIOANALYZER 2100**

AURELINO CÂNDIDO DA SILVA

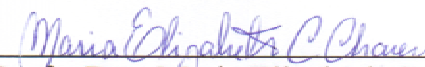
BANCA EXAMINADORA



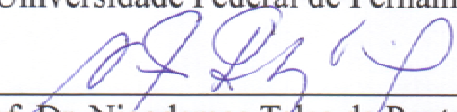
Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho
Universidade Federal de Pernambuco



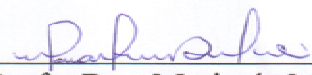
Prof. Dr. João Ricardo Mendes de Oliveira
Universidade Federal de Pernambuco



Profa. Dra. Maria Elizabeth Cavalcante Chaves
Universidade Federal de Pernambuco



Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho
Universidade Federal de Pernambuco



Profa. Dra. Maria de Macena Diniz Maia
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dedicatória

*Aos meus pais, aos pais dos meus pais e a todos aqueles que
antes deles vieram e cujos espíritos zelam por sua
descendência e
Aos meus filhos, razão para que meu espírito zele por um
mundo melhor.*

Agradecimentos

À minha esposa e companheira, Ângela Patrícia, quem me ajudou a acreditar sempre.

Aos colegas de doutorado pela amizade e incentivo.

Aos funcionários do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, pela presteza e simpatia.

Aos funcionários do Setor de Anatomia Patológica, em especial ao residente Marcelo e a funcionária Alcione, pela ajuda na coleta das amostras e a Dra Ana Lúcia Antoninho pela ajuda na seleção dos casos.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, em especial aos meus preceptores Dr. José Luiz Lima Filho e Dra. Danyelly Bruneska pelo exemplo de dedicação à pesquisa.

As infecções causadas por papilomavírus humanos (HPV) destacam-se por sua elevada frequência, implicações clínicas e interpessoais, além de serem identificadas como fatores relacionados à oncogenese. A infecção pelo HPV é considerada uma doença sexualmente transmissível relatada entre 10% a 20% da população adulta mundial. O HPV DNA está prevalente em 2% a 68% dos adultos. O HPV é considerado o agente etiológico essencial no desenvolvimento de neoplasias de colo uterino, que é a segunda causa mais importante de mortes em mulheres. A infecção pelo HPV tem sido correlacionada também com o câncer de anus, em 85% dos casos (Palesfsky, 1998), 35% a 50% dos casos de cânceres de vulva, vagina e pênis e em 10% dos casos de neoplasias de laringe, trato respiratório e digestivo (zur Hausen, 2009). O câncer gástrico é uma das principais causas de óbitos em todo mundo. Sua heterogeneidade o transforma em modelo para estudos em carcinogênese. A identificação de papilomavírus humano em neoplasias gástricas e esofágicas sugere a possibilidade de seu envolvimento na oncogênese destas neoplasias.

Normalmente, amostras oriundas de biópsias diagnósticas e exérese cirúrgicas são incluídas em parafina para posterior estudo histopatológico. Estas amostras podem servir de fonte para identificação genômica, através de técnicas adequadas.

A presente Tese buscou o desenvolvimento de uma nova técnica de identificação de genes a partir de materiais biológicos conservados em parafina. Foram utilizadas amostras provenientes de pacientes portadores de adenocarcinoma gástrico e carcinoma epidermóide perianal. Os fragmentos do gene da proteína viral L1 foram amplificados através de PCR com o primer GP5+/6+ e o primer MY09/11, identificados com o uso dos equipamentos Bioanalyzer e Papillocheck. A técnica desenvolvida demonstrou-se eficiente na identificação do gene da proteína viral L1, em amostras fixadas em parafina.

Palavras chave: HPV, HPV-DNA, papilomavírus, câncer gástrico, câncer perianal, carcinoma epidermóide, Papillocheck teste, Bioanalyzer, primer GP5+/6+, primer MY09/11

Infections caused by human papillomavirus (HPV) are noted for their high frequency, interpersonal and clinical implications, and they are identified as factors related to oncogenesis. Infection by HPV is considered a sexually transmitted disease reported between 10% to 20% of adults worldwide. HPV DNA is prevalent in 2% to 68% of adults. HPV is considered the key etiologic agent in the development of cancers of the cervix, which is the second leading cause of deaths in women. HPV infection has also been correlated with cancer of the anus in 85% of cases (Palesfsky, 1998), 35% to 50% of cases of cancers of the vulva, vagina and penis and in 10% of cases of cancers of the larynx , respiratory and digestive tract (zur Hausen, 2009). Gastric cancer is a major cause of deaths worldwide. Their heterogeneity makes him a model for studies in carcinogenesis. The identification of human papillomavirus in esophageal and gastric cancer suggests the possibility of their involvement in oncogenesis of these neoplasms.

Typically, samples from diagnostic biopsies and surgical excisions are included in paraffin for subsequent histopathological study. These samples can serve as a source for genomic identification through appropriate techniques.

This thesis sought to develop a new technique for identifying genes from biological samples preserved in paraffin. Samples were obtained from patients with gastric adenocarcinoma and perianal squamous cell carcinoma. The fragments of the viral protein L1 gene were amplified by PCR using primer GP5 + / 6 + primer MY09/11 and identified with the use of equipments Papillocheck and Bioanalyzer. The technique was efficient in the identification of the viral protein L1 gene in samples fixed in paraffin.

Keywords: HPV, HPV-DNA, papillomavirus, gastric cancer, perianal cancer, squamous cell carcinoma, Papillocheck test, Bioanalyzer, primer GP5 + / 6 +, primer MY09/1.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	
AGRADECIMENTOS	
ABREVIACÕES	7
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	12
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO	13
1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVOS GERAIS	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 HISTÓRICO	19
3.1.1 Neoplasias de origem viral	19
3.1.2 Papilomatoses	22
3.1.3 As papilomatoses como precursoras das lesões neoplásicas do colo uterino	24
3.1.4 Carcinomas anogenitais	24
3.1.5 Carcinomas orofaríngeais	25
3.1.6 Carcinomas dérmicos	26
3.1.7 Outros carcinomas	26
3.2 BIOLOGIA DO PAPILOMA VIRUS HUMANO	27

3.2.1 Estrutura do capsídeo	27
3.2.2 Interação com receptores celulares	29
3.2.3 Estrutura do DNA viral	30
3.2.4 Replicação	32
3.2.5 Estrutura e atividade biológica da proteína viral E6	34
3.2.6 Estrutura e atividade biológica da proteína viral E7	39
3.2.7 Regulação transcricional	39
3.2.8 Inativação dos supressores tumorais p53 e pRB	42
3.2.9 Interações com o sistema imune	43
3.2.10 Classificação	44
3.2.11 Potencial de Oncogênese	45
3.2.12 Cofatores na Patogênese	46
3.2.13 Transformação oncogênica da primoinfecção ao carcinoma invasivo	46
3.2.14 Transmissão	48
3.2.15 Formas Clínicas	48
4 Referências	52
Anexo A – Relatos Científicos Submetidos à Publicação	65
Papilomavírus Humano: Aspectos Históricos – Revisão Bibliográfica	66
Papilomavírus Humano – Atualização de sua Biologia	77
Detecção de HPV DNA em Amostras de Sangue, Tecido Perianal e Gástrico por PapilloCheck Test e Agilent BioAnalyzer 2100	103
Anexo B	118

ABREVIACÕES

ADP – Adenosina difosfato

AIF - fator de indução de apoptose

BPV-1 - papilomavírus bovino tipo 1

cdks - quinases dependentes da ciclina

Cys – cisteína

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DST – Doença sexualmente transmissível

E1, E2, E4, E5, E6, E7 – proteína precoce 1, 2, 4, 5, 6, 7

ECM - elementos da matriz extracelular

FDA – Food and Drug Administration

HPV - papilomavírus humano

HSPG - proteoglicanos de heparan sulfato

kDa – KiloDálton

L1 – proteína tardia 1

L2 – proteína tardia 2

LCR - long control region

LN5 - laminina 5

MME - elementos de manutenção minicromossomal

NCR - non-coding region

nm – nanômetros

OMS - Organização Mundial de Saúde

ORFs - Open Reading Frames

p53 – gen inibidor tumoral proteína 53

PCR – Reação em cadeia da polimerase

pRB – gen inibidor tumoral do retinoblastoma

PV – Papilomavírus

RNA – Ácido Ribonucleico

TFN - fator de necrose tumoral

VLP – Virus-like proteins

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – modelo em computação gráfica do capsídeo do Vírus HPV (Galloway, 2003).	27
Figura 2 - Pentâmero icosaédrico formado por cinco unidades de proteínas L1 e uma unidade de proteína L2 (em vermelho), representação em computação gráfica das moléculas (Chen 2000).	23
Figura 3 – Estrutura do HPV L1. (A) Estrutura do monômero, (B) Capsômero com interação pentamérica (Chen et al., 2000). (C) Detalhe do braço C-terminal promovendo a adesão interpentamérica (Modis et al., 2002).	28
Figura 4 – Modelo dos eventos envolvidos na internalização do papilomavírus 16: (1) ligação do papilomavírus (PV) peptidoglicanos de heparan sulfato tipo 1 (HSPG1) e laminina-5 (LN5) possibilitando sua adesão à superfície celular. (2) Transferência dos capsídeos para um receptor secundário (HSPG2) presente na superfície celular. A Ciclofilina B (CyPB) presente na superfície celular facilita as modificações conformacionais. (3) Estes eventos promovem alterações conformacionais que diminuem a interação do PV com o HSPG ou promovem a exposição de regiões que permitem a interação com um receptor internalizante não-HSPG, que dispara a endocitose. Estes eventos podem ser bloqueados por inibidores da laminina e da cicloforina B (Day, 2009).	30
Figura 5 – Regiões do DNA viral e seus genes codificados.	31
Figura 6 – Modelo pseudodimérico da proteína E6. (A) modelo com os segmentos N-terminal e C-terminal com os segmentos hidrofóbicos demonstrados. (B) modelo com os segmentos hidrofóbicos interagindo. (C) Demonstração linear dos segmentos hidrofóbicos. (D) Mapa do modelo com os segmentos não previstos no	35

modelo. **(E)** Demonstração dos resíduos conservados em todas as proteínas E6 (Normine et al., 2006).

Figura 7 – Proteínas que interagem com a E6, alterando diversas vias metabólicas (Howie, 2009). **36**

Figura 8 – Vias intrínseca e extrínseca da apoptose. (Howie et al., 2009). **37**

Figura 9 - HPV E7 e os processos celulares afetados. Regiões de afinidade CR1 (verde) e CR2 (vermelho), sítio de ligação na proteína pRB (LXCXE), sítio de fosforilação da caseína quinase II (CKII). Os resíduos de cisteína envolvidos na ponte de zinco está indicado em amarelo (Ohlenschlager et al., 2006). **38**

Figura 10 – Modelo computacional da proteína HPV-E7 (Ohlenschlager et al., 2006). **39**

Figura 11 – Representação esquemática da integração do genoma HPV-18. (A) Replicação ativa das proteínas E6 e E7 pela promoção da região LCR. (B) Presença da proteína E2 provocando a inibição das proteínas E6 e E7 e seus efeitos sobre os fatores de supressão tumoral p53 e pRb (Thierry, 2009). **41**

Figura 12 – Representação da região regulatória do no genoma integrado do HPV-18. As quatro regiões de ligação da proteína E2 estão representadas. Regiões regulatórias AP1 participam como promotores. A região regulatória HMGI/Y é específica do HPV-18. GRE, YY1 e NF1 também estão demonstrados (Thierry, 2009). **41**

Figura 13 – Vias de ativação do p53: Fatores de estresse transmitem sinais para as moléculas regulatórias do p53. MDM-2 é uma ligase ubiquitina-p53. A MDM-X exerce efeito regulatório negativo. Por estímulos do fator de transcrição E2F ocorre a transcrição do ARF, regulando negativamente a ubiquitinação do p53. Estes mecanismos ativados pela p53 resultam em senescência ou apoptose **43**

(Levine, 2009).

- Figura 13** – Árvore filogenética dos 118 tipos de HPV. Baseado no sequenciamento da região ORF L1 (De villiers, 2004). 45
- Figura 14** – Integração do DNA viral episomal com o DNA cromossômico da célula hospedeira, apenas parte do gene E2 foi integrado, a proteína E2 deixa de ser expressa. 48
- Figura 15** – lesões verrucóides dérmicas. 49
- Figura 16** – lesões verrucóides anogenitais. 49
- Figura 17** - lesões verrucóides anogenitais. 50
- Figura 18** – condilomas na glândula peniana com eritema local. 50
- Figura 19** – Lesões condilomatóides na região vulvar. 50
- Figura 20** – colo uterino – epitélio acetobranco à colposcopia. 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descobertas históricas envolvendo tumor-virus DNA	21
Tabela 2 – Genes codificados no HPV-DNA	32

CAPÍTULO I INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As infecções causadas por papilomavírus humanos (HPV) destacam-se por sua elevada frequência, implicações clínicas e interpessoais, além de serem identificadas como fatores ambientais comprovadamente relacionados à oncogenese.

A infecção pelo HPV é considerada uma doença sexualmente transmissível pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e sua prevalência é relatada entre 2% e 68% da população adulta, de acordo com o grupo estudado. Estima-se que a maioria das pessoas sexualmente ativas entrará em contato com o papilomavírus em algum momento de sua vida, estudos indicam que 10 a 20% da população adulta mundial apresenta infecção pelo HPV. Estas infecções podem apresentar-se como quiescentes na maioria dos casos, ou como lesões dérmicas verrucosas, geralmente pequenas. Em alguns casos podem apresentar-se com lesões gigantes (tumor de Bursk-Levenstein), ou evoluir para neoplasias epidermóides (zur Hausen, 2009).

Atualmente consideram-se as infecções por HPV como agente etiológico essencial no desenvolvimento de neoplasias de colo uterino. O câncer cervical é a segunda causa mais importante de mortes em mulheres, depois do câncer de mama. Cerca de 500.000 novos casos são anualmente diagnosticados em mulheres entre 25 a mais de 40 anos, no mundo. O HPV DNA foi identificado na grande maioria dos casos de colo uterino (Walboomers et al., 1999), pacientes com infecções prolongadas possuem maior probabilidade de desenvolver neoplasias (Muñoz et al., 2003). Mais de 40 subtipos de HPV foram identificados como oncogênicos para a espécie humana, sendo classificados de acordo com a probabilidade de causar neoplasia em baixo, médio e alto risco (Kjaer et al., 2001).

A infecção pelo HPV tem sido correlacionada também com o câncer de anus, estima-se que aproximadamente 85% dos casos de câncer de anus estejam correlacionados com infecção pelo HPV (Palesfsky, 1998), da mesma forma, cerca de 35% a 50% dos casos de cânceres de vulva, vagina e pênis tem sido atribuídos a infecção pelo HPV, assim como 20% dos casos de câncer de orofaringe e 10% dos casos de neoplasias de laringe, trato respiratório e digestivo (zur Hausen, 2009).

Os mecanismos genéticos envolvidos na iniciação e progressão do câncer não são completamente conhecidos. Os processos relativos às alterações que podem ocorrer na cromatina durante a transformação celular e na eventual interação com agentes ambientais também apresentam aspectos obscuros. Para elucidação destes mecanismos, o uso de

modelos experimentais favorece abordagens múltiplas, sendo mais atraentes aqueles que possibilitem contribuições para controle de enfermidades associadas.

O câncer gástrico é uma das principais causas de óbitos em todo mundo. Sua heterogeneidade o transforma em modelo interessante para estudos em carcinogênese. Co-fatores podem influenciar nessa evolução de quadro, como por exemplo, o consumo de álcool, tabagismo, entre outros. A descrição da identificação de papilomavírus humano em neoplasias gástricas e esofágicas sugere a possibilidade de seu envolvimento na oncogênese destas neoplasias, contudo estes achados são de incidência variável e inconstante, levando à necessidade de estudos mais aprofundados. Em nosso meio, a carência de informações sobre os tipos de HPV envolvidos mesmo nas neoplasias anogenitais não nos permite conclusões sobre a oncogenese relacionada aos tipos de HPV.

Normalmente, amostras oriundas de biópsias diagnósticas e exéreses cirúrgicas terapêuticas são fixadas em formalina e inclusas em parafina para posterior estudo histopatológico. Estas amostras estocadas nos departamentos de anatomopatologia podem servir de fonte para identificação genômica do papilomavírus humano em diversas neoplasias.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

- Extrair o DNA de materiais parafinizados, de amostras fixadas em formalina, sangue congelado e sangue fresco.
- Promover a amplificação dos fragmentos gênicos de interesse
- Identificar em quais amostras ocorre a expressão dos genes estudados
- Correlacionar os achados de identificação gênica com os achados clínicos

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair o DNA de materiais parafinizados obtidos no Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, utilizando amostras de mucosa gástrica e região perianal, com patologias neoplásicas e benignas. Extrair o DNA contido em amostras fixadas em formalina, obtidas a partir de exérese cirúrgica de pacientes portadores de patologia condilomatosa. Extrair DNA a partir de sangue congelado de pacientes portadores de adenocarcinoma gástrico e sangue fresco de um voluntário sadio.
- Promover a amplificação dos fragmentos gênicos através de técnicas de PCR do gene da proteína viral L1, nas amostras selecionadas, após extração de DNA.
- Identificar em quais amostras ocorre a expressão dos genes L1 da proteína viral, permitindo a identificação da presença do HPV DNA.

Correlacionar os achados de identificação gênica do gene da proteína L1, com identificação da presença do HPV DNA com os achados clínicos e relacioná-los à possível participação do papilomavírus nestas alterações patológicas.

Capítulo II Revisão Bibliográfica

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Há aproximadamente 35 anos foi postulada a participação do papilomavírus humano (HPV) no câncer cervical. Atualmente, o papel desta família heterogênea de vírus na carcinogênese está bem estabelecida, não apenas no carcinoma cervical, como também em uma substancial quantidade dos outros cânceres anogenitais e digestivos. Além disto, tipos específicos de HPV têm sido relacionados com determinadas neoplasias cutâneas. Em mulheres, a nível mundial, as infecções por HPV estão presentes em mais de 50% das neoplasias ligadas às infecções, em homens, isto ocorre em apenas 5% dos casos (zur Hausen, 2009).

Os papilomavírus compõem um grupo de pequenos vírus de DNA que pertence à família *Papillomaviridae*, dos gêneros *Alpha*, *Beta* e *Gama-papillomavirus*. Estes vírus são epiteliotróficos e infectam homens e animais, causando uma grande variedade de lesões proliferativas. Os papillomavirus são espécies específicas e não existem relatos de que um tipo de papillomavirus cause infecção em mais de uma espécie. Até o momento, cerca de 200 tipos de HPV foram descritos, sendo que em torno de 100 tipos foram isolados e tiveram suas sequências genômicas completamente identificadas (zur Hausen, 2009). A infecção pelo HPV é a doença sexualmente transmissível (DST) mais prevalente no mundo, nos Estados Unidos, estima-se que 20 milhões de pessoas estejam infectadas, com uma incidência de novos casos de 6,2 milhões a cada ano.

3.1 HISTÓRICO

3.1.1 Neoplasias de origem viral

As primeiras evidências sobre a possibilidade de transmissão de lesões neoplásicas foram descritas por Ellerman em 1908, descrevendo a transmissão de leucemia aviária. Em 1911, Rous descreveu a transmissibilidade do sarcoma aviário. Entretanto, estas observações não receberam a devida atenção pelo meio científico, devido a ausência de comprovação dos fatores etiológicos. Somente após a identificação e demonstração experimental da transmissão de tumores murinos de origem viral nos anos 50, foi dado o devido valor para aquelas observações há tempos descritas, tendo valido o reconhecimento pelo Premio Nobel de 1966 ao pesquisador Peyton Rous, aproximadamente 50 anos após suas descobertas.

A partir dos anos 30, começaram a ser demonstrados tumores transmissíveis em mamíferos. Shope descreveu a transmissão de tumores fibromatosos em coelhos através da injeção de extratos livres de células, atualmente reconhecidos como devido à presença de vírus pox. Em alguns casos, estas lesões papilomatosas evoluíram para carcinomas de células escamosas em coelhos infectados (Rous & Beard, 1934; Shope & Hurst, 1933). Posteriormente, com a identificação e descrição experimental da transmissibilidade da leucemia murínica e dos vírus polyoma em camundongos foi reconhecida a real participação dos vírus na transmissão de algumas neoplasias, nascendo assim o campo de estudos da Oncologia Viral (zur Hausen, 2009).

Estes achados permitiram o desenho e a elaboração de estudos controlados de transmissão viral de neoplasias. Atualmente, é reconhecido que entre 15 a 20% das neoplasias humanas podem ser diretamente associadas à presença de determinados vírus. Destacam-se por sua maior incidência entre as neoplasias virais causadoras de neoplasias os vírus de DNA. Podem ser reconhecidos por suas características genéticas dois grupos: o dos pequenos tumor-virus-DNA, que incluem os polyomavirus, os adenovirus e os papilomavirus, e um segundo grupo com outros virus DNA, que incluem os herpesvírus (vírus Epstein–Barr e o Herpesvírus do Sarcoma Kaposi) e o hepadnavírus (Hepatite B vírus) (Howley, 2009). Ver tabela 1.

Tabela 1 - Descobertas históricas envolvendo tumor-virus DNA

Ano	Descoberta	Referência
1933	Identificação dos primeiros tumores virais em mamíferos	Shope & Hurst, 1933
1953	Descobrimto dos polyomavirus murinicos	Gross, 1953 Stewart, 1953
1960	Descobrimto do SV40	Sweet & Hilleman, 1960
1965	Adição oncogênica	Fried, 1965
1973	Primeiro mapa de restrição viral	Danna et al., 1973
1977	splicing de RNA	Berget et al., 1977 Chow et al., 1977
1978	primeiro sequenciamento de um virus animal (SV40)	Fiers et al., 1978 Reddy et al., 1978
1979	Descrição do primeiro vetor viral em mamíferos	Hamer & Leder, 1979 Mulligan et al., 1979
1979	Descobrimto do p53	Lane & Crawford, 1979
1979	Identificação dos fatores de replicação viral	Linzer & Levine, 1979
1981	Identificação do sinal de poliadenilação	Challberg & Kelly, 1979
1981	Descrição dos promotores transcripcionais	Fitzgerald & Shenk, 1981
1983	Identificação do Src como alvo do PyMT	Banerji et al., 1981 Benoist & Chambon, 1981
1983	Descobrimto de tipos específicos de HPV no câncer cervical	Courtmeide & Smith, 1983 Boshart et al., 1984
1983	Identificação do fator transcripcional SP1	Durst et al., 1983
1983	Identificação da modulação do Sistema de Histocompatibilidade Classe I	Dynan and Tjian, 1983
1983	Descrição da cooperação oncogênica Ad E1A e E1B	Schrier et al., 1983
1984	Identificação das sequencias de tranposte nuclear	Van den Elsen et al., 1983
1986	Descoberta do E2F	Kalderon et al., 1984
1988	Descoberta dos oncogenes DNA inativadores dos genes de supressão tumoral Prb	Lanford & Butel, 1984 Kovesdi et al., 1986
1989	Desenvolvimento das partículas "Virus-like Proteins (VLP)"	DeCaprio et al., 1988 Whyte et al., 1988
1990	Identificação da fosfatase 2A como alvo dos antígenos T antipolymoma	Salunke et al., 1989
1993	Identificação da proteína E3 ubiquitina ligase E6AP	Pallas et al., 1990 Walter et al., 1990
2006	Aprovação pelo FDA para a vacina VLP preventiva para HPV	Scheffner et al., 1993
2008	Descobrimto das células Merkel dos polyomavirus	Koutsky et al., 2002 Feng et al., 2008

De fato, a maioria dos importantes desenvolvimentos na Biologia Molecular deriva diretamente dos estudos envolvendo a Oncologia Viral (Howley & Livingston, 2009), como por exemplo, a descoberta da transcriptase reversa durante o estudo de vírus RNA. Outra importante descoberta relacionada ao estudo dos vírus tumorais envolve a elucidação dos mecanismos de inibição dos genes supressores tumorais pRB e p53, inicialmente demonstradas por Lane e Crawford, e também por Linzer e Levine, que em 1979 demonstraram a coligação entre a proteína T do vírus SV40. Foi demonstrado também que a proteína de 55 kDa codificada pelo gene E1B do adenovírus (Sarnow et al., 1982) assim como as proteínas E6 do HPV comprometem a função do p53 (Werness et al., 1990). Estes mecanismos são considerados como elementos chave na atividade das oncoproteínas e na inibição dos genes supressores de crescimento tumoral.

Elementos que elucidam a transformação celular durante a oncogênese também foram originados em experimentos com vírus oncogênicos. A demonstração que certos elementos cooperam entre si na produção de um fenótipo transformado, como a interação entre as proteínas E1A e E1B (Van den Elsen et al., 1983) serviram como base para o entendimento da interação entre os oncogenes celulares *myc* e *ras* (Land et al., 1983). De mesma forma estudos com vírus permitiram o conhecimento dos mecanismos de modulação do complexo de histocompatibilidade por genes virais oncogênicos, informando que uma supressão do sistema imune do hospedeiro é necessária para que a gênese tumoral possa ocorrer (Schrier et al., 1983; Kovesdi et al., 1986).

O estudo dos mecanismos envolvidos com a interação entre as proteínas de vírus oncogênicos e o hospedeiro celular permitiram inclusive o entendimento dos eventos metabólicos durante a degradação proteica *in vivo* e a via da ubiquitina, derivando diretamente do estudo das proteínas do HPV. Estudos com a proteína E6 permitiram a descoberta do p53 como o primeiro substrato identificado do sistema de degradação dependente da ubiquitina (Scheffner et al., 1990) e a caracterização da E6AP como a primeira proteína-ligase para ubiquitina-E3 (Scheffner et al., 1993). Estudos subsequentes com adenovírus identificaram a proteólise mediada pela ubiquitina como um importante processo regulatório durante a oncogênese (Querido et al., 1997).

3.1.2 Papilomatoses

A documentação histórica sobre relatos relacionados às manifestações patológicas da infecção pelo HPV nos remete inicialmente ao período greco-romano. Desde então, já se relacionavam as lesões anogenitais a uma provável transmissão sexual.

Rigoni-Stern (1842), um médico italiano, relatou seus achados tanatoscópicos em relação às mortes ocorridas em mulheres na cidade de Verona, entre o período de 1760 a 1839. Ele observou atentamente que havia uma maior frequência de câncer cervical entre mulheres de vida sexualmente ativa, como senhoras casadas, prostitutas e concubinas, ao contrário das baixas incidências encontradas entre mulheres virgens, como religiosas e celibatárias. Isto o levou à conclusão que estas lesões eram de natureza sexualmente transmissível.

A primeira demonstração de transmissão de lesões condilomatosas resultante da inoculação de extratos livres de células foi feito por Ciuffo, na Itália em 1907, comprovando

claramente a transmissibilidade destas lesões e ainda demonstrando que ela ocorreria em material livre de células.

Alguns anos depois, foi descoberta a natureza infecciosa dos condilomas genitais e das papilomatoses laringeais. A microscopia eletrônica foi capaz de demonstrar a presença de partículas virais nestes extratos infectantes (Strauss et al., 1949). Apesar da demonstração mais antiga do potencial carcinogênico de lesões papilomatosas em animais (Rous & Beard, 1934; Rous & Kidd, 1938; Rous & Friedewald, 1944), foi inicialmente atribuída ao *Herpes simplex* tipo 2 o papel oncogênico em neoplasias de colo uterino (Rawls et al., 1968; Naib et al., 1969; Nahmias et al., 1970). Contudo, estudos mais aprofundados, em mais larga escala demonstraram-se incapazes de confirmar os achados iniciais da presença do herpes vírus nestas lesões (Vonka et al. 1984).

3.1.3 As papilomatoses como precursoras das lesões neoplásicas do colo uterino

No início da década de setenta foram iniciados experimentos com a intenção de avaliar a participação dos papilomavirus no surgimento de lesões tumorais. Estes estudos baseavam-se em relatos de transformação tumoral de condilomas anogenitais (*condylomata acuminata*) em carcinomas epidermóides (zur Hausen, 1977). Foi identificado um tipo até então ainda não descrito de HPV em condilomas genitais, o HPV 6 (Gissmann and zur Hausen, 1980; de Villiers et al., 1981), e um outro em papilomas laringeais, o HPV 11 (Gissmann et al., 1982). Meisels e Fortin (1976) encontraram transformações celulares displásticas em esfregaços colpocitológicos que denominaram de células coilocíticas, postulando que o surgimento destas células seria a etapa precursora para o surgimento de células neoplásicas. Esta teoria foi comprovada com a demonstração de partículas virais internalizadas nas células com colilocitose por Della Torre (1978) e Hills & Laverty (1979).

Foram também identificadas partículas virais em lesões condilomatosas gigantes, conhecidas como tumores de Buschke–Löwenstein (Zachow, 1982). Utilizando técnicas de hibridização com o DNA do HPV 11, Gissmann (1983) conseguiu isolar amostras deste DNA em algumas biópsias de carcinoma cervical. Posteriormente, também usando o HPV 11 DNA como sonda foi conseguido o isolamento de novos tipos de HPV, identificando o HPV 16 e o HPV 18, tanto em amostras obtidas de biópsias de cânceres cervicais, quanto em culturas de células com linhagens originadas em carcinomas epidermóides (Dürst et al., 1983; Boshart et al., 1984). Contemporaneamente, foi possível demonstrar a presença do HPV 16 em lesões pré-tumorais anorretais, conhecidas então como papulose Bowenóide (Ikenberg et al., 1983), e que graças a estes achados são atualmente consideradas como neoplasias intraepiteliais denominadas tumores de Bowen. Imediatamente após, foram também identificadas partículas tumorais de HPV 16 em carcinomas intraepiteliais de colo uterino (Crum et al. 1984).

3.1.4 Carcinomas anogenitais

Lesões verrucóides papilomatosas podem ocorrer na pele e mucosa da região anogenital, atingindo em maior frequência a vulva e a região perianal. Grande parte destas lesões podem persistir de forma crônica, e em sua maioria, foi demonstrada a presença de

HPV tipos 6 e 11 desde os anos oitenta (Gissmann et al., 1982; Zachow et al., 1982; Boshart and zur Hausen, 1986). Em período subsequente, foi possível a demonstração da presença de HPV 16 em lesões papilomatóides de Bowen, que na época eram consideradas lesões pré-cancerosas que ocorrem mais frequentemente em região perianal e vulvar (Ikenberg et al 1983). Mais recentemente, foi demonstrada a presença do HPV 16 entre 30 e 50% dos carcinomas epidermóides de pênis (Lont et al., 2006). De mesma forma, também foi comprovada a presença do HPV 16 em neoplasias epidermóides de vulva e vagina em 50% dos casos (Madsen et al., 2008). Apesar de apresentar uma baixa taxa de incidência anual, entre 0.1 e 2.1 por 100.000 habitantes, as neoplasias anogenitais tem uma importante relevância, considerando-se seus impactos clínicos em uma grande população. Comportamentos de risco, como promiscuidade e homossexualismo masculino podem aumentar probabilidade de se adquirir estas patologias (Daling et al., 1987).

3.1.5 Carcinomas orofaríngeais

A conversão maligna de lesões papilomatosas orofaríngeais em carcinomas têm sido descritas desde meados dos anos 40 do século 20, embora nestes tempos ainda não houvessem sido estabelecidas relações com infecções virais (zur Hausen 1977). Contudo, em 1983, surgiram relatos da identificação da presença de HPV em lesões hiperplásicas e condilomatóides orofaríngeais (Syrjänen, 1983). Estes achados permitiram concluir que poderia haver a participação do HPV no surgimento de lesões malignas nestas regiões. Os primeiros relatos da identificação de determinados tipos de HPV em carcinomas orofaríngeais surgiram logo posteriormente (Löning et al., 1985; de Villiers et al., 1985). Relatos que se seguiram confirmaram estes achados, com uma taxa de identificação variando entre 25 e 60% dos casos (Weinberger et al., 2006; Psyrrri & DiMaio, 2008; Gillison et al., 2008).

3.1.6 Carcinomas dérmicos

Os primeiros relatos científicos a correlacionar lesões verrucóides papilomatosas de pele e neoplasias remontam aos anos 20 do século passado. Nesta época, Lewandowsky e Lutz descreveram o surgimento de carcinomas de pele em pacientes portadores de epidermodisplasia verrucóide, a partir de lesões verrucóides papilomatosas expostas a uma grande incidência de radiações solares (Lewandowsky & Lutz, 1922). Aproximadamente 40 anos após, surgiram relatos da identificação de HPV em lesões papilomatosas benignas de pele (Ruiter & Van Mullem, 1970; Yabe et al., 1969). Relatos anteriores já haviam demonstrado o caráter infeccioso e transmissível das lesões papilomatosas verrucóides de pele por inoculação de extratos livres de células (Lutz, 1946; Jablonska & Millewski, 1957; Jablonska & Formas, 1959). Posteriormente, surgiram relatos científicos demonstrando a presença de HPV tipos 5, 8, 12, 14, 17 e 20 em carcinomas epidermóides de pele (Orth, 1986), em especial, naqueles surgidos a partir de lesões condilomatosas em pacientes portadores de epidermodisplasia verrucóide, cujo caráter hereditário foi comprovado em estudos genéticos que identificaram uma mutação com inativação dos genes *EVER1/TMC6* e *EVER2/TMC8* (Orth, 2008).

3.1.7 Outros carcinomas

Várias publicações durante este período de descobertas da participação das lesões inflamatórias papilomatosas causadas pelo vírus HPV no surgimento de lesões cervicais, anogenitais, orofaringeais e dérmicas, atribuíram a participação destes vírus na oncogênese de diversos outros cânceres. Neoplasias de esôfago, próstata, bexiga, pulmão, entre outros foram implicadas. Contudo, estudos mais aprofundados não conseguiram demonstrar uma presença persistente dos papilomavírus nestas lesões (zur Hausen, 2009). Entretanto, o recente relato do isolamento de um outro vírus pequeno de DNA, muito semelhante ao HPV, o polyoma vírus, no câncer de Merkel (Feng et al., 2008), e a observação que outras neoplasias aumentam em incidência em pacientes submetidos a prolongados períodos de imunossupressão, tal como ocorre em outras neoplasias de origem inflamatória (Vajdic et al., 2006), sugerem que a pesquisa de mecanismos oncogênicos de origem viral nestas e em outras neoplasias ainda podem permitir a elucidação de inúmeros fatos ainda não conhecidos,

“nos causando verdadeiras surpresas” (zur Hausen, 2008, discurso de agradecimento do Prêmio Nobel).

3.2 BIOLOGIA DO PAPILOMA VIRUS HUMANO

3.2.1 Estrutura do capsídeo

O HPV é formado por um genoma de DNA circular em fita dupla, com 7.200 a 8.000 pares de bases. Este material genético encontra-se envolto por um capsídeo protéico com um diâmetro de 50 nm, este capsídeo possui 72 subunidades icosaédricas denominadas de capsômeros, que são formados por duas diferentes proteínas, L1 e L2 (Baker et al, 1991). O capsídeo possui uma predominância de proteínas L1, em torno de 80% da proteína viral, elas são gênero-específicas e servem como medidor indireto da infectividade. A proteína L2 é tipo-específica, possuindo cerca de 70 kD, enquanto a L1 possui em torno de 55 kD (Chen, 2000; Sapp, 2009), Figura 1.

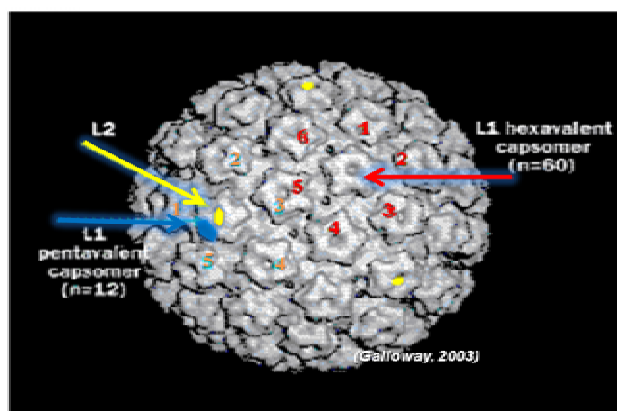


Figura 1 – modelo em computação gráfica do capsídeo do Vírus HPV (Galloway, 2003).

O pentâmero que forma a unidade repetitiva da estrutura supramolecular do capsídeo é formado por cinco unidades de proteína L1 e uma unidade de proteína L2.

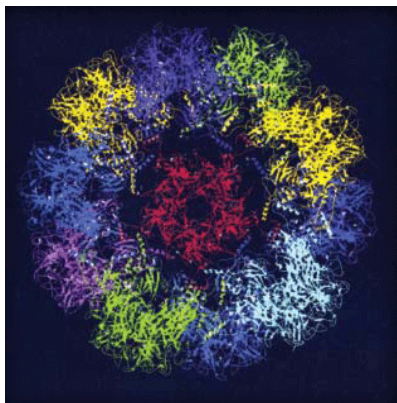


Figura 2 - Pentâmero icosaédrico formado por cinco unidades de proteínas L1 e uma unidade de proteína L2 (em vermelho), representação em computação gráfica das moléculas (Chen 2000).

As proteínas L1 possuem dobramentos funcionais (“braços”) com propriedades hidrofóbicas que permitem uma adesão firme tanto entre unidades formadoras do capsômero, como em capsômeros adjacentes. Estudos estruturais com cristalização e criomicroscopia eletrônica (Chen et al., 2000; Modis et al., 2002) sugerem que os “braços” C-terminais invadem as estruturas vizinhas e por interações hidrofóbicas garantem a adesão interpentamérica (figura 3).

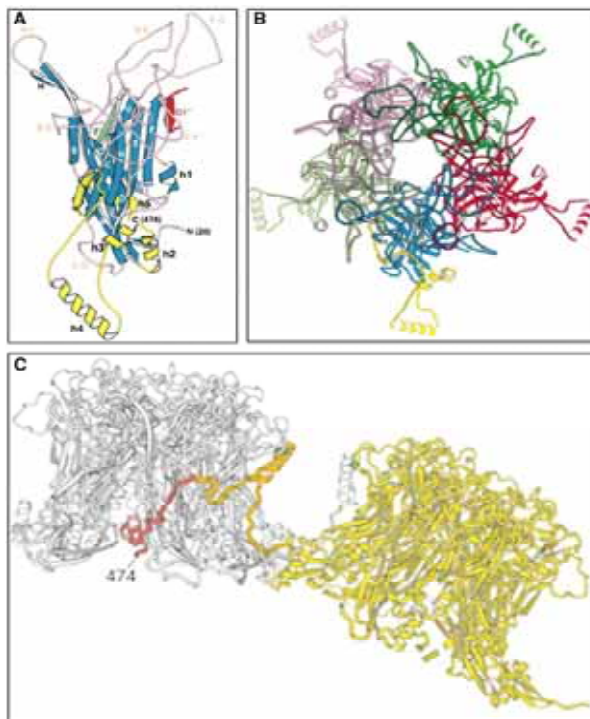


Figura 3 – Estrutura do HPV L1. (A) Estrutura do monômero, (B) Capsômero com interação pentamérica (Chen et al., 2000). (C) Detalhe do braço C-terminal promovendo a adesão interpentamérica (Modis et al., 2002).

Estudos estruturais e de espectrometria de massa demonstraram ainda que a formação de uma quarta hélice (h4) formadora do “braço” lateral permite a aproximação dos resíduos de cisteína cys-428 do pentâmero invasor com o resíduo cys-175 do pentâmero receptor, promovendo a formação de uma ponte de dissulfeto que estabiliza mais ainda a ultraestrutura do capsídeo viral (Modis et al., 2002). Baseando-se neste modelo, Carter (2003) demonstrou que a maioria dos anticorpos neutralizantes estão direcionados contra epitopos contidos nas alças C-terminais superficializadas.

As setenta e duas moléculas de proteína viral L2 que formam o capsídeo encontram-se centralizadas no capsômero pentaédrico, firmemente coesas graças a interações hidrofóbicas com as proteínas circundantes L1 (Buck et al., 2008). Estas propriedades estruturais promovem a internalização da maioria das alças protéicas, em especial do segmento N-terminal, tornando menos acessível à hidrólise e à ligação com anticorpos (Yang et al., 2003; Richards et al., 2006).

3.2.2 Interação com receptores celulares

Estudos estruturais demonstram que os capsídeos virais possuem a capacidade de interagir com receptores de membrana extremamente conservados evolutivamente e abundantes na superfície celular hospedeira. Esta adesão entre o capsídeo e a superfície celular ocorre primariamente graças à proteína L1 (Müller et al., 1995; Roden et al., 1994; Volpers et al., 1995). Posteriormente foi comprovado que esta adesão ocorre graças a uma grande afinidade entre a proteína L1 e os glicosaminoglicanos presentes nas proteínas dos receptores de superfície celular, esta afinidade se encontra especialmente relacionada à presença de heparan sulfato (Joyce et al., 1999).

De fato, a maioria dos receptores de superfície celular é formada por estruturas que contém proteoglicanos de heparan sulfato (HSPG), podemos citar como exemplo: receptores para fatores de crescimento, lipoproteínas, bactérias e vírus (Bernfield et al., 1999). As duas principais famílias de receptores de superfície celular são sindecans e glipicans (Bernfield et al., 1992; Fransson, 2003). Na realidade, já foi comprovado que a maioria dos receptores ligantes para proteínas de superfície de HPV's não são específicos. Os sindecans-1 são os receptores mais abundantes na superfície celular de células epiteliais, e podem servir de receptores indistintamente tanto para VLP de HPV-11 e HPV-16 (Bernfield et al., 1992; Elenius et al., 1991; Gallo et al., 1994).

Estudos *in vitro* demonstram que os papilomavírus (PV) podem se ligar a elementos da matriz extracelular (ECM), estes elementos secretados pelos queratinócitos mediam a ligação viral à superfície celular, proteínas como a laminina 5 (LN5), assim como peptidoglicanos de heparan sulfato normalmente participam destas interações (Culp et al., 2006a, 2006b; Selinka et al., 2007). Evidências recentes demonstram que a participação de um segundo receptor deve ser necessária para a internalização do PV.

Day et al (2008) demonstraram recentemente que o pré-tratamento de capsídeos com uma peptidase, a furina, pode promover a internalização celular destas partículas mesmo na ausência dos HSPGs. A figura seguinte demonstra um modelo de interações para a internalização do papilomavírus (Figura 4).

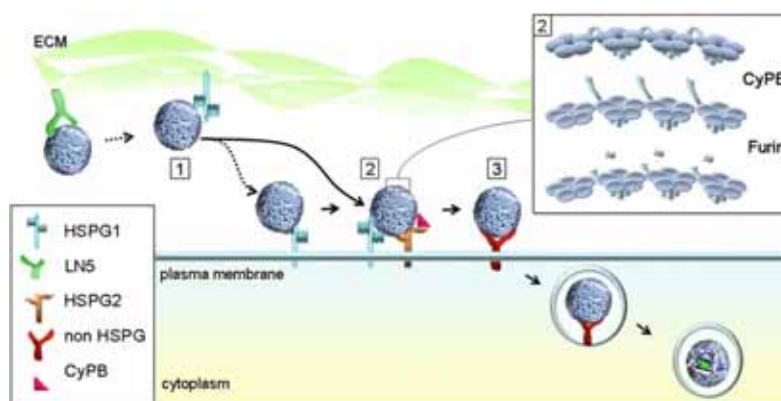


Figura 4 – Modelo dos eventos envolvidos na internalização do papilomavírus 16: (1) ligação do papilomavírus (PV) peptidoglicanos de heparan sulfato tipo 1 (HSPG1) e laminina-5 (LN5) possibilitando sua adesão à superfície celular. (2) Transferência dos capsídeos para um receptor secundário (HSPG2) presente na superfície celular. A Ciclofilina B (CyPB) presente na superfície celular facilita as modificações conformacionais. (3) Estes eventos promovem alterações conformacionais que diminuem a interação do PV com o HSPG ou promovem a exposição de regiões que permitem a interação com um receptor internalizante não-HSPG, que dispara a endocitose. Estes eventos podem ser bloqueados por inibidores da laminina e da cicloforina B (Day, 2009).

3.2.3 Estrutura do DNA viral

O genoma do HPV consiste em um DNA circular de dupla fita com 7.200 a 8.000 bases, possui três regiões que codificam as proteínas virais (Open Reading Frames, ou ORFs). Este genoma possui três fragmentos subgênicos, uma região precoce (*Early*) que possui 45% do genoma, uma região tardia (*Late*) com 40% do genoma e uma outra região que contém elementos regulatórios da transcrição e da replicação viral, esta região é denominada NCR (non-coding region) ou LCR (long control region) representando 15% de todo o genoma (Figura 5).

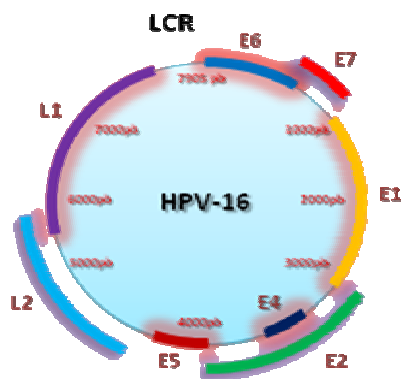


Figura 5 – regiões do DNA viral e seus genes codificados.

A região precoce possui seis genes, as proteínas que codificam possuem importantes funções na replicação (E1), na transcrição do DNA (E1 e E2) e na transformação celular (E5, E6 e E7) (zur Hausen, 2002) (ver tabela 2). A proteína E2 controla a transcrição de outros genes virais (E6 e E7), também possuindo atividade estimuladora da função supressora tumoral da proteína p53. A E2 também interage com a E1 facilitando sua ligação à origem da replicação. A proteína E4 possui funções ligadas à diferenciação dos queratinócitos, sendo os mecanismos ainda não totalmente elucidados. Alguns autores relatam que esta proteína é responsável pela coilocitose, uma alteração da arquitetura celular que promove uma alteração terminal dos queratinócitos promovendo o rompimento celular facilitando a liberação das partículas virais (Doorbar et al., 1986; Roberts et al., 1997). A proteína E5 liga-se ao receptor mitogênico, estimulando o crescimento epidérmico (Massimi et al. 1997). O gene E6 expressa uma proteína que tem a capacidade de degradar proteoliticamente a proteína supressora do crescimento tumoral p53, que resulta no descontrole do crescimento celular que pode permitir a immortalização dos queratinócitos (Storey, 1998). O gen E7 codifica a produção de uma fosfoproteína liga-se a um gene supressor de tumor pRB, esta ligação parece estar relacionada à indução da proliferação e immortalização celular, há indícios de que esta habilidade de ligação E7-pRB está relacionada ao grau de oncogênese do tipo viral (Thierry, 2009).

Os genes da região de replicação tardia codificam a síntese das proteínas formadoras do capsídeo viral, L1 e L2. Estas sequências são altamente preservadas entre todos os tipos de papilomavírus humanos (Bernard et al, 1994). O gene L1 é o responsável pela codificação da proteína L1, a mais abundante no capsídeo, e possui epítomos tipo-específicos altamente imunogênicos, o gene L2 por sua vez, é o responsável pela codificação da proteína L2,

também presente na estrutura do capsídeo, porém em menor número, como já descrito anteriormente. Estes genes tardios são expressos nas camadas superficiais do epitélio infectado.

Tabela 2 – genes codificados no HPV-DNA

Gene	tamanho	região	Proteína	Atividades protéicas
<i>L1</i>	7200 a 8000 pb	ORF - <i>Late</i>	L1	- Participa na formação da estrutura do capsídeo
<i>L2</i>	~ 5500 pb	ORF - <i>Late</i>	L2	- Participa na formação da estrutura do capsídeo
<i>E1</i>		ORF - <i>Early</i>	E1	- Fixação do DNA viral ao hospedeiro - Ativação da replicação do DNA viral - Ativação dos monômeros de ubiquitina
<i>E2</i>		ORF - <i>Early</i>	E2	- Fixação do DNA viral ao hospedeiro - Ativação da replicação do DNA viral - Estabilização do DNA viral durante a divisão celular - transferência dos substratos de ubiquitina para a E3-ligase E6AP - Estímulo da função supressora do p53 (controle negativo)
<i>E4</i>		ORF - <i>Early</i>	E4	- Transferência dos substratos de ubiquitina para a E3-ligase E6AP
<i>E5</i>		ORF - <i>Early</i>	E5	
<i>E6</i>	~ 450 pb	ORF - <i>Early</i>	E6	- inibição da das vias intrínseca extrínseca da apoptose
<i>E7</i>	~ 300 pb	ORF - <i>Early</i>	E7	- Inibição da atividade da pRB

3.2.4 Replicação

A replicação do papilomavírus humano ocorre exclusivamente em epitélio estratificado da pele ou em mucosas. Estes são tecidos complexos e constituídos de diversas linhagens celulares. A grande maioria das células epiteliais compõe-se de queratinócitos em diferentes estágios de maturação, correspondendo a cerca de 80% deste tecido. Outras linhagens celulares reunidas correspondem a 20% das células, e incluem melanócitos, células de Langerhans e de Merkel.

Entre os queratinócitos, dois tipos possuem a capacidade de divisão celular: células tronco de crescimento lento e células da camada basal. Estas células proliferativas são o alvo para o crescimento dos papilomavírus, onde estabelecem uma população celular infectada. Os papilomavírus desenvolveram mecanismos complexos que adaptam a célula hospedeira, promovendo a transcrição de seu próprio DNA, promovendo a síntese de proteínas virais, que

regulam o metabolismo celular de forma a promover uma maior produção protéica de seu interesse e regulando o ciclo celular impedindo sua degeneração e morte (apoptose), promovendo a sua “imortalização”.

O entendimento dos mecanismos envolvidos na replicação viral baseiam-se principalmente em modelos experimentais da replicação do papilomavírus bovino tipo 1 (BPV-1) em culturas celulares de fibroblastos de camundongos (linhagem C 127). Sabendo-se que os mecanismos de replicação viral são altamente conservados e podem ser perfeitamente extrapolados para o papilomavírus humano (Berg & Stenlund, 1997).

Logo após a internalização dos papilomavírus pela célula hospedeira, ocorre a entrada do seu DNA no núcleo celular, através dos transportadores próprios da célula hospedeira. Uma vez no núcleo celular, ocorre a ativação da região regulatória que inicia a transcrição das proteínas precoces, E1 e E2. Estas proteínas direcionam os fatores de replicação da célula hospedeira, desencadeando em cascata um aumento na síntese das proteínas virais precoces (Frattoni and Laimins, 1994).

Experimentos *in vitro*, demonstram que a proteína E1 é responsável pelo estiramento do DNA viral, assim como a abertura da dupla hélice durante o processo de replicação (Sedman & Stenlund, 1998). Porém, também foi demonstrado que a replicação viral necessita da ligação conjunta das proteínas E1 e E2 na origem de replicação viral (Stenlund, 2003; Kurg et al., 2006).

O recrutamento das proteínas de replicação hospedeiras ainda não está completamente esclarecido. Foi demonstrada a interação da proteína E1 com a proteína de replicação A, com a topoisomerase e com a polimerase α -primase (Clower et al., 2006). Também é conhecido que a fosforilação pelo complexo ciclina E/Cdk2 e ciclina A/Cdk2 é necessário para a localização nuclear da proteína E1. A proteína E8, cujo domínio de atividade compreende 12 aminoácidos no HPV-31, é necessária para a formação de um complexo com a proteína E2, cuja atividade regulatória negativa é necessária para estabilização replicacional a longo termo (Stubenrauch et al., 2000; Lace et al., 2008).

Outra importante atividade da proteína E2 é garantir a equilibrada divisão do DNA parental para as células hospedeiras filhas durante o processo de divisão celular. Esta função é realizada através da fixação de moléculas de E2 em diversos pontos de fixação, conhecidos como elementos de manutenção minicromossomal (MME). A fixação das proteínas E2 garante a estabilização do DNA recombinado, resultante da incorporação do DNA viral ao DNA da célula hospedeira, durante o processo de divisão celular (Piirso et al., 1996; You et al., 2004).

Nos epitélios sadios, a divisão celular, e consequentemente a replicação de DNA ocorre apenas nas células basais. Uma vez que estas células se despreendem da camada basal, a divisão celular e a replicação do DNA é interrompida, e as células vão envelhecendo conforme se distanciam da camada basal em estratos cada vez mais superficiais. Por outro lado, as células infectadas pelo HPV subvertem os mecanismos normalmente inibitórios das células hospedeiras, esta atividade é exercida pelas proteínas E6 e E7. Estas proteínas virais descontrolam os mecanismos inibidores das células hospedeiras nos pontos de controle regulados pelas famílias das ciclinas, das quinases dependentes da ciclina (cdks) e dos inibidores de quinases (Funk et al., 1997; Jones et al., 1997).

3.2.5 Estrutura e atividade biológica da proteína viral E6

Os genes que codificam as proteínas E6 estão presentes em todos os papilomavírus no início da ORF, logo após a região não-codificante (NCR). As proteínas E6 são compostas de aproximadamente 150 aminoácidos, contém duas alças $CX_2C-X_{29}-CX_2C$, unidas por um interdomínio de 36 aminoácidos. Estas alças são ladeadas por segmentos terminais amino (N) e carboxi (C) terminais de tamanhos variados (Cole & Danos, 1987). O modelo tridimensional da proteína E6 foi estudado através de cristalização e ressonância magnética nuclear (RMN), por Nomine (2006) e é apresentado na figura 6:

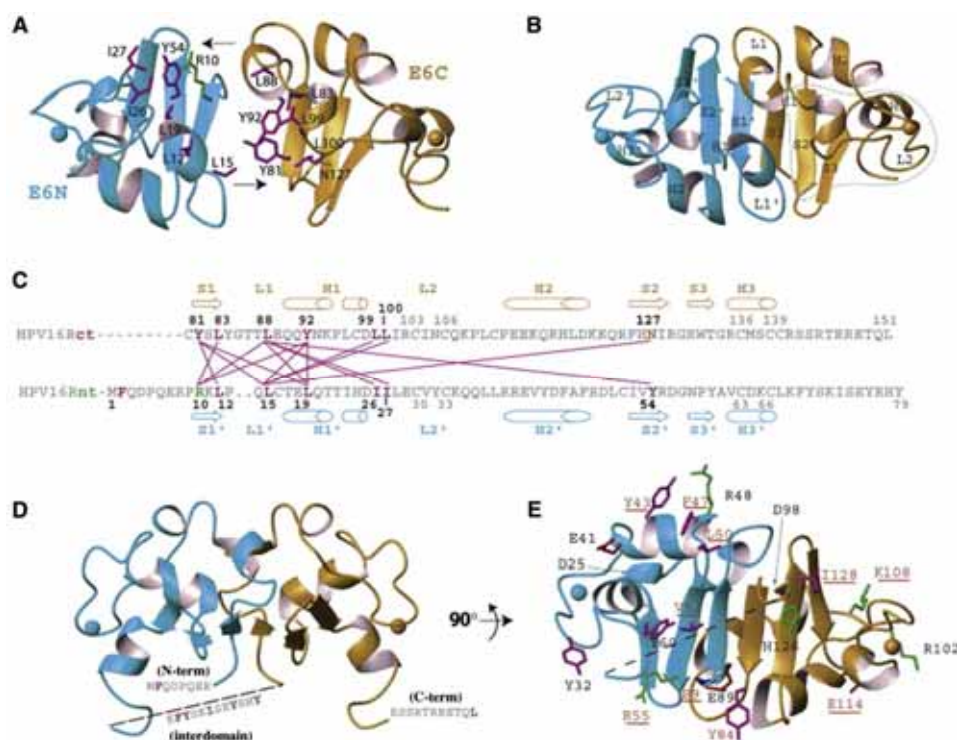


Figura 6 – Modelo pseudodimérico da proteína E6. **(A)** modelo com os segmentos N-terminal e C-terminal com os segmentos hidrofóbicos demonstrados. **(B)** modelo com os segmentos hidrofóbicos interagindo. **(C)** Demonstração linear dos segmentos hidrofóbicos. **(D)** Mapa do modelo com os segmentos não previstos no modelo. **(E)** Demonstração dos resíduos conservados em todas as proteínas E6 (Normine et al., 2006).

Até o presente momento nenhuma atividade enzimática foi atribuída a proteína E6. Demonstrou-se que a atividade biológica desta proteína se deve a interações interprotéicas (Ristriani et al., 2001) (ver figura 7).

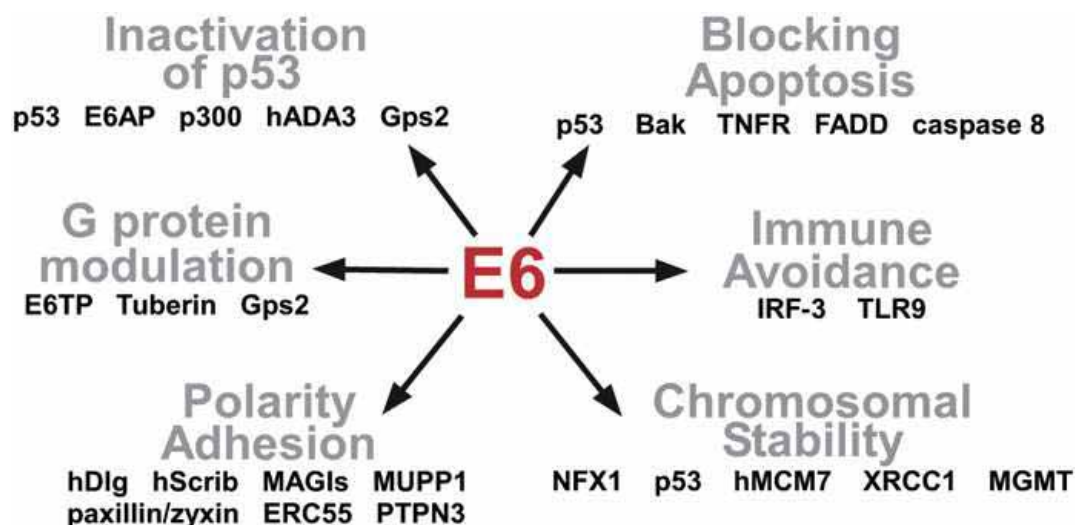


Figura 7 – Proteínas que interagem com a E6, alterando diversas vias metabólicas (Howie, 2009).

A primeira interação metabólica descrita para a E6 foi com a proteína E6 associada (E6AP), uma ligase capaz de unir a E6 com a ubiquitina (Huibregtse et al., 1991). A via da ubiquitina direciona proteínas para a degradação proteossomal através da adição de diversos monômeros de ubiquitina à proteína destinada à hidrólise. A proteína E1 ativa os monômeros de ubiquitina que são posteriormente transferidos pela E2 a uma E3-ubiquitina ligase, que confere especificidade ao substrato para a degradação. (Hershko & Ciechanover, 1992). O substrato mais estudado do complexo E6/E6AP-ubiquitina é a proteína fator de repressão tumoral p53, a principal consequência desta inativação é a inibição da apoptose na célula infectada pelo HPV, tornando seu ciclo de vida bem maior ao normalmente alcançado por células saudáveis.

A via intrínseca da apoptose desencadeia a morte celular a partir de sinais intracelulares, como DNA danificado, estresse oxidativo, desnutrição intracelular, e estímulos por quimoterápicos (Kaufmann and Earnshaw, 2000; Wang, 2001). Estes estímulos ativam diversas vias metabólicas que convergem para as mitocôndrias. A mitocôndria por sua vez recebe tanto estímulos pró como anti apoptóticos, quando esta a balança metabólica pende para o lado da apoptose, ocorre ativação das proteínas pró-apoptóticas BH3, ocorre a formação de poros na membrana mitocondrial com o extravasamento de citocromo c, fator de indução de apoptose (AIF), endonuclease G, Smac/Diablo and Htr/Omi. Estas proteínas mitocondriais formam o “apoptossomo”, um complexo protéico que resultam

na clivagem das proteínas citoplasmáticas caspase 3 e caspase 7, que se transformam nas caspases executoras, que clivam seus substratos poli-ADP-ribose, polimerase e laminina B, provocando a morte celular.

A via de apoptose extrínseca pode ser induzida durante a infecção viral como parte das respostas do hospedeiro, sendo ativada por sinais extracelulares que induzem a ativação de receptores letais na superfície celular. Estes receptores são representados principalmente pelos receptores do fator de necrose tumoral (TNFR). Esta família de receptores inclui o receptor para TNF 1 (TNFR-1), Fas/CD95, e os ligantes TNF-relacionados (TRAIL) DR-4 e DR-5. Uma vez ligados, os fatores recrutam moléculas adaptadoras dos iniciadores de caspase, como a caspase-8 e a caspase-10, formando complexos sinalizadores, que ativam as caspases 3 e 7, também resultando na morte celular, vide Figura 8 (Howie, 2009).

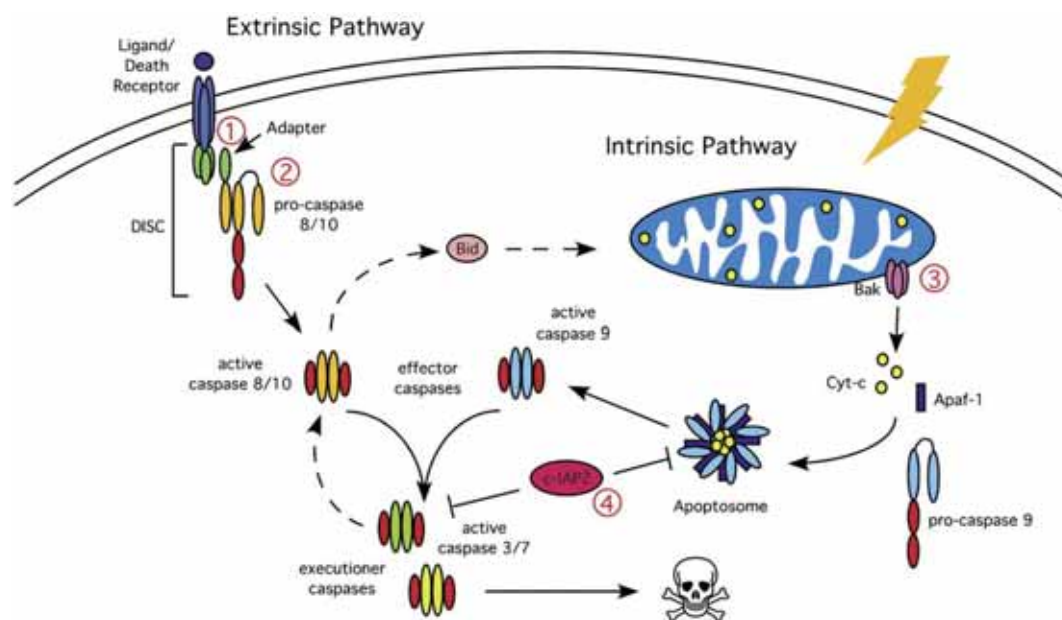


Figura 8 – Vias intrínseca e extrínseca da apoptose. (Howie et al., 2009)

Relatos científicos demonstram que a proteína E6 bloqueia a apoptose ligando-se a proteína *Bak*, induzindo sua inativação através de sua degradação pela via da ubiquitina, provavelmente com a participação da proteína ligante E3. Embora o papel exato da proteína *Bak* ainda não esteja completamente elucidado, a sua integridade é necessária para o desencadeamento dos eventos envolvidos na apoptose. Também já foi demonstrado que a proteína E6 bloqueia diretamente a via extrínseca da apoptose por interação direta com as

proteínas TNFR-1, FADD and caspase-8, também levando-as a um processo proteolítico (Filippova et al., 2002).

3.2.6 Estrutura e atividade biológica da proteína viral E7

As oncoproteínas E7 são compostas de aproximadamente 100 aminoácidos, a porção aminoterminal contém uma região similar à porção conservada CR1 e uma porção inteiramente similar à CR2 do adenovírus (Vousden and Jat, 1989). A presença de uma sequência conservada Leu-X-Cys-X-Glu (LXCXE) na região CR2 é indispensável para a interação com a proteína de repressão tumoral do retinoblastoma (pRB) na sua inativação (Munger et al., 1989). A porção C-terminal contém um domínio de zinco composto por dois motivos Cys-X-X-Cys (Barbosa et al., 1989) e pode funcionar como um sítio para dimerização, embora não existam comprovações *in vivo* que esta formação de dímeros de E7 ocorra.

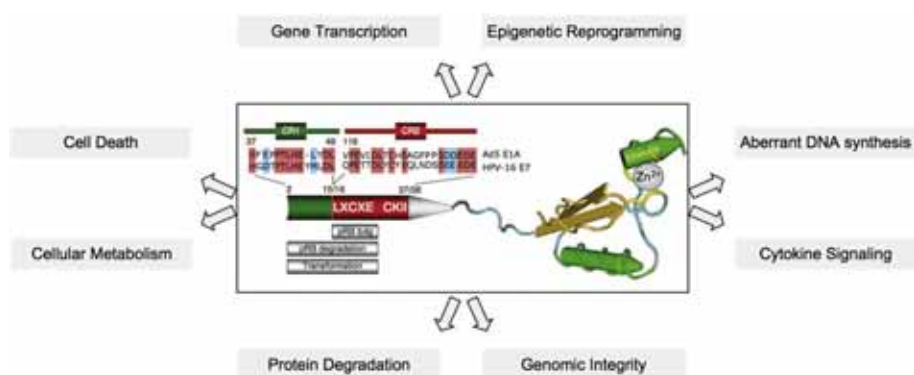


Figura 9 - HPV E7 e os processos celulares afetados. Regiões de afinidade CR1 (verde) e CR2 (vermelho), sítio de ligação na proteína pRB (LXCXE), sítio de fosforilação da caseína quinase II (CKII). Os resíduos de cisteína envolvidos na ponte de zinco estão indicados em amarelo (Ohlenschlager et al., 2006).

A estrutura tridimensional da proteína E7 foi elucidada por ressonância magnética nuclear (NMR) e cristalografia por RX (Liu et al., 2006; Ohlenschlager et al., 2006).

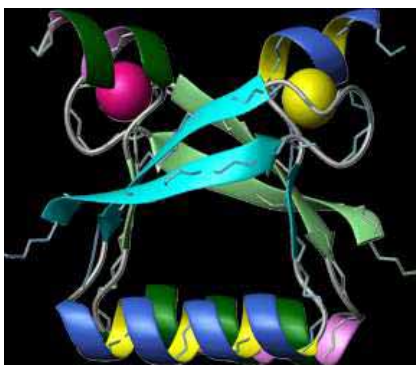


Figura 10 – Modelo computacional da proteína HPV-E7 (Ohlenschlager et al., 2006).

Estudos recentes demonstraram que a proteína E7 é degradada por um mecanismo proteossomal que envolve a conjugação de sua porção amino terminal com a ubiquitina, com um tempo de meia vida de menos de duas horas (Reinstein et al., 2000). Até o presente, não foram demonstradas atividades enzimáticas para a proteína E7, atribuindo-se suas atividades biológicas graças às suas interações intermoleculares com outras proteínas e com o DNA, subvertendo mecanismos metabólicos celulares normais.

Ambos os genes das proteínas E6 e E7 são conservadamente integrados ao DNA celular, e são os únicos consistentemente expressados nos carcinomas cervicais. Entre as proteínas de origem viral, apenas o complexo E1/E2 possui atividade enzimática, até então demonstrada, desta forma a presença ativa de proteínas celulares responsáveis pela replicação é necessária para a continuidade da replicação viral. Sabendo-se que as células epiteliais acima da camada basal evoluíram para um estágio não replicativo, espera-se que normalmente não ocorra síntese de DNA nestas células, então para que os vírus continuem a se replicar, é necessário que estes mecanismos inibitórios sejam subvertidos. Esta subversão dos mecanismos inibitórios da replicação do DNA se dá graças principalmente a atividade biológica da proteína E7 sobre a pRB, direcionando-a a proteólise pela via da ubiquitina (Collins et al., 2005) e por regulação da atividade transcripcional.

3.2.7 Regulação transcripcional

Uma das principais características do HPV é a sua capacidade de integrar seu próprio genoma ao da célula hospedeira. De fato, esta incorporação se dá de forma eficiente, com a integração de até centenas de cópias. Contudo apenas um segmento de controle de replicação é integrado (LCR). Estes segmentos contêm promotores da região regulatória viral, P105 para

o HPV-18 e P97 para o HPV-16 e o HPV-31. Está demonstrado que as proteínas E1 e E2 são as iniciadoras da integração e da transcrição, e possuem um efeito inibitório sobre a transcrição das proteínas E6 e E7, enquanto estas também possuem um efeito inibitório sobre a transcrição das proteínas E1 e E2. Desta forma ocorre um controle do tipo “feed-back” negativo entre elas (Thierry and Yaniv, 1987). A região controladora TATA encontra-se na região regulatória imediatamente anterior a P105, e parece recrutar os reguladores transcripcionais TFIID. Esta região promotora é estimulada pela presença de quatro proteínas E2 (Figura 11).

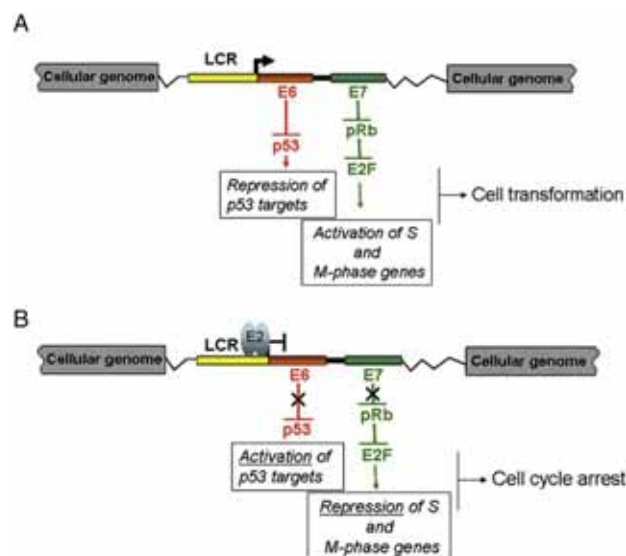


Figura 11 – Representação esquemática da integração do genoma HPV-18. (A) Replicação ativa das proteínas E6 e E7 pela promoção da região LCR. (B) Presença da proteína E2 provocando a inibição das proteínas E6 e E7 e seus efeitos sobre os fatores de supressão tumoral p53 e pRb (Thierry, 2009).

Além de seus próprios promotores, o HPV também faz uso de reguladores transcricional da célula hospedeira, como o AP1 e o SP1. O regulador transcricional SP1 participa da regulação de cerca de 30% dos genes das células epiteliais. Outros reguladores foram demonstrados, como GRE, NF1, YY1, Oct-1 e C/EBP.

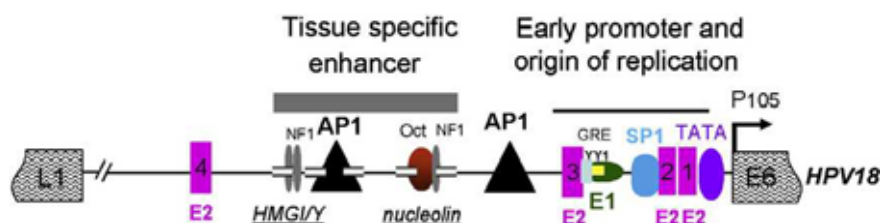


Figura 12 – Representação da região regulatória do no genoma integrado do HPV-18. As quatro regiões de ligação da proteína E2 estão representadas. Regiões regulatórias AP1 participam como promotores. A região regulatória HMGI/Y é específica do HPV-18. GRE, YY1 e NF1 também estão demonstrados (Thierry, 2009).

3.2.8 Inativação dos supressores tumorais p53 e pRB

Ao entrar no núcleo celular, o HPV necessita transcrever uma porção de seu genoma, a região precoce. Esta região expressa produtos necessários para a replicação do DNA viral. Os produtos desta região genômica iniciam um ciclo de replicação celular, necessitando de toda a atividade enzimática celular que contribuem para a replicação do DNA (precursores, DNA-polimerases, ligases, etc). Os genes que codificam estas proteínas são regulados por diversos fatores de transcrição. O complexo E2F-DP promovem a expressão destes genes. Este complexo está ligado a três diferentes proteínas retinoblastoma (pRB) em células quiescentes, o que inibe a expressão dos genes necessários para a entrada na fase S. Normalmente as células recebem estímulos hormonais externos para a divisão, resultando na síntese de ciclina D, que se combina com as quinases dependentes da ciclina, as cdk-4/6. Estas quinases fosforilam as proteínas pRb com a liberação dos complexos E2F-DP, permitindo a síntese da ciclina E. A formação do complexo ciclina E-cdk2 completa a fosforilação das proteínas pRb e a completa expressão do complexo E2F-DP, permitindo a expressão dos genes necessários à entrada na fase S. A transcrição das ciclinas D e E ativam um “feedback” que promove um processo autocatalítico com entrada na fase S. Neste processo, a proteína p53 atua detectando sinais de estresse que possam induzir erros na duplicação destas células. Danos no DNA, hipóxia celular, choques térmicos, privação nutricional e ativação por oncogenes servem como desencadeadores da atividade da proteína p53. Quando ocorre ativação da proteína p53, ocorre sua modificação por metilação e fosforilação. Uma das atividades da p53 é regular a expressão do gene p21, produzindo uma proteína que se liga a ciclina D-cdk 4/6, inibindo a fosforilação da pRB e evitando a entrada na fase S. Em sua atividade máxima, a proteína p53 inicia uma cascata de eventos que culminam na apoptose, com a morte celular elimina-se o clone celular possivelmente contendo erros de replicação com um DNA defeituoso.

A replicação viral necessita forçar a célula a entrar na fase S e utilizar ao máximo os fatores de replicação celulares. Na maioria das vezes, isto se dá por inativação dos genes supressores pRB e pela liberação da transcrição permitindo a formação dos complexos E2F-DP. No caso do HPV, a proteína E7 se liga a pRB, permitindo a expressão e formação do complexo E2F-DP (Dyson et al., 1989). A inativação da pRB permite também a inativação da p53, a inibição em conjunto destes dois fatores de inibição permite a plena replicação do DNA, e mais importante ainda, subvertem os mecanismos normais de morte celular por

inibição tanto da via intrínseca, como da via extrínseca da apoptose, provocando um aumento substancial do tempo de vida celular, fenômeno conhecido como imortalização” celular.

Nas células de mamíferos, as proteínas p53 são mantidas em baixas concentrações graças ao controle das proteínas MDM-2 e MDM-X, que se ligam a p53 promovendo sua poliubiquitinação. A expressão das MDM's são reguladas positivamente pela p53, este mecanismo auto-regulado permite pequenas variações nas atividades destas proteínas. Sinais de estresse celular possuem efeito inibitório sobre as proteínas MDM, promovendo a liberação da p53 de seu controle negativo. No momento em que a pRB é inibida pela E7 e E2F, ocorre a regulação da proteína ARF que se liga à proteína MDM e diminui sua atividade (Levine et al., 2009).

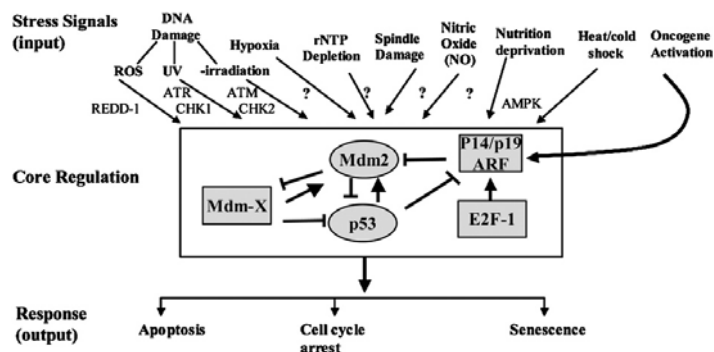


Figura 13 – Vias de ativação do p53: Fatores de estresse transmitem sinais para as moléculas regulatórias do p53. MDM-2 é uma ligase ubiquitina-p53. A MDM-X exerce efeito regulatório negativo. Por estímulos do fator de transcrição E2F ocorre a transcrição do ARF, regulando negativamente a ubiquitinação do p53. Estes mecanismos ativados pela p53 resultam em senescência ou apoptose (Levine, 2009).

O equilíbrio entre estes fatores permite a célula permanecer em estados quiescentes, contudo em casos de hiperexpressão de oncogenes inibidores de p53 e pRb ocorre o crescimento exacerbado destas linhagens celulares.

3.2.9 Interações com o sistema imune

As interações imunológicas entre o hospedeiro e o HPV possuem características especiais que dificultam seu estudo. O HPV possui extrema especificidade sobre a espécie humana, dificultando seu estudo em modelos animais e cultura de células.

A inoculação de vacinas contendo VLP's de proteínas do capsídeo de HPV's de alto risco, como HPV-16 e HPV-18 tem conferido uma imunidade duradora e forte o suficiente para prevenir infecções futuras, cumprindo satisfatoriamente o papel de vacinas profiláticas para as populações estudadas até 2007 (Kahn and Burk, 2007). Contudo, a imunidade conferida por uma primoinfecção natural não demonstra força ou persistência suficiente para prevenir novas infecções (Carter et al, 2000), muito menos se correlaciona com a detecção de HPV-DNA (Andersson et el, 2008). A participação de anticorpos não parece ser o mecanismo mais eficaz de combate natural à infecção pelo HPV, a descrição da síndrome de WHIN, onde existe a ausência dos receptores CXCR4, em que a mobilidade e o recrutamento dos neutrófilos estão comprometidos, parece indicar uma maior participação da imunidade celular no clearance das células infectadas pelo HPV (Gulino, 2003).

O componente mais imunogênico do HPV é a proteína L1, cujos títulos podem ser medidos por ELISA. In vivo, as infecções causadas por papilomavírus desencadeiam a produção de anticorpos que apresentam maior reatividade contra as proteínas L1 em sua conformação pentamérica. Contudo, em infecções naturais os títulos de anticorpos são baixos e sua detecção é difícil. Para os tipos mais estudados, HPV-6, 11, 16 e 18, o tempo de soroconversão médio é de seis meses, embora 30 a 50% dos pacientes parecem jamais adquirir imunidade contra qualquer partícula viral (Carter et al., 2000).

3.2.10 Classificação

As variações nos genes das proteínas L1, E6 e E7 são determinantes na classificação dos novos tipos de HPV. A ICTV (International Council on the Taxonomy of Viruses) determina que variações maiores que 10% individualizam novos tipos de HPV, variações entre 2 e 10% permitem a classificação de subtipos, enquanto que variações menores que 2% são considerados variantes de um mesmo tipo de HPV (Bernard et al. 1994). Os tipos de HPV são identificados por números, de acordo com a ordem de descrição, desta forma o primeiro e ser descrito foi o HPV 1, o segundo foi o HPV 2, e assim por diante. Existem mais de 200 tipos de HPV descritos. Porém apenas cerca de 100 tipos possui sua sequência genômica completamente descrita (de Villiers, 2004), Figura 13.

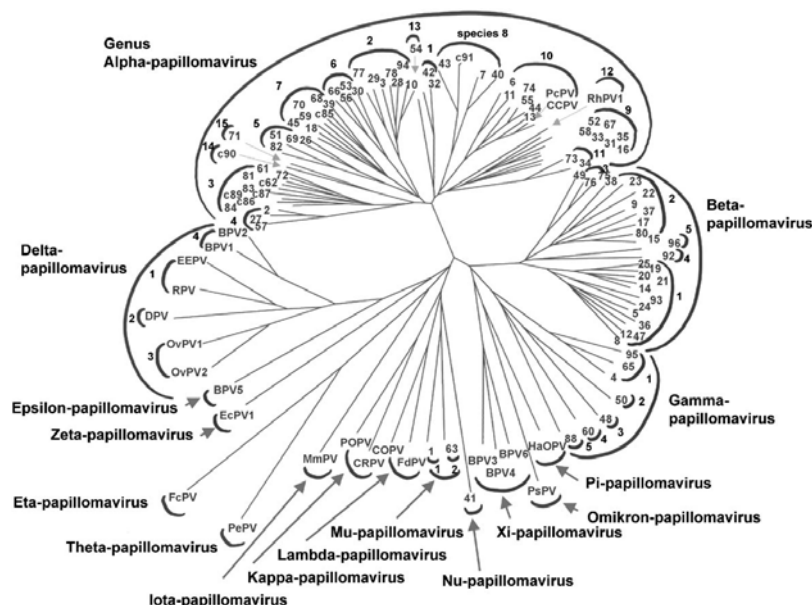


Figura 13 – Árvore filogenética dos 118 tipos de HPV. Baseado no sequenciamento da região ORF L1 (De villiers, 2004).

3.2.11 Potencial de Oncogênese

Os HPV são classificados de acordo com a tendência em provocar a transformação para lesões malignas. São classificados com de baixo risco oncogênico, ocorrendo em lesões benignas e intraepiteliais, raramente em lesões cancerosas (tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e CP6108). O grupo de alto risco oncogênico ocorre em lesões de alto grau e especialmente nos carcinomas de colo uterino, anus e glânde (tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 68, 73, e 82), existem ainda tipos de provável alto risco oncogênico (26, 53 e 66) e os tipos 34, 57 e 83 são considerados de risco indeterminado (Munoz, 2003; Wheeler, 2008).

Normalmente o ciclo de replicação dura quatro semanas e a infecção é auto-limitada, sendo eliminada pelo sistema imune espontaneamente. Contudo em alguns casos o vírus escapa às defesas do sistema imune, resultando em infecções persistentes. Pode ocorrer integralização do DNA viral ao DNA celular, com a síntese contínua das proteínas E6 e E7, permitindo a imortalização celular, este fenômeno ocorre mais comumente com os tipos HPV-16 e HPV-18, nestes casos é importante ressaltar que apenas 2% evoluem para lesões malignas, sendo necessária a participação de outros eventos ainda não completamente claros para esta transformação (Meijer et al, 2000). Foi demonstrado que a proteína E6 se liga a uma proteína celular ligante do gene supressor tumoral p53, inativando-o por ubiquitinação,

evitando a supressão do crescimento celular tumoral. Uma vez estabelecida a lesão maligna, a participação de um tipo específico de HPV tem sido demonstrada em mais de 90% dos casos, pela detecção de DNA viral nos tecidos afetados, de fato, os genes virais E6 e E7 são invariavelmente expressos pelas células tumorais (Yugawa, 2009).

3.2.12 Cofatores na Patogênese

Como já citado anteriormente, apenas uma pequena parte das infecções persistentes evoluem para formas neoplásicas, havendo a necessidade de eventos biológicos adicionais para esta transformação. Estes facilitadores adicionais são conhecidos como cofatores e incluem, segundo relatos da literatura científica, herança genética, respostas imunológicas, hormônios como a progesterona, tabagismo e promiscuidade (Magnusson, 2000).

3.2.13 Transformação oncogênica da primoinfecção ao carcinoma invasivo

O curso das doenças causadas pelo papilomavírus possui etapas conhecidas e bem delineadas. Em uma fase inicial e geralmente autolimitada da doença ocorrem alterações inflamatórias típicas. Contudo, a persistência destas infecções pode cursar com alterações progressivas que culminam com o carcinoma invasivo. O curso destes eventos pode ser dividido em três etapas distintas: um período inicial de inflamação, um período intermediário de alterações displásicas epiteliais, que diversos autores consideram neoplasias intraepiteliais, e um período posterior com lesões características de carcinoma com extravasamento deste crescimento para além da lâmina basal, caracterizando a carcinoma invasivo.

Apesar de um elevado número de pessoas sofrerem inflamações por papilomavírus humano, apenas uma fração desta população irá desenvolver as formas mais avançadas da doença, fatores pessoais, ambientais e relacionados ao agente etiológico devem ser considerados. Atualmente, é amplamente aceito que as inflamações persistentes são necessárias para o surgimento das transformações neoplásicas, especialmente na presença de tipos de papilomavírus mais oncogênicos. Grande parte dos autores considera como persistente uma inflamação comprovada por mais de seis meses, na grande maioria dos casos pode ser demonstrada a ativa replicação do HPV nestes tecidos (Ho, et al., 1998).

O material genético do HPV pode ser encontrado na célula infectada em três formas, episomal, integrado e na forma mista. Na fase inicial da infecção, ocorre a internalização do vírus, seu material genético é direcionado ao núcleo celular, e inicia-se o processo de replicação do próprio material na forma de fita dupla circular (o episomo), simultaneamente, inicia-se o processo de transcrição das proteínas codificadas pelo DNA viral diretamente a partir da fita dupla circular, inicialmente, ocorre a transcrição dos genes precoces que codificam as proteínas E1, E2, E4, E5, E6 e E7, posteriormente ocorre a transcrição das proteínas tardias responsáveis pela formação do capsídeo, L1 e L2. Neste período, ocorre o surgimento das alterações dérmicas e mucosas próprias da lesão inflamatória causada pelo vírus, e estas alterações serão mais severas quando houver uma carga viral mais elevada, ocorrendo uma replicação viral mais intensa e uma maior eliminação de partículas virais (Lillo, 2005).

Em um período posterior, pode ocorrer a integração de parte do material genético do papilomavírus ao DNA celular. Esta integração ocorre invariavelmente com apenas parte do DNA viral, iniciando-se no meio da região precoce com fragmentação do gene E2. Por este motivo esta proteína deixa de ser expressa e ocorre uma auto-regulação das proteínas E6 e E7. Neste período ocorre uma maior inativação dos genes de supressão tumoral pRB e p53, com uma maior inibição da apoptose e uma consequente maior evidência de deformações celulares, descritas como atipias celulares intensas (displasia grau III), o crescimento celular desordenado se instala progressivamente, com ruptura dos limites epiteliais e invasão além da lâmina basal, configurando o carcinoma invasivo. Esta progressão não ocorre universalmente, de fato na maioria dos casos as lesões inflamatórias são auto-limitadas. O tempo transcorrido entre a primoinfecção e o surgimento do carcinoma invasivo é variável, sendo na maioria dos casos necessário de 5 a 20 anos para que estes eventos ocorram plenamente (Woodman, 2007).

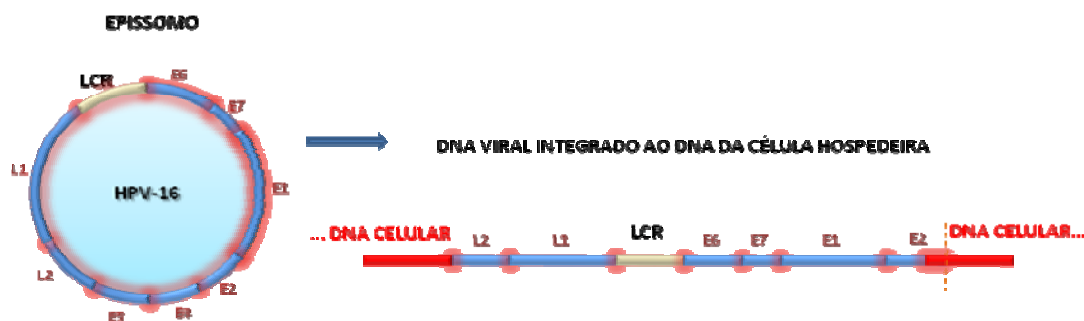


Figura 14 – Integração do DNA viral episomal com o DNA cromossômico da célula hospedeira, apenas parte do gene E2 foi integrado, a proteína E2 deixa de ser expressa.

3.2.14 Transmissão

A transmissão do HPV é atualmente considerada como sexual, figurando desta forma como uma das principais doenças sexualmente transmissíveis, principalmente por sua frequência (Kjaer et al., 2001). Podem ocorrer transmissões esporádicas por outras vias, como fômites ou perinatal, tendo sido descrita a presença de HPV em líquido amniótico, pele e orofaringe de recém-nascidos em até 73% dos casos (Cason et al., 1995.; Kaye et al.; 1996), contudo esta aparente elevada contaminação não resultou em altos níveis de infecção materno-fetal nas populações estudadas.

3.2.15 Formas Clínicas

A infecção pelo HPV tem sido descrita em três formas de apresentação: clínica, subclínica e latente. A forma clínica mais comum se traduz no surgimento de lesões dérmicas exofíticas de superfície granulosa, que podem ser únicas, mas geralmente são múltiplas e de tamanhos variados entre milímetros a poucos centímetros, cada lesão. Podem apresentar alterações de coloração em relação à pele normal, geralmente eritematosas ou hiperpigmentares. Estas lesões são conhecidas como verrucóides ou condilomatosas (verrugas ou condilomas) e são mais encontradas em áreas dérmicas mais umedecidas, em especial nas regiões anogenitais, como vulva, pequenos e grandes lábios, introito vaginal, vagina, colo uterino, anus, canal anal, glândula peniana, uretra distal e meato uretral. Os sintomas relatados incluem os relacionados diretamente a presença destas lesões proliferativas, como presença das tumorações, sangramentos e pruridos provocados por atrito, e até mesmo sintomas secundários a obstruções locais, como por exemplo, obstrução

urinária. Em casos raros podem ocorrer lesões gigantes com necroses superficiais e sangramentos, estas lesões são conhecidas como tumores de Burske-Levenstein. A incidência destas formas clínicas tem aumentado nos últimos anos nos países em desenvolvimento, mais caracteristicamente em pessoas com vida sexual promíscua (Franceschi, 2009).



Figura 15 – lesões verrucóides dérmicas.



Figura 16 – lesões verrucóides anogenitais.



Figura 17 - lesões verrucóides anogenitais.

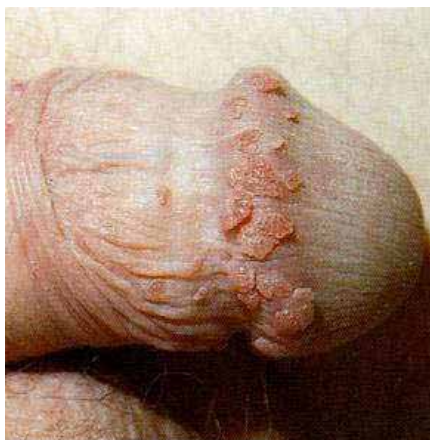


Figura 18 – condilomas na glânde peniana com eritema local.



Figura 19 – Lesões condilomatóides na região vulvar.

As lesões subclínicas apresentam-se como áreas difusas de hiperplasia epitelial não papilífera da camada germinativa (Meisels, 1976) e sua diferenciação histológica é plana ou micropapilar (Reid, 1984). Estas lesões ocorrem mais comumente no colo uterino e glânde e podem ser mais bem observadas após a aplicação de ácido acético a 5% que coagula e precipita as proteínas intracelulares, demonstrando um epitélio acetobranco, máculas e pápulas (Lauro et al., 2000). Nas formas latentes não evidenciam-se lesões macroscópicas e nem ocorrem sintomas, só permitindo sua identificação através de técnicas de biologia molecular. Nestas formas o DNA viral se encontra na forma episomal, replicando-se lentamente, apenas a cada replicação celular, podendo ocorrer sua reativação e permitindo o recrudescimento de formas infecciosas.

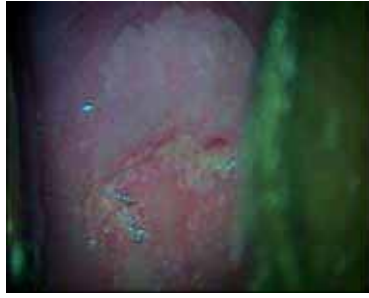


Figura 20 – colo uterino – epitélio acetobranco à colposcopia.

4 Referências

Andersson K, Waterboer T, Kirnbauer R, Slupetzky K, Iftner T, de Villiers E M, Forslund, O, Pawlita M, Dillner J.. Seroreactivity to cutaneous human papillomaviruses among patients with nonmelanoma skin cancer or benign skin lesions. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2008; 17: 189–195.

Baker T S, Newcomb W W, Olson N H, Cowser L M, Olson C, Brown J C. Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. 1991 *Biophys J*; 60 (6): 1445–1456.

Banerji J, Rusconi S, Schaffner W. Expression of a beta-globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. 1981; *Cell* 27: 299–308.

Barbosa M S , Lowy D R , Schiller J T. Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins. *J Virol* 1989; 63 (3): 1404–1407.

Benoist C, Chambon P. In vivo sequence requirements of the SV40 early promotor region. 1981 *Nature*; 290: 304–310.

Berg M , Stenlund A. Functional interactions between papillomavirus E1 and E2 proteins. *J Virol* 1997; 71 (5): 3853–3863.

Berget S M , Moore C , Sharp P A. . Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. 1977 *Proc Natl Acad Sci USA*; 74: 3171–3175.

Bernard C, Mougin C, Laurent R, Lab M. Oncogene activation: an informative marker for the human papillomavirus-lesions severity. 1994 *Cancer Detect Prev*;18(4):273-82.

Bernfield M , Götte M , Park P W, Reizes O, Fitzgerald M L, Lincecum J, Zako M. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. 1999 *Ann Rev Biochem*; 68: 729–777.

Bernfield M, Kokenyesi R, Kato M, Hinkes M T, Spring J, Gallo R L , Lose E J. Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. 1992 *Annu Rev Cell Biol* 8: 365–393.

Boshart M, Gissman L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. 1984 *EMBO J*; 3: 1151–1157.

Boshart M, zur Hausen H. Human papillomaviruses (HPV) in Buschke–Loewenstein tumors: physical state and identification of a tandem duplication in the non-coding region of a HPV 6-

subtype. 1986 J Virol 58: 963–966.

Buck CB, Cheng N, Thompson CD, Lowy DR, Steven A C, Schiller J T, Trus B L. Arrangement of L2 within the papillomavirus capsid. 2008 J Virol; 82 (11): 5190–5197.

Carter J J, Koutsky L A, Hughes J P, Lee S K, Kuypers J, Kiviat N, Galloway DA. Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. 2000 J Infect Dis; 181: 1911–1919.

Carter J J, Wipf G C, Benki S F, Christensen N D, Galloway D A. Identification of a human papillomavirus type 16-specific epitope on the c-terminal arm of the major capsid protein L1. 2000 J Virol; 77 (21): 11625–11632.

Cason J, Kaye J N, Jewers R J, Kambo P K, Bible J M, Kell B, Shergill B, Pakarian F, Raju K S, Best J M. Perinatal infection and persistence of human papillomavirus types 16 and 18 in infants. J Med Virol 1995; 47(3):209-18.

Challberg M D, Kelly Jr T J. Adenovirus DNA replication in vitro. Proc Natl Acad Sci USA 1979; 76:655–659.

Chen X S, Garcea R L, Goldberg I, Casini G, Harrison S C. Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. 2000 Mol Cell; 5: 557–567.

Chow L T, Gelinas R E, Broker T R, Roberts R J. An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. 1977 Cell; 12: 1–8.

Ciuffo G. Innesto positive con filtrato di verruca volgare. 1907 Giornale Ital Mal Ven Pelle; 48: 12–17.

Clower R V, Fisk J C, Melendy T.. Papillomavirus E1 protein binds to and stimulates human topoisomerase I. 2006 J Virol; 80 (3): 1584–1587.

Cole S T, Danos O. Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome. Phylogeny of papillomaviruses and repeated structure of the E6 and E7 gene products. 1987 J Mol Biol; 193 (4): 599–608.

Collins A S, Nakahara T, Do A, Lambert P F. Interactions with pocket proteins contribute to the role of human papillomavirus type 16 E7 in the papillomavirus life cycle. 2005 J Virol; 79 (23): 14769–14780.

Courtneidge S A, Smith A E. Polyoma virus transforming protein associates with the product of the c-src cellular gene. 1983 Nature; 303: 435–439.

Crum C P, Ikenberg H, Richart R M, Gissmann L. Human papillomavirus type 16 and early cervical neoplasia. 1984 *N Engl J Med*; 310: 880–883.

Culp T D, Budgeon L R, Christensen N D. Human papillomaviruses bind a basal extracellular matrix component secreted by keratinocytes which is distinct from a membrane-associated receptor. 2006a *Virology*; 347 (1): 147–159.

Culp T D, Budgeon L R, Marinkovich M P, Meneguzzi G, Christensen N D. Keratinocyte-secreted laminin 5 can function as a transient receptor for human papillomaviruses by binding virions and transferring them to adjacent cells. 2006b *J Virol* 80; (18): 8940–8950.

Daling J R, Weiss N S, Hislop T G, Maden C, Coates R J, Sherman, K J, Ashley RL, Beagrie M, Ryan J A, Corey L. Sexual practices, sexually transmitted diseases, and the incidence of anal cancer. 1987 *N Engl J Med*; 317: 973–977.

Danna K J, Sack Jr G H, Nathans D. Studies of simian virus 40 DNA. VII. A cleavage map of the SV40 genome. 1973 *J Mol Biol*; 78: 363–376.

Day P M, Lowy, D R, Schiller J T. Heparan sulfate-independent cell binding and infection with furin pre-cleaved papillomavirus capsids. 2008 *J Virol*; 82 (24):12565–12568.

de Villiers E M, Claude F, Thomas R B, Ulrich B H, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. 2004 *Virology*; 324: 17– 27.

de Villiers E M, Gissmann L, zur Hausen H. Molecular cloning of viral DNA from human genital warts. 1981 *J Virol*; 40: 932–935.

de Villiers E M, Weidauer H, Otto H, zur Hausen H. Papillomavirus DNA in human tongue carcinomas. 1985 *Int J Cancer*; 36: 575–578.

DeCaprio J A, Ludlow J W, Figge J, Shew J Y, Huang, C M, Lee W H, Marsillo E, Paucha E, Livingston D M. SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. 1988 *Cell*; 54: 275–283.

Della Torre G, Pilotti S, de Palo G, Rilke F. Viral particles in cervical condylomatous lesions. 1978 *Tumori*; 64: 549–553.

Doorbar J, Campbell D, Grand R J, Gallimore P H. Identification of the human papilloma virus-1a E4 gene products. 1986 *EMBO J*; 5(2):355-62.

Durst M, Gissmann L, Idenburg H, zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. 1983 *Proc Natl Acad Sci USA*; 80: 3812–3815.

Dynan W S, Tjian R. The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. 1983 *Cell*;35: 79–87.

Elenius K, Vainio S, Laato M, Salmivirta M, Thesleff I, Jalkanen M. Induced expression of syndecan in healing wounds. 1991 *J Cell Biol*; 114 (3): 585–595.

Ellermann V, Bang O. Experimentelle leukämie bei hühnern. 1908 *Zentralbl Bakteriologie*; 46: 595–609.

Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore P S. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. 2008 *Science*; 319: 1096–1100.

Fiers W, Contreras R, Haegemann G, Rogiers R, Van de Voorde A, Van Heuverswyn H, Van Herreweghe J, Volckaert G, Ysebaert M. Complete nucleotide sequence of SV40 DNA. 1978 *Nature*; 273: 113–120.

Filippova M, Song H, Connolly J L, Dermody T S, Duerksen-Hughes P J. The human papillomavirus 16 E6 protein binds to tumor necrosis factor (TNF) R1 and protects cells from TNF-induced apoptosis. 2002 *J Biol Chem*; 277 (24): 21730–21739.

Fitzgerald M, Shenk T. The sequence 5'-AAUAAA-3' forms parts of the recognition site for polyadenylation of late SV40 mRNAs. 1981 *Cell*; 24: 251–260.

Franceschi S, Cuzick J, Herrero R, Dillner J, Wheeler C. Eurogin 2008 roadmap on cervical cancer prevention. *Int J Cancer* 2009; Jun 11. [Epub – pré-impressão].

Fransson L A. Glypicans. 2003 *Int J Biochem Cell Biol*; 35 (2): 125–129.

Fried M. Cell-transforming ability of a temperature-sensitive mutant of polyoma virus. 1965 *Proc Natl Acad Sci USA*; 53: 486–491.

Funk J O, Waga S, Harry J B, Espling E, Stillman B, Galloway D A. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. 1997 *Genes Dev*; 11 (16): 2090–2100.

Gallo R L, Ono M, Povsic T, Page C, Eriksson E, Klagsbrun M, Bernfield M. Syndecans, cell surface heparan sulfate proteoglycans, are induced by a proline-rich antimicrobial peptide from wounds. 1994 *Proc Natl Acad Sci USA*; 91 (23): 11035–11039.

Gillison M L, D'Souza G, Westra W, Sugar E, Xiao W, Begum S, Viscidi R. Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. 2008 *J Natl Cancer Inst*; 100: 407–420.

Gissmann M L, Diehl V, Schultz-Coulon H, zur Hausen H. Molecular cloning and characterization of human papilloma virus DNA derived from a laryngeal papilloma. 1982 J Virol; 44: 393–400.

Gissmann M L, Wolnik L, Ikenberg H, Koldovsky U, Schnürch H G, zur Hausen H. Human papillomavirus type 6 and 11 sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. 1983 Proc Nat Acad Sci USA; 80: 560–563.

Gissmann M L, zur Hausen H. Partial characterization of viral DNA from human genital warts (condylomata acuminata). 1980 Int J Cancer; 25: 605–609.

Gross L. A filtrable agent, recovered from Akr leukemia extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. 1953 Proc Soc Exp Biol Med; 83: 414–421.

Gulino A V. WHIM syndrome: a genetic disorder of leukocyte trafficking. 2003 Curr Opin Allergy Clin Immunol; 3: 443–450.

Hamer D H, Leder P. Expression of the chromosomal mouse Beta maj-globin gene cloned in SV40. 1979 Nature: 281: 35–40.

Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system for protein degradation. 1992 Annu Rev Biochem; 61: 761–807.

Hills E, Laverty C R. Electron microscope detection of papilloma virus particles in routine cervical smear. 1979 Acta Cytol; 23: 53–56.

Ho G Y, Bierman R, Beardsley L, Chang C J, Burk R D. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. 1998 N Engl J Med; 338: 423–428.

Howie H L, Katzenellenbogen R A, Galloway D. Papillomavirus E6 proteins. 2009 Virology; 384: 324–334.

Howley P M, Livingston D M. Small DNA tumor viruses: Large contributors to biomedical sciences. 2009 Virology; 384: 256–259.

Huibregtse J M, Scheffner M, Howley P M. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus type 16 or 18. 1991 EMBO J; 10: 4129–4135.

Ikenberg H, Gissmann L, Gross G, Grussendorf-Conen E-I, zur Hausen H. Human papillomavirus type 16 related DNA in genital Bowen's disease and in Bowenoid papulosis. 1983 Int J Cancer; 32: 563–564.

Jablonska S, Formas I. Weitere positive Ergebnisse mit Auto- und Heteroinokulation bei Epidermodysplasia veruuciformis Lewandowsky-Lutz. 1959 Dermatologica; 118: 86–93.

Jablonska S, Millewski B. Zur Kenntnis der Epidermodysplasia verruciformis Lewandowsky-Lutz. 1957 *Dermatologica*; 115: 1–22.

Jones D L, Alani R M, Munger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. 1997 *Genes Dev*; 11 (16): 2101–2111.

Joyce J G, Tung J-S, Przysiecki C T, Cook J C, Lehman E D, Sands J A, Jansen K U, Keller P M,. The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J. Biol. Chem*; 274: 5810–5822.

Kahn JA, Burk RD. Papillomavirus vaccines in perspective. 2007 *Lancet*; 369: 2135–2137.

Kalderon D, Roberts B L, Richardson W D, Smith A E. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. 1984 *Cell*; 39: 499–509.

Kaufmann S H, Earnshaw W C. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. 2000 *Exp Cell Res*; 256 (1): 42–49.

Kaye J N, Starkey W G, Kell B, Biswas C, Raju K S, Best J M, Cason J. Human papillomavirus type 16 in infants: use of DNA sequence analyses to determine the source of infection. 1996 *J Gen Virol*; 77:1139-43.

Kjaer S K, Chackerian B, van den Brule A J, Svare E I, Paull G, Walbomers J M, Schiller J T, Bock J E, Sherman M E, Lowy D R, Meijer C L. 2001 High-risk human papillomavirus is sexually transmitted: evidence from a follow-up study of virgins starting sexual activity (intercourse). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 10(2):101-6.

Koutsky L A, Ault K A, Wheeler C M, Brown D R, Barr E, Alvarez F B, Chiacchierini L M, Jansen K U.. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. 2002 *N Engl J Med*; 347: 1645–1651.

Kovesdi I, Reichel R, Nevins J R. Identification of a cellular transcription factor involved in E1A trans-activation. 1986 *Cell*; 45: 219–228.

Kurg R, Tekkel H, Abroi A, Ustav M. Characterization of the functional activities of the bovine papillomavirus type 1 E2 protein single-chain heterodimers. 2006 *J Virol*; 80 (22): 11218–11225.

Lace M J, Anson J R, Thomas G S, Turek L P, Haugen T H. The E8–E2 gene product of human papillomavirus type 16 represses early transcription and replication but is dispensable for viral plasmid persistence in keratinocytes. 2008 *J Virol*; 82 (21): 10841–10853.

Land H, Parada L F, Weinberg R A. Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. 1983 *Natur*; 304: 596–602.

Lane D P, Crawford L V. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. 1979 *Nature*; 278: 261–263.

Lanford R E, Butel J S. Construction and characterization of an SV40 mutant defective in nuclear transport of T antigen. 1984 *Cell*; 37: 801–813.

Lauro C, Ammaturo F P, Quirino L, Rotondi M, Soriano A, Panariello S. Evaluation of partners of women with HPV infection. 2000 *Minerva Ginecol*; 52(12):503-7.

Levine A J. The common mechanisms of transformation by the small DNA tumor viruses: The inactivation of tumor suppressor gene products: p53. 2009 *Virology*; 384: 285–293.

Lewandowsky F, LutzW.. Ein Fall einer bisher nicht beschriebenen Hauterkrankung (Epidermodysplasia verruciformis). 1922 *Arch Dermatol Syph* 141: 193–203.

Lillo F B et al. Determination of human papillomavirus (HPV) load and type in high-grade cervical lesions surgically resected from HIV-infected women during follow-up of HPV infection. 2005 *Clin Infect Dis*; 40: 451–457.

Linzer D, Levine AJ. Characterization of a 54K Dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. 1979 *Cell*; 17: 43–52.

Liu X, Clements A, Zhao K, Marmorstein R. Structure of the human Papillomavirus E7 oncoprotein and its mechanism for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor. 2006 *J Biol Chem* 281 (1): 578–586.

Löning T, Ikenberg H, Becker J, Gissmann L, Hoepfer I, zur Hausen H. Analysis of oral papillomas, leukoplakias, and invasive carcinomas for human papillomavirus type related DNA. *J. Invest. Dermatol*; 84: 417–420

Lont AP, Kroon BK, Horenblas S, Gallee M P, Berkho J, Meijer C J, Snijders P J. Presence of high-risk human papillomavirus DNA in penile carcinoma predicts favorable outcome in survival. 2006 *J Cancer* ;119: 1078–1081.

LutzW. A propos de l'epidermodysplasie verruciforme. 1946 *Dermatologica*; 92: 30–43.

Madsen BS, Jensen H L, van den Brule A J, Wohlfahrt J, Frisch M. Risk factors for invasive squamous cell carcinoma of the vulva and vagina — population-based case-control study in Denmark. 2008 *Int J Cancer*; 122: 2827–2834.

Magnusson P K, Lichtenstein P, Gyllensten U B. Heritability of cervical tumours. 2000 *Int J*

Cancer; 88(5):698-701.

Massimi P, Pim D, Banks L. Human papillomavirus type 16 E7 binds to the conserved carboxy-terminal region of the TATA box binding protein and this contributes to E7 transforming activity. 1997 J Gen Virol; 78:2607-13.

Meijer C J, Rozendaal L, Voorhorst F J, Verheijen R, Helmerhost T J, Walboomers JM. Human papillomavirus and screening for cervical cancer: state of art and prospects. 2000 Ned Tijdschr Geneesk; 26: 1675-9.

Meisels A, Fortin R. Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytologic patterns. 1976 Acta Cytol; 20: 505–509.

Modis Y, Trus B L, Harrison S C. Atomic model of the papillomavirus capsid. 2002 EMBO J; 21 (18): 4754–4762.

Müller M, Gissmann L, Cristiano R J, Sun X Y, Frazer I H, Jenson A B, Alonso A, Zentgraf H, Zhou J. Papillomavirus capsid binding and uptake by cells from different tissues and species. 1995 J Virol; 69 (2): 948–954.

Mulligan R C, Howard B H, Berg P. Synthesis of rabbit beta-globin in cultured monkey kidney cells following infection with a SV40 beta-globin recombinant genome. 1979 Nature; 277: 108–114.

Munger K, Werness B A, Dyson N, Phelps W C, Harlow E, Howley PM. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. 1989 EMBO J; 8 (13): 4099–4105.

Muñoz N, Bosh F X, de Sanjosé S, Herrero R, Castlesague X, Shah K V, Snijders P K Meijer C J. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. 2003 N Eng J Med; 6: 518-27.

Nahmias A J, Josey W E, Naib Z M, Luce C F, Guest B A. Antibodies to Herpesvirus hominis types 1 and 2 in humans. II. Women with cervical cancer. 1970 Am J Epidemiol; 91: 547–552.

Naib Z M, Nahmias A J, Josey W E, Kramer J H. Genital herpetic infections. Association with cervical dysplasia and carcinoma. 1969 Cancer; 23: 940–945.

Nomine Y, Masson M, Charbonnier S, Zanier K, Ristriani T, Deryckere F, Sibler A P, Desplancq D, Atkinson R A, Weiss E, Orfanoudakis G, Kieffer B, Trave G. Structural and functional analysis of E6 oncoprotein: insights in the molecular pathways of human papillomavirus-mediated pathogenesis. 2006 Mol Cell; 21 (5): 665–678.

Ohlenschlager O, Seiboth T, Zengerling H, Briese L, Marchanka A, Ramachandran R, Baum M,

Korbas M, Meyer-Klaucke W, Durst M, Gorlach M. Solution structure of the partially folded high-risk human papilloma virus 45 oncoprotein E7. 2006 *Oncogene*; 25 (44): 5953–5959.

Orth G. Epidermodysplasia verruciformis: a model for understanding the oncogenicity of human papillomaviruses. 1986 *Ciba Found Symp*; 120: 157–174.

Orth G. Host defenses against human papillomaviruses: lessons from epidermodysplasia verruciformis. 2008 *Curr Top Microbiol Immunol*; 321: 59–83.

Pallas D C, Shahrik LK, Martin B L, Jaspers S, Miller T B, Brautigan D L, Roberts T M. Polyoma small and middle T antigens and SV40 small T antigen form stable complexes with protein phosphatase 2A. 1990 *Cell*; 60: 167–176.

Piirsoo M, Ustav E, Mandel T, Stenlund A, Ustav M. Cis and trans requirements for stable episomal maintenance of the BPV-1 replicator. 1996 *EMBO J*; 15 (1): 1–11.

Psyrri A, DiMaio D. Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer. 2008 *Nature Clin Pract Oncol*; 5: 24–31.

Querido E, Marcellus R C, Lai A, Charbonneau R, Teodoro J G, Ketner G, Branton PE. Regulation of p53 levels by the E1B 55-kilodalton protein and E4orf6 in adenovirus-infected cells. 1997 *J Virol*; 71: 3788–3798.

Rawls W E, Tompkins W A, Figueroa M E, Melnick J L. Herpesvirus type 2: association with cancer of the cervix. 1968 *Science*; 161: 1255–1256.

Reddy V B, Thimmappaya B, Dhar R, Subramanian K N, Zain B S, Pan J, Ghosh P K, Celma M L, Weissman S M. The genome of simian virus 40. 1978 *Science*; 200: 494–502.

Reid R, Crum C P, Herschman B R, Fu Y S, Braun L, Shah K V, Agronow S J, Stanhope C R. Genital warts and cervical cancer. III. Subclinical papillomaviral infection and cervical neoplasia are linked by a spectrum of continuous morphologic and biologic change. 1984 *Cancer*; 53 (4): 943–53.

Reinstein E, Scheffner M, Oren M, Ciechanover A, Schwartz A. Degradation of the E7 human papillomavirus oncoprotein by the ubiquitin-proteasome system: targeting via ubiquitination of the N-terminal residue. 2000 *Oncogene*; 19 (51): 5944–5950.

Richards R M, Lowy D R, Schiller J T, Day P M. Cleavage of the papillomavirus minor capsid protein, L2, at a furin consensus site is necessary for infection. 2006 *Proc Natl Acad Sci USA*; 103 (5): 1522–1527.

Rigoni-Stern D. Fatti statistici relative alle malattie cancerose che servirono de base alla poche cose dette dal dott. 1842 *Giornale service propr pathol terap ser*; 2: 507–517.

Ristriani T, Nomine Y, Masson M, Weiss E, Trave G. Specific recognition of fourway DNA junctions by the C-terminal zinc-binding domain of HPV oncoprotein E6. 2001 *J Mol Biol*; 305(4): 729–739.

Roberts S, Ashmole I, Rookes S M, Gallimore P H. Mutational analysis of the human papillomavirus type 16 E1--E4 protein shows that the C terminus is dispensable for keratin cytoskeleton association but is involved in inducing disruption of the keratin filaments. 1997 *J Virol*; 71(5):3554-62.

Roden, R B, Kirnbauer R, Jenson A B, Lowy D R, Schiller J T. Interaction of papillomaviruses with the cell surface. 1994 *J Virol*; 68 (11): 7260–7266.

Rous P. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. 1911 *J Exp Med*; 13: 397–411.

Rous P, Beard JW. Carcinomatous changes in virus-induced papillomas of rabbits. 1934 *Proc Soc Exp Biol Med*; 32: 578–580.

Rous, P., Friedewald, W.F., 1944. The effect of chemical carcinogens on virus-induced rabbit papillomas. *J. Exp. Med.* 79, 511–537.

Rous P, Kidd JG. The carcinogenic effect of a papillomavirus on the tarred skin of rabbits. I. Description of the phenomenon. 1938 *J Exp Med*; 67: 399–422.

Ruiter M, Van Mullem P J. Behaviour of virus in malignant degeneration of skin lesions in epidermodysplasia verruciformis. 1970 *J Invest Dermatol*; 54: 324–331.

Salunke D M, Caspar D L, Garcea R L. Polymorphism in the assembly of polyomavirus capsid protein VP1. 1989 *Biophys J*; 56: 887–900.

Sapp M, Day P M. Structure, attachment and entry of polyoma- and papillomaviruses. 2009 *Virology*; 384: 400–409.

Sarnow P, Ho Y S, Williams J, Levine A J. Adenovirus E1b-58 kD tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 kD cellular protein in transformed cells. 1982 *Cell*; 28: 387–394.

Scheffner M, Huibregtse J M, Vierstra R D, Howley P M. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. 1993 *Cell*; 75: 495–505.

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. 1990 *Cell*; 63: 1129–1136.

Schrier P I, Bernards R, Vaessen, R T, Houweling A, van der Eb A J. Expression of class I major histocompatibility antigens switched off by highly oncogenic adenovirus 12 in transformed rat cells. 1983 *Nature*; 305: 771–775.

Sedman J, Stenlund A. The papillomavirus E1 protein forms a DNA-dependent hexameric complex with ATPase and DNA helicase activities. 1998 *J Virol*; 72 (8): 6893–6897.

Selinka H C, Florin L, Patel H D, Freitag K, Schmidtke M, Makarov V A, Sapp M. Inhibition of transfer to secondary receptors by heparan sulfate-binding drug or antibody induces non-infectious uptake of human papillomavirus. 2007 *J Virol*; 81: 10970–10980.

Shope R E, Hurst E W. Infectious papillomatosis of rabbits; with a note on the histopathology. 1933 *J Exp Med*; 58: 607–624.

Stenlund A. E1 initiator DNA binding specificity is unmasked by selective inhibition of non-specific DNA binding. 2003 *EMBO J*; 22 (4): 954–963.

Stewart S E. Leukemia in mice produced by a filterable agent present in AKR leukemic tissues with notes on a sarcoma produced by the same agent. 1953 *Anat Ver*; 117: 532.

Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, Breuer J, Leigh I M, Matlashewski G, Banks L. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. 1998 *Nature*; 393(6682):229-34.

Strauss M J, Shaw E W, Bunting H, Melnick J L. Crystalline virus-like particles from skin papillomas characterized by intranuclear inclusion bodies. 1949 *Proc Soc Exp Biol Med*; 72: 46–50.

Stubenrauch F, Hummel M, Iftner T, Laimins L A. The E8E2C protein, a negative regulator of viral transcription and replication, is required for extrachromosomal maintenance of human papillomavirus type 31 in keratinocytes. 2000 *J Virol*; 74 (3): 1178–1186.

Sweet B H, Hilleman M R. The vacuolating virus, S.V. 40. 1960 *Proc Soc Exp Biol Med*; 105: 420–427.

Syrjänen K J, Pyrhönen S, Syrjänen S M, Lamberg M A. Immunohistochemical demonstration of human papilloma virus (HPV) antigens in oral squamous cell lesions. 1983 *Br J Oral Surg*; 21: 147–153.

Thierry F. Transcriptional regulation of the papillomavirus oncogenes by cellular and viral transcription factors in cervical carcinoma. 2009 *Virology*; 384(2):375-9.

Vajdic C M, McDonald S P, McCredie M R, van Leeuwen M T, Stewart J H, Law M, Chapman J R, Webster A C, Kaldor J M, Grulich A E. Cancer incidence before and after kidney

transplantation. 2006 JAMA; 296: 2823–2831.

Van den Elsen P, Houweling A, Van der Eb A. Expression of region E1b of human adenoviruses in the absence of region E1a is not sufficient for complete transformation. 1983 Virology; 128: 377–390.

Volpers C, Unckell F, Schirmacher P, Streeck R E, Sapp M. Binding and internalization of human papillomavirus type 33 virus-like particles by eukaryotic cells. 1995 J Virol; 69 (6): 3258–3264.

Vonka V, Kanka J, Jelinek J, Subrt I, Suchanek A, Havrankova A, Vachal M, Hirsch I, Domorazkova A, Zavadova H, et al. Prospective study on the relationship between cervical neoplasia and herpes simplex type-2 virus. I. Epidemiological characteristics. 1984 Int J Cancer; 33: 49–60.

Vousden K H, Jat P S. Functional similarity between HPV16E7, SV40 large T and adenovirus E1a proteins. 1989 Oncogene; 4(2): 153–158.

Walter G, Ruediger R, Slaughter C, Mumby M. Association of protein phosphatase 2A with polyoma virus medium tumor antigen. 1990 Proc Natl Acad Sci USA; 87: 2521–2525.

Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. 2001 Genes Dev; 15 (22): 2922–2933.

Weinberger P M, Yu Z, Haffty B G, Kowalski D, Harigopal M, Brandsma J, Sasakji C, Joe J, Camp R L, Rimm D L, Psyrri A. Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus-associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. 2006 J Clin Oncol; 24: 736–747.

Werness B A, Levine A J, Howley P M. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. 1990 Science; 248: 76–79.

Wheeler C M. Natural history of human papillomavirus infections, cytologic and histologic abnormalities and cancer. 2008 Obstet Gynecol Clin North Am; 35:519-36.

Whyte P, Buchkovich K J, Horowitz J M, Friend S H, Raybuck M, Weinberg R A, Harlow E. Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. 1988 Nature; 334: 124–129.

Woodman C B J, Collins S I, Young L S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. 2007 Nature Reviews Cancer; (7): 11-22,

Yabe Y, Okamoto T, Omori S, Tanioku K. Virus particles in epidermodysplasia verruciformis with carcinoma. 1969 Dermatologica; 139: 161–164.

Yang R, Day P M, Yutzy W H, Lin K Y, Hung C F, Roden R B. Cell surfacebinding motifs of L2 that facilitate papillomavirus infection. 2003 J Virol 77 (6): 3531–3541.

You J, Croyle J L, Nishimura A, Ozato K, Howley P M. Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. 2004 Cell; 117 (3): 349–360.

Yugawa T, Kiyono T. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. 2009 Rev Med Virol; 19(2): 97-113.

Zachow R K, Ostrow R S, Bender M, Watts S, Okagaki T, Pass F, Faras R J. Detection of human papillomavirus DNA in anogenital neoplasias. 1982 Nature; 300: 771–773.

zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. 2002 Nature reviews ; 2: 342-350.

zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers — a brief historical account. 2009 Virology; 384: 260–265.

zur Hausen H. Discurso de agradecimento, Prêmio Nobel – 2008 Official web site of Nobel Foundation – http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2008/hausen-lecture.html

zur Hausen H. Human papilloma viruses and their possible role in squamous cell carcinomas. Curr. Top. 1977; Microbiol Immunol; 78: 1–30.

Capítulo III Relatos Científicos Submetidos à Publicação

Papilomavírus Humano

Aspectos Históricos – Revisão Bibliográfica

Aurelino Cândido ¹; Chirleanny Mendes ¹; Danyelly Bruneska ^{1,2} José Luiz Lima Filho ^{1,2}

¹ Grupo de Prospecção Molecular e Bioinformática (ProspecMol), Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE 50670-901, Brazil; ² Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE 50670-901, Brazil

Author's address:

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA)

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) - Av. Prof. Moraes Rego, S/N

Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil - CEP: 50670-901

Phone: + 55 81 2126 8484 - Fax: + 55 81 2126 8485

e-mail: joseluiz60@me.com

Keywords: Human Papillomavirus, HPV, Hystory.

Resumo

Há aproximadamente 35 anos foi postulada a participação do papilomavírus humano (HPV) no câncer cervical. Atualmente, o papel desta família heterogênea de vírus na carcinogênese está bem estabelecido, não apenas no carcinoma cervical, como também em uma substancial quantidade dos outros cânceres anogenitais e digestivos. Além disto, tipos específicos de HPV têm sido relacionados com determinadas neoplasias cutâneas. Em mulheres, a nível mundial, as infecções por HPV estão presentes em mais de 50% das neoplasias ligadas às infecções, em homens, isto ocorre em apenas 5% dos casos. A identificação e caracterização do papilomavírus humano tipos 16 e 18, assim como a demonstração de sua participação no desenvolvimento do câncer cervical com a descrição de diversos mecanismos envolvidos valeram ao Dr. Harald zur Hausen o prêmio Nobel em medicina e fisiologia no ano de 2008. O presente relato revisa aspectos históricos do conhecimento sobre a infecção pelo papilomavírus humano.

Abstract

The first report that associated the human papillomavirus (HPV) in the cervical cancer was published approximately 35 years ago. The role of this heterogeneous virus family in the oncogenesis is well established, not only in the cervical cancer, but also in other skin and mucosal cancers. For the women, the HPV infections are detected at least in 50% of the infectious cancers, worldwide. For the men, it has been reported in only 5% . The identification and characterization of the human papillomavirus 16 and 18 and the demonstration of the role in cervical cancer oncogenesis were well described by Harald zur Hausen (Nobel Prize of Medicine and Physiology, 2008). This paper reports the historical aspects of the human papillomavirus infections.

Introdução

Os papilomavirus compõem um grupo de pequenos vírus de DNA que pertencem à família *Papillomaviridae*, dos gêneros *Alpha*, *Beta* e *Gama-papillomavirus*. Estes vírus são epiteliotróficos e infectam homens e animais, causando uma grande variedade de lesões proliferativas (Bernard, 1994). Os papillomavirus são espécie-específicos, e não existem relatos de que um tipo de papillomavirus cause infecção em mais de uma espécie (IARC, 1995). Até o momento, cerca de 200 tipos de HPV foram descritos, sendo que em torno de 100 tipos foram isolados e tiveram suas sequências genômicas completamente identificadas (Bernard, 1994). A infecção pelo HPV é a doença sexualmente transmissível (DST) mais prevalente no mundo, nos Estados Unidos, estima-se que 20 milhões de pessoas estejam infectadas, com uma incidência de novos casos de 6,2 milhões a cada ano (Zur Hausen, 2009).

Neoplasias de origem viral

As primeiras evidências sobre a possibilidade de transmissão de lesões neoplásicas foram descritas por Ellerman em 1908, descrevendo a transmissão de leucemia aviária. Em 1911, Rous descreveu a transmissibilidade do sarcoma aviário. Entretanto, estas observações não receberam a devida atenção pelo meio científico, devido a ausência de comprovação dos fatores etiológicos. Somente após a identificação e demonstração experimental da transmissão de tumores murinos de origem viral nos anos 50 foi dado o devido valor para aquelas observações há tempos descritas, tendo valido o reconhecimento pelo Premio Nobel de 1966 ao pesquisador Peyton Rous, aproximadamente 50 anos após suas descobertas (Howley & Livingston, 2009).

A partir dos anos 30, começaram a ser demonstrados tumores transmissíveis em mamíferos. Shope descreveu a transmissão de tumores fibromatosos em coelhos através da injeção de extratos livres de células, atualmente reconhecidos como devido à presença de vírus *pox*. Em alguns casos, estas lesões papilomatosas evoluíram para carcinomas de células escamosas em coelhos infectados (Rous & Beard, 1935; Shope & Hurst, 1933).

Posteriormente, com a identificação e descrição experimental da transmissibilidade da leucemia murínica e dos vírus polyoma em camundongos foi reconhecida a real participação dos vírus na transmissão de algumas neoplasias, nascendo assim o campo de estudos da Oncologia Viral (zur Hausen, 2009).

Estes achados permitiram o desenho e a elaboração de estudos controlados de transmissão viral de neoplasias. Atualmente, é reconhecido que entre 15 a 20% das neoplasias humanas podem ser diretamente associadas à presença de determinados vírus (Howley & Livingston, 2009). Destacam-se por sua maior incidência entre as neoplasias virais causadoras de neoplasias os vírus de DNA. Podem ser reconhecidos por suas características genéticas dois grupos: o dos pequenos tumor-vírus-DNA, que incluem os polyomavirus, os adenovírus e os papilomavirus, e um segundo grupo com outros vírus DNA, que incluem os herpesvírus (Vírus Epstein–Barr e o Herpesvírus do Sarcoma Kaposi) e o hepadnavírus (Hepatite B vírus).

De fato, a maioria dos importantes desenvolvimentos na Biologia Molecular deriva diretamente dos estudos envolvendo a Oncologia Viral (Howley & Livingston, 2009), como por exemplo, a descoberta da transcriptase reversa durante o estudo de vírus RNA. Outra importante descoberta relacionada ao estudo dos vírus tumorais envolve a elucidação dos mecanismos de inibição dos genes supressores tumorais pRB e p53, inicialmente demonstrados por Lane e Crawford (1979), e também por Linzer e Levine, que em 1979 demonstraram a coligação entre a proteína T do vírus SV40. Foi demonstrado também que a proteína de 55 kDa codificada pelo gene E1B do adenovírus (Sarnow et al., 1982) assim como as proteínas E6 do HPV comprometem a função do p53 (Werness et al., 1990). Estes mecanismos são considerados como elementos chave na atividade das oncoproteínas e na inibição dos genes supressores de crescimento tumoral.

Elementos que elucidam a transformação celular durante a oncogênese também foram originados em experimentos com vírus oncogênicos. A demonstração que certos elementos cooperam entre si na produção de um fenótipo transformado, como a interação entre as proteínas E1A e E1B (Van den Elsen et al., 1983) serviram como base para o entendimento da interação entre os oncogenes celulares *myc* e *ras* (Land et al., 1983). De mesma forma estudos com vírus permitiram o conhecimento dos mecanismos de modulação do complexo de histocompatibilidade por genes virais oncogênicos, informando que uma supressão do sistema imune do hospedeiro é necessária para que a gênese tumoral possa ocorrer (Schrier et al., 1983; Kovesdi et al., 1986).

O estudo dos mecanismos envolvidos com a interação entre as proteínas de vírus oncogênicos e o hospedeiro celular permitiram inclusive o entendimento dos eventos metabólicos durante a degradação proteica *in vivo* e a via da ubiquitina, derivando diretamente do estudo das proteínas do HPV. Estudos com a proteína E6 permitiram a descoberta do p53 como o primeiro substrato identificado do sistema de degradação dependente da ubiquitina (Scheffner et al., 1990) e a caracterização da E6AP como a primeira proteína-ligase para ubiquitina-E3 (Scheffner et al., 1993). Estudos subsequentes com adenovírus identificaram a proteólise mediada pela ubiquitina como um importante processo regulatório durante a oncogênese (Querido et al., 1997).

Papilomatoses

A documentação histórica sobre relatos relacionados às manifestações patológicas da infecção pelo HPV nos remete inicialmente ao período greco-romano. Desde então, já se relacionavam às lesões anogenitais a uma provável transmissão sexual.

Rigoni-Stern (1842), um médico italiano, relatou seus achados tanatoscópicos em relação às mortes ocorridas em mulheres na cidade de Verona, entre o período de 1760 a 1839. Ele observou atentamente que havia uma maior frequência de câncer cervical entre mulheres de vida sexualmente ativa, como senhoras casadas, prostitutas e concubinas, ao contrário das baixas incidências encontradas entre mulheres virgens, como religiosas e celibatárias. Isto o levou à conclusão que estas lesões eram de natureza sexualmente transmissível.

A primeira demonstração de transmissão de lesões condilomatosas resultante da inoculação de extratos livres de células foi feito por Ciuffo, na Itália em 1907, comprovando claramente a transmissibilidade destas lesões e ainda demonstrando que ela ocorreria em material livre de células.

Alguns anos depois, foi descoberta a natureza infecciosa dos condilomas genitais e das papilomatoses laringeais. A microscopia eletrônica foi capaz de demonstrar a presença de partículas virais nestes extratos infectantes (Strauss et al., 1949). Apesar da demonstração mais antiga do potencial carcinogênico de lesões papilomatosas em animais (Rous & Beard, 1934; Rous & Kidd, 1938; Rous & Friedewald, 1944), foi inicialmente atribuída ao *Herpes simplex* tipo 2 o papel oncogênico em neoplasias de colo uterino (Rawls et al., 1968; Naib et al., 1969; Nahmias et al., 1970). Contudo, estudos mais aprofundados, em mais larga escala

demonstraram-se incapazes de confirmar os achados iniciais da presença do herpes vírus nestas lesões (Vonka et al. 1984).

As papilomatoses como precursoras das lesões neoplásicas do colo uterino:

No início da década de setenta foram iniciados experimentos com a intenção de avaliar a participação dos papilomavirus no surgimento de lesões tumorais. Estes estudos baseavam-se em relatos de transformação tumoral de condilomas anogenitais (condylomata acuminata) em carcinomas epidermóides (zur Hausen, 1977). Foi identificado um tipo até então ainda não descrito de HPV em condilomas genitais, o HPV 6 (Gissmann and zur Hausen, 1980; de Villiers et al., 1981), e um outro em papilomas laringeais, o HPV 11 (Gissmann et al. 1983). Meisels e Fortin (1976) encontraram transformações celulares displásticas em esfregaços colpocitológicos que denominaram de células coloidocíticas, postulando que o surgimento destas células seria a etapa precursora para o surgimento de células neoplásicas. Esta teoria foi comprovada com a demonstração de partículas virais internalizadas nas células coloidocíticas por Della Torre (1978) e Hills & Laverty (1979).

Foram também identificadas partículas virais em lesões condilomatosas gigantes, conhecidas como tumores de Buschke-Löwenstein (Gissmann et al. 1982; Zachow, 1982). Utilizando técnicas de hibridização com o DNA do HPV 11, Gissmann (1983) conseguiu isolar amostras deste DNA em algumas biópsias de carcinoma cervical. Posteriormente, também usando o HPV 11 DNA como sonda foi conseguido o isolamento de novos tipos de HPV, identificando o HPV 16 e o HPV 18, tanto em amostras obtidas de biópsias de cânceres cervicais, quanto em culturas de células com linhagens originadas em carcinomas epidermóides (Dürst et al., 1983; Boshart et al., 1984). Contemporaneamente, foi possível demonstrar a presença do HPV 16 em lesões pré-tumorais anorretais, conhecidas então como papulose Bowenóide (Ikenberg et al., 1983), e que graças a estes achados são atualmente consideradas como neoplasias intraepiteliais denominadas tumores de Bowen. Imediatamente após, foram também identificadas partículas tumorais de HPV 16 em carcinomas intraepiteliais de colo uterino (Crum et al. 1984).

Carcinomas anogenitais

Lesões verrucóides papilomatosas podem ocorrer na pele e mucosa da região anogenital, atingindo em maior frequência a vulva e a região perianal. Grande parte destas lesões podem persistir de forma crônica, e em sua maioria, foi demonstrada a presença de HPV tipos 6 e 11 desde os anos oitenta (Gissmann et al., 1982; Zachow et al., 1982; Boshart and zur Hausen, 1986). Em período subsequente, foi possível a demonstração da presença de HPV 16 em lesões papilomatóides de Bowen, que na época eram consideradas lesões pré-cancerosas que ocorrem mais frequentemente em região perianal e vulvar (Ikenberg et al 1983). Mais recentemente, foi demonstrada a presença do HPV 16 entre 30 e 50% dos carcinomas epidermóides de pênis (Lont et al., 2006). De mesma forma, também foi comprovada a presença do HPV 16 em neoplasias epidermóides de vulva e vagina em 50% dos casos (Madsen et al., 2008).

Apesar de apresentar uma baixa taxa de incidência anual, entre 0.1 e 2.1 por 100.000 habitantes, as neoplasias anogenitais tem uma importante relevância, considerando-se seus impactos clínicos em uma grande população (Zur Hausen, 2009). Comportamentos de risco, como promiscuidade e homossexualismo masculino podem aumentar probabilidade de se adquirir estas patologias (Daling et al., 1987).

Carcinomas orofaringeais

A conversão maligna de lesões papilomatosas orofaringeais em carcinomas têm sido descritas desde meados dos anos 40 do século 20, embora nestes tempos ainda não houvessem sido estabelecidas relações com infecções virais (zur Hausen 1977). Contudo, em 1983, surgiram relatos da identificação da presença de HPV em lesões hiperplásicas e condilomatóides orofaringeais (Syrjänen, 1983). Estes achados permitiram concluir que poderia haver a participação do HPV no surgimento de lesões malignas nestas regiões. Os primeiros relatos da identificação de determinados tipos de HPV em carcinomas orofaringeais surgiram logo posteriormente (Löning et al., 1985). Relatos que se seguiram confirmaram estes achados, com uma taxa de identificação variando entre 25 e 60% dos casos (Weinberger et al., 2006; Syrri and DiMaio, 2008; Gillison et al., 2008).

Carcinomas dérmicos

Os primeiros relatos científicos a correlacionar lesões verrucóides papilomatosas de pele e neoplasias remontam aos anos 20 do século passado. Nesta época, Lewandowsky e Lutz descreveram o surgimento de carcinomas de pele em pacientes portadores de epidermodisplasia verrucóide, a partir de lesões verrucóides papilomatosas expostas a uma grande incidência de radiações solares (Lewandowsky & Lutz, 1922). Aproximadamente 40 anos após, surgiram relatos da identificação de HPV em lesões papilomatosas benignas de pele (Ruiter & Van Mullem, 1970; Yabe et al., 1969). Relatos anteriores já haviam demonstrado o caráter infeccioso e transmissível das lesões papilomatosas verrucóides de pele por inoculação de extratos livres de células (Lutz, 1946). Posteriormente, surgiram relatos científicos demonstrando a presença de HPV tipos 5, 8, 12, 14, 17 e 20 em carcinomas epidermóides de pele (Orth, 1986), em especial, naqueles surgidos a partir de lesões condilomatosas em pacientes portadores de epidermodisplasia verrucóide, cujo caráter hereditário foi comprovado em estudos genéticos que identificaram uma mutação com inativação dos genes *EVER1/TMC6* e *EVER2/TMC8* (Orth, 2008).

Considerações finais

Várias publicações durante este período de descobertas da participação das lesões inflamatórias papilomatosas causadas pelo vírus HPV no surgimento de lesões cervicais, anogenitais, orofaríngeais e dérmicas, atribuíram a participação destes vírus na oncogênese de diversos outros cânceres. Neoplasias de esôfago, próstata, bexiga, pulmão, entre outros foram implicadas. Contudo, estudos mais aprofundados não conseguiram demonstrar uma presença persistente dos papilomavírus nestas lesões (zur Hausen, 2009). Entretanto, o recente relato do isolamento de um outro vírus pequeno de DNA, muito semelhante ao HPV, o polyoma vírus, no câncer de Merkel (Feng et al., 2008), e a observação que outras neoplasias aumentam em incidência em pacientes submetidos a prolongados períodos de imunossupressão, tal como ocorre em outras neoplasias de origem inflamatória (Vajdic et al., 2006), sugerem que a pesquisa de mecanismos oncogênicos de origem viral nestas e em outras neoplasias ainda podem permitir a elucidação de inúmeros fatos ainda não conhecidos, “nos causando verdadeiras surpresas” (zur Hausen, no discurso de agradecimento do Prêmio Nobel, 2008).

Referências

Bernard C, Mouglin C, Laurent R, Lab M. Oncogene activation: an informative marker for the human papillomavirus-lesions severity. 1994 *Cancer Detect Prev*;18(4):273-82.

Boshart M, Gissman L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. 1984 *EMBO J*; 3: 1151–1157.

Ciuffo G. Innesto positive con filtrato di verruca volgare. 1907 *Giornale Ital Mal Ven Pelle*; 48: 12–17.

Crum C P, Ikenberg H, Richart R M, Gissmann L. Human papillomavirus type 16 and early cervical neoplasia. 1984 *N Engl J Med*; 310: 880–883.

Daling J R, Weiss N S, Hislop T G, Maden C, Coates R J, Sherman, K J, Ashley RL, Beagrie M, Ryan J A, Corey L. Sexual practices, sexually transmitted diseases, and the incidence of anal cancer. 1987 *N Engl J Med*; 317: 973–977.

Della Torre G, Pilotti S, de Palo G, Rilke F. Viral particles in cervical condylomatous lesions. 1978 *Tumori*; 64: 549–553.

Durst M, Gissmann L, Idenburg H, zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. 1983 *Proc Natl Acad Sci USA*; 80: 3812–3815.

Ellermann V, Bang O. Experimentelle leukämie bei hühnern. 1908 *Zentralbl Bakteriöl*; 46: 595–609.

Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore P S. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. 2008 *Science*; 319: 1096–1100.

Gillison M L, D'Souza G, Westra W, Sugar E, Xiao W, Begum S, Viscidi R. Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. 2008 *J Natl Cancer Inst*; 100: 407–420.

Gissmann M L, Diehl V, Schultz-Coulon H, zur Hausen H. Molecular cloning and characterization of human papilloma virus DNA derived from a laryngeal papilloma. 1982 *J Virol*; 44: 393–400.

Gissmann M L, Wolnik L, Ikenberg H, Koldovsky U, Schnürch H G, zur Hausen H. Human papillomavirus type 6 and 11 sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. 1983 *Proc Nat Acad Sci USA*; 80: 560–563.

Gissmann M L, zur Hausen H. Partial characterization of viral DNA from human genital warts (condylomata acuminata). 1980 *Int J Cancer*; 25: 605–609.

Hills E, Lavery C R. Electron microscope detection of papilloma virus particles in routine

cervical smear. 1979 *Acta Cytol*; 23: 53–56.

Ikenberg H, Gissmann L, Gross G, Grussendorf-Conen E-I, zur Hausen H. Human papillomavirus type 16 related DNA in genital Bowen's disease and in Bowenoid papulosis. 1983 *Int J Cancer*; 32: 563–564.

Kovesdi I, Reichel R, Nevins J R. Identification of a cellular transcription factor involved in E1A trans-activation. 1986 *Cell*; 45: 219–228.

Land H, Parada L F, Weinberg R A. Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. 1983 *Natur*; 304: 596–602.

Lewandowsky F, LutzW.. Ein Fall einer bisher nicht beschriebenen Hauterkrankung (Epidermodysplasia verruciformis). 1922 *Arch Dermatol Syph* 141: 193–203.

Löning T, Ikenberg H, Becker J, Gissmann L, Hoepfer I, zur Hausen H. Analysis of oral papillomas, leukoplakias, and invasive carcinomas for human papillomavirus type related DNA. *J. Invest. Dermatol*; 84: 417–420

Lont AP, Kroon BK, Horenblas S, Gallee M P, Berkho J, Meijer C J, Snijders P J. Presence of high-risk human papillomavirus DNA in penile carcinoma predicts favorable outcome in survival. *Int. J Cancer* ;119: 1078–1081.

LutzW. A propos de l'epidermodysplasie verruciforme. 1946 *Dermatologica*; 92: 30–43.

Madsen BS, Jensen H L, van den Brule A J, Wohlfahrt J, Frisch M. Risk factors for invasive squamous cell carcinoma of the vulva and vagina — population-based case-control study in Denmark. 2008 *Int J Cancer*; 122: 2827–2834.

Meisels A, Fortin R. Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytologic patterns. 1976 *Acta Cytol*; 20: 505–509.

Nahmias A J, Josey W E, Naib Z M, Luce C F, Guest B A. Antibodies to Herpesvirus hominis types 1 and 2 in humans. II. Women with cervical cancer. 1970 *Am J Epidemiol*; 91: 547–552.

Naib Z M, Nahmias A J, Josey W E, Kramer J H. Genital herpetic infections. Association with cervical dysplasia and carcinoma. 1969 *Cancer*; 23: 940–945.

Orth G. Epidermodysplasia verruciformis: a model for understanding the oncogenicity of human papillomaviruses. 1986 *Ciba Found Symp*; 120: 157–174.

Orth G. Host defenses against human papillomaviruses: lessons from epidermodysplasia verruciformis. 2008 *Curr Top Microbiol Immunol*; 321: 59–83.

Psyrrri A, DiMaio D. Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer. 2008 *Nature Clin Pract Oncol*; 5: 24–31.

Querido E, Marcellus R C, Lai A, Charbonneau R, Teodoro J G, Ketner G, Branton PE. Regulation of p53 levels by the E1B 55-kilodalton protein and E4orf6 in adenovirus-infected

cells. 1997 J Virol; 71: 3788–3798.

Rawls W E, Tompkins W A, Figueroa M E, Melnick J L. Herpesvirus type 2: association with cancer of the cervix. 1968 Science; 161: 1255–1256.

Rigoni-Stern D. Fatti statistici relative alle malattie cancerose che servirono de base alla poche cose dette dal dott. 1842 Giornale service propr pathol terap ser; 2: 507–517.

Rous P, Beard JW. Carcinomatous changes in virus-induced papillomas of rabbits. 1934 Proc Soc Exp Biol Med; 32: 578–580.

Rous P, Kidd JG. The carcinogenic effect of a papillomavirus on the tarred skin of rabbits. I. Description of the phenomenon. 1938 J Exp Med; 67: 399–422.

Rous P. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. 1911 J Exp Med; 13: 397–411.

Rous, P., Friedewald, W.F., 1944. The effect of chemical carcinogens on virus-induced rabbit papillomas. J. Exp. Med. 79, 511–537.

Ruiter M, Van Mullem P J. Behaviour of virus in malignant degeneration of skin lesions in epidermodysplasia verruciformis. 1970 J Invest Dermatol; 54: 324–331.

Sarnow P, Ho Y S, Williams J, Levine A J. Adenovirus E1b-58 kD tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 kD cellular protein in transformed cells. 1982 Cell; 28: 387–394.

Scheffner M, Huibregtse J M, Vierstra R D, Howley P M. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. 1993 Cell; 75: 495–505.

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. 1990 Cell; 63: 1129–1136.

Schrier P I, Bernards R, Vaessen, R T, Houweling A, van der Eb A J. Expression of class I major histocompatibility antigens switched off by highly oncogenic adenovirus 12 in transformed rat cells. 1983 Nature; 305: 771–775.

Shope R E, Hurst E W. Infectious papillomatosis of rabbits; with a note on the histopathology. 1933 J Exp Med; 58: 607–624.

Strauss M J, Shaw E W, Bunting H, Melnick J L. Crystalline virus-like particles from skin papillomas characterized by intranuclear inclusion bodies. 1949 Proc Soc Exp Biol Med; 72: 46–50.

Syrjänen K J, Pyrhönen S, Syrjänen S M, Lamberg M A. Immunohistochemical demonstration of human papilloma virus (HPV) antigens in oral squamous cell lesions. 1983 Br J Oral Surg; 21: 147–153.

Vajdic C M, McDonald S P, McCredie M R, van Leeuwen M T, Stewart J H, Law M, Chapman J R, Webster A C, Kaldor J M, Grulich A E. Cancer incidence before and after kidney transplantation. 2006 JAMA; 296: 2823–2831.

Van den Elsen P, Houweling A, Van der Eb A. Expression of region E1b of human adenoviruses in the absence of region E1a is not sufficient for complete transformation. 1983 Virology; 128: 377–390.

Vonka V, Kanka J, Jelinek J, Subrt I, Suchanek A, Havrankova A, Vachal M, Hirsch I, Domorazkova A, Zavadova H, et al. Prospective study on the relationship between cervical neoplasia and herpes simplex type-2 virus. I. Epidemiological characteristics. 1984 Int J Cancer; 33: 49–60.

Weinberger P M, Yu Z, Haffty B G, Kowalski D, Harigopal M, Brandsma J, Sasakji C, Joe J, Camp R L, Rimm D L, Psyrr A. Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus-associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. 2006 J Clin Oncol; 24: 736–747.

Werness B A, Levine A J, Howley P M. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. 1990 Science; 248: 76–79.

Yabe Y, Okamoto T, Omori S, Tanioku K. Virus particles in epidermodysplasia verruciformis with carcinoma. 1969 Dermatologica; 139: 161–164.

Yugawa T, Kiyono T. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. 2009 Rev Med Virol; 19(2): 97–113.

Zachow R K, Ostrow R S, Bender M, Watts S, Okagaki T, Pass F, Faras R J. Detection of human papillomavirus DNA in anogenital neoplasias. 1982 Nature; 300: 771–773.

zur Hausen H. Human papilloma viruses and their possible role in squamous cell carcinomas. Curr. Top. 1977; Microbiol Immunol; 78: 1–30.

zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers — a brief historical account. 2009 Virology; 384: 260–265.

PAPILOMA VIRUS HUMANO – ATUALIZAÇÃO DE SUA BIOLOGIA

Aurelino Cândido¹; Chirleanny Mendes¹; Danyelly Bruneska^{1,2} José Luiz Lima Filho^{1,2}

¹ Grupo de Prospecção Molecular e Bioinformática (ProspecMol), Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE 50670-901, Brazil; ² Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE 50670-901, Brazil

Author's address:

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) - Av. Prof. Moraes Rego, S/N
Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil - CEP: 50670-901
Phone: + 55 81 2126 8484 - Fax: + 55 81 2126 8485
e-mail: joseluiz60@me.com

Keywords: Human Papillomavirus, HPV, Biology review

Resumo

Durante os últimos 40 anos tem se demonstrado a participação do papilomavirus humano (HPV) no câncer cervical. Atualmente, o papel desta família heterogênea de vírus na carcinogênese está bem estabelecido, não apenas no carcinoma cervical, como também em uma substancial quantidade dos outros cânceres anogenitais e digestivos. Além disto, tipos específicos de HPV têm sido relacionados com determinadas neoplasias cutâneas. Em mulheres, a nível mundial, as infecções por HPV estão presentes em mais de 50% das neoplasias ligadas às infecções, em homens, isto ocorre em apenas 5% dos casos. A identificação e caracterização do papilomavirus humano tipos 16 e 18, assim como a demonstração de sua participação no desenvolvimento do câncer cervical com a descrição de diversos mecanismos envolvidos valeram ao Dr. Harald zur Hausen o prêmio Nobel em medicina e fisiologia no ano de 2008.

O presente relato revisa os aspectos biológicos envolvidos no processo de infecção pelo papilomavírus humano e sua participação no surgimento de neoplasias epidermóides.

Abstract

In the last 40 years it has been associated the human papillomavirus (HPV) infection in the cervical cancer. Actually, the role of this heterogeneous virus family in the oncogenesis is well established, not only in the cervical cancer, but also in other skin and mucosal cancers. For the women, the HPV infections are detected at least in 50% of the infectious cancers, worldwide. For the men, it has been reported in only 5%. The identification and characterization of the human papillomavirus 16 and 18 and the demonstration of the role in cervical cancer oncogenesis were well described by Harald zur Hausen (Nobel Prize of Medicine and Physiology, 2008). This paper reviews the biological aspects of the human papillomavirus infections and the development of epidermoid cancers.

Introdução

As infecções causadas por papilomavírus humanos (HPV) destacam-se por sua elevada frequência, implicações clínicas e interpessoais, além de serem relatadas como fatores ambientais comprovadamente relacionados à oncogenese.

A infecção pelo HPV é considerada uma doença sexualmente transmissível pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e sua prevalência é relatada entre 2% e 68% da população adulta, de acordo com o grupo estudado. Estima-se que a maioria das pessoas sexualmente ativas entrará em contato com o papilomavírus em algum momento de sua vida, estudos indicam que 10 a 20% da população adulta apresenta infecção pelo HPV. Estas infecções podem apresentar-se como quiescentes na maioria dos casos, ou como lesões dérmicas verrucosas, geralmente pequenas. Em alguns casos podem apresentar-se com lesões gigantes (tumor de Bursk-Levenstein), ou evoluir para neoplasias epidermóides (zur Hausen, 2009).

Atualmente consideram-se as infecções por HPV como agente etiológico essencial no desenvolvimento de neoplasias de colo uterino. O câncer cervical é a segunda causa mais importante de mortes em mulheres, depois do câncer de mama. Cerca de 500.000 novos casos são anualmente diagnosticados em mulheres entre 25 a mais de 40 anos. O DNA-HPV foi identificado na grande maioria dos casos de colo uterino (Walboomers et al., 1999), pacientes com infecções prolongadas possuem maior probabilidade de desenvolver neoplasias (Muñoz et al., 2003). Mais de 40 subtipos de HPV foram identificados como oncogênicos para a espécie humana, sendo classificados de acordo com a probabilidade de causar neoplasia em baixo, médio e alto risco (Kjaer et al., 2001).

A infecção pelo HPV tem sido correlacionada também com o câncer de anus, estima-se que aproximadamente 85% dos casos de câncer de anus estejam correlacionados com infecção pelo HPV (Palesfsky, 1998), da mesma forma, cerca de 35 a 50% dos casos de cânceres de vulva, vagina e pênis tem sido atribuídos a infecção pelo HPV, assim como 20% dos casos de câncer de orofaringe e 10% dos casos de neoplasias de laringe, trato respiratório e digestivo (Zur Hausen, 2009).

Os mecanismos genéticos envolvidos na iniciação e progressão do câncer não são completamente conhecidos. Os processos relativos às alterações que podem ocorrer na

cromatina durante a transformação celular e na eventual interação com agentes ambientais também apresentam aspectos obscuros. Para elucidação destes mecanismos, o uso de modelos experimentais favorece abordagens múltiplas, sendo mais atraentes aqueles que possibilitem contribuições para controle de enfermidades associadas.

Estrutura viral

O HPV é formado por um genoma de DNA circular em fita dupla, com 7.200 a 8.000 pares de bases. Este material genético encontra-se envolto por um capsídeo protéico com um diâmetro de 50 nm, este capsídeo possui 72 subunidades icosaédricas denominadas de capsômeros, que são formados por duas diferentes proteínas, L1 e L2 (Modis et al., 2002; Conway, 2009). O capsídeo possui uma predominância de proteínas L1, em torno de 80% da proteína viral, elas são gênero-específicas e servem como medidor indireto da infectividade. A proteína L2 é tipo-específica, possuindo cerca de 70 kD, enquanto a L1 possui em torno de 55 kD (Chen, 2000; Sapp, 2009), vide figura 1.

Figura 1.

O pentâmero que forma a unidade repetitiva da estrutura supramolecular do capsídeo é formado por cinco unidades de proteína L1 e uma unidade de proteína L2 (figura 2).

Figura 2.

As proteínas L1 possuem dobramentos funcionais (“braços”) com propriedades hidrofóbicas que permitem uma adesão firme tanto entre unidades formadoras do capsômero, como em capsômeros adjacentes. Estudos estruturais com cristalização e criomicroscopia eletrônica (Chen et al., 2000; Modis et al., 2002) sugerem que os “braços” C-terminais invadem as estruturas vizinhas e por interações hidrofóbicas garantem a adesão interpentamérica (figura 3).

Figura 3.

Estudos estruturais e de espectrometria de massa demonstraram ainda que a formação de uma quarta hélice (h4) formadora do “braço” lateral permite a aproximação dos resíduos de cisteína cys-428 do pentâmero invasor com o resíduo cys-175 do pentâmero receptor, promovendo a formação de uma ponte de dissulfeto que estabiliza mais ainda a ultraestrutura do capsídeo viral (Modis et al., 2002). Baseando-se neste modelo, Carter (2003) demonstrou que a maioria dos anticorpos neutralizantes estão direcionados contra epitopos contidos nas alças C-terminais superficializadas.

As setenta e duas moléculas de proteína viral L2 que formam o capsídeo encontram-se centralizadas no capsômero pentaédrico, firmemente coesas graças a interações hidrofóbicas com as proteínas circundantes L1 (Buck et al., 2008). Estas propriedades estruturais promovem a internalização da maioria das alças protéicas, em especial do segmento N-terminal, tornando menos acessível à hidrólise e à ligação com anticorpos (Yang et al., 2003; Richards et al., 2006).

Interação com receptores celulares

Estudos estruturais demonstram que os capsídeos virais possuem a capacidade de interagir com receptores de membrana extremamente conservados evolutivamente e abundantes na superfície celular hospedeira. Esta adesão entre o capsídeo e a superfície celular ocorre primariamente graças à proteína L1 (Müller et al., 1995; Roden et al., 1994; Volpers et al., 1995). Posteriormente foi comprovado que esta adesão ocorre graças a uma grande afinidade entre a proteína L1 e os glicosaminoglicanos presentes nas proteínas dos receptores de superfície celular, esta afinidade se encontra especialmente relacionada à presença de heparan sulfato (Joyce et al., 1999).

De fato, a maioria dos receptores de superfície celular são formados por estruturas que contém proteoglicanos de heparan sulfato (HSPGs), podemos citar como exemplo: receptores para fatores de crescimento, lipoproteínas, bactérias e vírus (Bernfield et al., 1999). As duas principais famílias de receptores de superfície celular são sindecans e glipicans (Bernfield et al., 1992; Fransson, 2003). Na realidade, já foi comprovado que a maioria dos receptores ligantes para os VLP de HPV's não são específicos. Os sindecans-1 são os receptores mais abundantes na superfície celular de células epiteliais, e podem servir de receptores indistintamente tanto para VLP de HPV-11 e HPV-16 (Bernfield et al., 1992; Elenius et al., 1991; Gallo et al., 1994).

Estudos in vitro demonstram que os papilomavírus (PV) podem se ligar a elementos da matriz extracelular (ECM), estes elementos secretados pelos queratinócitos mediam a ligação viral à superfície celular, proteínas como a laminina 5 (LN5), assim como peptidoglicanos de heparan sulfato normalmente participam destas interações (Culp et al.,

2006a, 2006b; Selinka et al., 2007). Evidências recentes demonstram que a participação de um segundo receptor deve ser necessária para a internalização do PV.

Day et al (2008) demonstraram recentemente que o pré-tratamento de capsídeos com uma peptidase, a furina, pode promover a internalização celular destas partículas mesmo na ausência dos HSPGs. A figura seguinte demonstra um modelo de interações para a internalização do papilomavírus (Figura 4).

Figura 4.

Estrutura do DNA viral

O genoma do HPV consiste em um DNA circular de dupla fita com 7.200 a 8.000 bases, possui três regiões que codificam as proteínas virais (*Open Reading Frames*, ou *ORFs*). Este genoma possui três fragmentos subgênicos, uma região precoce (*Early*) que possui 45% do genoma, uma região tardia (*Late*) com 40% do genoma e uma outra região que contém elementos regulatórios da transcrição e da replicação viral, esta região é denominada NCR (non-coding region) ou LCR (long control region) representando 15% de todo o genoma (Figura 5).

Figura 5.

A região precoce possui seis genes, as proteínas que codificam possuem importantes funções na replicação (E1), na transcrição do DNA (E1 e E2) e na transformação celular (E5, E6 e E7) (zur Hausen, 2000) (ver tabela 2). A proteína E2 controla a transcrição de outros genes virais (E6 e E7), também possuindo atividade estimuladora da função supressora tumoral da proteína p53. A E2 também interage com a E1 facilitando sua ligação à origem da replicação (Chiang et al, 1992). A proteína E4 possui funções ligadas à diferenciação dos queratinócitos, sendo os mecanismos ainda não totalmente elucidados. Alguns autores relatam que esta proteína é responsável pela coilocitose, uma alteração da arquitetura celular que promove uma alteração terminal dos queratinócitos promovendo o rompimento celular facilitando a liberação das partículas virais (Doorbar et al., 1986; Roberts et al., 1997). A proteína E5 liga-se ao receptor mitogênico, estimulando o crescimento epidérmico (Pim et al. 1992). O gene E6 expressa uma proteína que tem a capacidade de degradar proteoliticamente a proteína supressora do crescimento tumoral p53, que resulta no descontrole do crescimento celular que pode permitir a imortalização dos queratinócitos (Storey, 1998). O gen E7 codifica a produção de uma fosfoproteína liga-se a um gene supressor de tumor pRB, esta ligação parece estar relacionada à indução da proliferação e imortalização celular, há indícios

de que esta habilidade de ligação E7-pRB está relacionada ao grau de oncogênese do tipo viral (Thierry, 2009).

Os genes da região de replicação tardia codificam a síntese das proteínas formadoras do capsídeo viral, L1 e L2. Estas sequências são altamente preservadas entre todos os tipos de papilomavírus humanos (Bernard et al, 1994). O gene L1 é o responsável pela codificação da proteína L1, a mais abundante no capsídeo, e possui epítomos tipo-específicos altamente imunogênicos, o gene L2 por sua vez, é o responsável pela codificação da proteína L2, também presente na estrutura do capsídeo, porém em menor número, como já descrito anteriormente. Estes genes tardios são expressos nas camadas superficiais do epitélio infectado.

Tabela 1.

Replicação

A replicação do papilomavírus humano ocorre exclusivamente em epitélio estratificado da pele ou em mucosas. Estes são tecidos complexos e constituídos de diversas linhagens celulares. A grande maioria das células epiteliais compõe-se de queratinócitos em diferentes estágios de maturação, correspondendo a cerca de 80% deste tecido. Outras linhagens celulares reunidas correspondem a 20% das células, e incluem melanócitos, células de Langerhans e de Merkel.

Entre os queratinócitos, dois tipos possuem a capacidade de divisão celular: células tronco de crescimento lento e células da camada basal. Estas células proliferativas são o alvo para o crescimento dos papilomavírus, onde estabelecem uma população celular infectada. Os papilomavírus desenvolveram mecanismos complexos que adaptam a célula hospedeira, promovendo a transcrição de seu próprio DNA, promovendo a síntese de proteínas virais, que regulam o metabolismo celular de forma a promover uma maior produção protéica de seu interesse e regulando o ciclo celular impedindo sua degeneração e morte (apoptose), promovendo a sua “imortalização”.

O entendimento dos mecanismos envolvidos na replicação viral baseiam-se principalmente em modelos experimentais da replicação do papilomavírus bovino tipo 1 (BPV-1) em culturas celulares de fibroblastos de camundongos (linhagem C 127). Sabendo-

se que os mecanismos de replicação viral são altamente conservados e podem ser perfeitamente extrapolados para o papilomavírus humano (Berg & Stenlund, 1997).

Logo após a internalização dos papilomavírus pela célula hospedeira, ocorre a entrada do seu DNA no núcleo celular, através dos transportadores próprios da célula hospedeira. Uma vez no núcleo celular, ocorre a ativação da região regulatória que inicia a transcrição das proteínas precoces, E1 e E2. Estas proteínas direcionam os fatores de replicação da célula hospedeira, desencadeando em cascata um aumento na síntese das proteínas virais precoces (Frattini and Laimins, 1994).

Experimentos *in vitro*, demonstram que a proteína E1 é responsável pelo estiramento do DNA viral, assim como a abertura da dupla hélice durante o processo de replicação (Sedman & Stenlund, 1998). Porém, também foi demonstrado que a replicação viral necessita da ligação conjunta das proteínas E1 e E2 na origem de replicação viral (Stenlund, 2003; Kurg et al., 2006).

O recrutamento das proteínas de replicação hospedeiras ainda não está completamente esclarecido. Foi demonstrada a interação da proteína E1 com a proteína de replicação A, com a topoisomerase e com a polimerase α -primase (Clower et al., 2006). Também é conhecido que a fosforilação pelo complexo ciclina E/Cdk2 e ciclina A/Cdk2 é necessário para a localização nuclear da proteína E1. A proteína E8, cujo domínio de atividade compreende 12 aminoácidos no HPV-31, é necessária para a formação de um complexo com a proteína E2, cuja atividade regulatória negativa é necessária para estabilização replicacional a longo termo (Stubenrauch et al., 2000; Lace et al., 2008).

Outra importante atividade da proteína E2 é garantir a equilibrada divisão do DNA parental para as células hospedeiras filhas durante o processo de divisão celular. Esta função é realizada através da fixação de moléculas de E2 em diversos pontos de fixação, conhecidos como elementos de manutenção minicromossomal (MME). A fixação das proteínas E2 garante a estabilização do DNA recombinado, resultante da incorporação do DNA viral ao DNA da célula hospedeira, durante o processo de divisão celular (Piirso et al., 1996; You et al., 2004).

Nos epitélios sadios, a divisão celular, e consequentemente a replicação de DNA ocorre apenas nas células basais. Uma vez que estas células se despreendem da camada basal, a divisão celular e a replicação do DNA é interrompida, e as células vão envelhecendo conforme se distanciam da camada basal em estratos cada vez mais superficiais. Por outro lado, as células infectadas pelo HPV subvertem os mecanismos normalmente inibitórios das

células hospedeiras, esta atividade é exercida pelas proteínas E6 e E7. Estas proteínas virais descontrolam os mecanismos inibidores das células hospedeiras nos pontos de controle regulados pelas famílias das ciclinas, das quinases dependentes da ciclina (cdks) e dos inibidores de quinases (Funk et al., 1997; Jones et al., 1997).

Estrutura e atividade biológica da proteína viral E6

Os genes que codificam as proteínas E6 estão presentes em todos os papilomavírus no início da ORF, logo após a região não-codificante (NCR). As proteínas E6 são compostas de aproximadamente 150 aminoácidos, contém duas alças CX₂C-X₂₉-CX₂C, unidas por um interdomínio de 36 aminoácidos. Estas alças são ladeadas por segmentos terminais amino (N) e carboxi (C) terminais de tamanhos variados (Cole & Danos, 1987). O modelo tridimensional da proteína E6 foi estudado através de cristalização e ressonância magnética nuclear (RMN), por Nomine (2006) e é apresentado na figura 6:

Figura 6.

Até o presente momento nenhuma atividade enzimática foi atribuída a proteína E6. Demonstrou-se que a atividade biológica desta proteína se deve a interações interprotéicas (Ristriani et al., 2001) (ver figura 7).

Figura 7.

A primeira interação metabólica descrita para a E6 foi com a proteína E6 associada (E6AP), uma ligase capaz de unir a E6 com a ubiquitina (Huibregtse et al., 1991). A via da ubiquitina direciona proteínas para a degradação proteossomal através da adição de diversos monômeros de ubiquitina à proteína destinada à hidrólise. A proteína E1 ativa os monômeros de ubiquitina que são posteriormente transferidos pela E2 a uma E3-ubiquitina ligase, que confere especificidade ao substrato para a degradação. (Hershko & Ciechanover, 1992). O substrato mais estudado do complexo E6/E6AP-ubiquitina é a proteína fator de repressão tumoral p53, a principal consequência desta inativação é a inibição da apoptose da célula infectada pelo HPV, tornando seu ciclo de vida bem maior ao normalmente alcançado por células sadias.

A via intrínseca da apoptose desencadeia a morte celular a partir de sinais intracelulares, como DNA danificado, estresse oxidativo, desnutrição intracelular, e estímulos por quimoterápicos (Kaufmann and Earnshaw, 2000; Wang, 2001). Estes estímulos ativam diversas vias metabólicas que convergem para as mitocôndrias. A mitocôndria por sua vez

recebe tanto estímulos pró como anti apoptóticos, quando esta o fiel desta “balança” metabólica pende para o lado da apoptose, ocorre ativação das proteínas pró-apoptóticas BH3, ocorre a formação de poros na membrana mitocondrial com o extravasamento de citocromo c, fator de indução de apoptose (AIF), endonuclease G, Smac/Diablo and Htr/Omi. Estas proteínas mitocondriais formam o “apoptossomo”, um complexo protéico que resultam na clivagem das proteínas citoplasmáticas caspase 3 e caspase 7, que se transformam nas caspases executoras, que clivam seus substratos poli-ADP-ribose, polimerase e laminina B, provocando a morte celular (vide figura 8).

Figura 8.

A via de apoptose extrínseca pode ser induzida durante a infecção viral como parte das respostas do hospedeiro, sendo ativada por sinais extracelulares que induzem a ativação de “receptores letais” na superfície celular. Estes receptores são representados principalmente pelos receptores do fator de necrose tumoral (TNFR). Esta família de receptores inclui o receptor para TNF 1 (TNFR-1), Fas/CD95, e os ligantes TNF-relacionados (TRAIL) DR-4 e DR-5. Uma vez ligados, os fatores recrutam moléculas adaptadoras dos iniciadores de caspase, como a caspase-8 e a caspase-10, formando complexos sinalizadores, que ativam as caspases 3 e 7, também resultando na morte celular (Figura 9).

Figura 9.

Relatos científicos demonstram que a proteína E6 bloqueia a apoptose ligando-se a proteína **Bak**, induzindo sua inativação através de sua degradação pela via da ubiquitina, provavelmente com a participação da proteína ligante E3. Embora o papel exato da proteína Bak ainda não esteja completamente elucidado, a sua integridade é necessária para o desencadeamento dos eventos envolvidos na apoptose. Também já foi demonstrado que a proteína E6 bloqueia diretamente a via extrínseca da apoptose por interação direta com as proteínas TNFR-1, FADD and caspase-8, também levando-as a um processo proteolítico (Filippova et al., 2002).

Estrutura e atividade biológica da proteína viral E7

As oncoproteínas E7 são compostas de aproximadamente 100 aminoácidos, a porção aminoterminal contém uma região similar à porção conservada CR1 e uma porção inteiramente similar à CR2 do adenovírus (Vousden and Jat, 1989). A presença de uma

sequência conservada Leu-X-Cys-X-Glu (LXCXE) na região CR2 é indispensável para a interação com a proteína de repressão tumoral do retinaoblastoma (pRB) na sua inativação (Munger et al., 1989). A porção C-terminal contém um domínio de zinco composto por dois motivos Cys-X-X-Cys (Barbosa et al., 1989) e pode funcionar como um sítio para dimerização, embora não existam comprovações *in vivo* que esta formação de dímeros de E7 ocorra.

A estrutura tridimensional da proteína E7 foi elucidada por ressonância magnética nuclear (NMR) e cristalografia por RX (Liu et al., 2006; Ohlenschlager et al., 2006), vide figura 10.

Figura 10.

Estudos recentes demonstraram que a proteína E7 é degradada por um mecanismo proteossomal que envolve a conjugação de sua porção amino terminal com a ubiquitina, com um tempo de meia vida de menos de duas horas (Reinstein et al., 2000). Até o presente, não foram demonstradas atividades enzimáticas para a proteína E7, atribuindo-se suas atividades biológicas graças às suas interações intermoleculares com outras proteínas e com o DNA, subvertendo mecanismos metabólicos celulares normais (figura 11).

Figura 11.

Ambos os genes das proteínas E6 e E7 são conservadamente integrados ao DNA celular, e são os únicos consistentemente expressados nos carcinomas cervicais. Entre as proteínas de origem viral, apenas o complexo E1/E2 possui atividade enzimática até então demonstrada, desta forma a presença ativa de proteínas celulares responsáveis pela replicação é necessária para a continuidade da replicação viral. Sabendo-se que as células epiteliais acima da camada basal evoluíram para um estágio não replicativo, espera-se que normalmente não ocorra síntese de DNA nestas células, então para que os vírus continuem a se replicar, é necessário que estes mecanismos inibitórios sejam subvertidos. Esta subversão dos mecanismos inibitórios da replicação do DNA se dá graças principalmente a atividade biológica da proteína E7 sobre a pRB, direcionando-a a proteólise pela via da ubiquitina (Collins et al., 2005) e por regulação da atividade transcripcional.

Regulação transcripcional

Uma das principais características do HPV é a sua capacidade de integrar seu próprio genoma ao da célula hospedeira. De fato, esta incorporação se dá de forma eficiente, com a

integração de até centenas de cópias. Contudo apenas um segmento de controle de replicação é integrado (LCR). Estes segmentos contêm promotores da região regulatória viral, P105 para o HPV-18 e P97 para o HPV-16 e o HPV-31. Está demonstrado que as proteínas E1 e E2 são as iniciadoras da integração e da transcrição, e possuem um efeito inibitório sobre a transcrição das proteínas E6 e E7, enquanto estas também possuem um efeito inibitório sobre a transcrição das proteínas E1 e E2. Desta forma ocorre um controle do tipo “feed-back” negativo entre elas (Thierry and Yaniv, 1987). A região controladora TATA encontra-se na região regulatória imediatamente anterior a P105, e parece recrutar os reguladores transcripcionais TFIID. Esta região promotora é estimulada pela presença de quatro proteínas E2 (Figura 12).

Figura 12.

Além de seus próprios promotores, o HPV também faz uso de reguladores transcripcional da célula hospedeira, como o **AP1** e o **SP1**. O regulador transcripcional SP1 participa da regulação de cerca de 30% dos genes das células epiteliais. Outros reguladores foram demonstrados, como GRE, NF1, YY1, Oct-1 e C/EBP.

Inativação dos supressores tumorais p53 e pRB

Ao entrar no núcleo celular, o HPV necessita transcrever uma porção de seu genoma, a região precoce. Esta região expressa produtos necessários para a replicação do DNA viral. Os produtos desta região genômica iniciam um ciclo de replicação celular, necessitando de toda a atividade enzimática celular que contribuem para a replicação do DNA (precursores, DNA-polimerases, ligases, etc). Os genes que codificam estas proteínas são regulados por diversos fatores de transcrição. O complexo E2F-DP promovem a expressão destes genes. Este complexo está ligado a três diferentes proteínas retinoblastoma (pRb) em células quiescentes, o que inibe a expressão dos genes necessários para a entrada na fase S. Normalmente as células recebem estímulos hormonais externos para a divisão, resultando na síntese de ciclina D, que se combina com as quinases dependentes da ciclina, as cdk-4/6. Estas quinases fosforilam as proteínas pRb com a liberação dos complexos E2F-DP, permitindo a síntese da ciclina E. A formação do complexo ciclina E-cdk2 completa a fosforilação das proteínas pRb e a completa expressão do complexo E2F-DP, permitindo a expressão dos genes necessários à entrada na fase S. A transcrição das ciclinas D e E ativam um “feedback” que promove um processo autocatalítico com entrada na fase S. Neste processo, a proteína p53 atua detectando sinais de estresse que possam induzir erros na duplicação destas células. Danos no DNA, hipóxia celular, choques térmicos, privação nutricional e ativação por oncogenes servem como desencadeadores da atividade da proteína p53. Quando ocorre ativação da proteína p53, ocorre sua modificação por metilação e fosforilação. Uma das atividades da p53 é regular a expressão do gene p21, produzindo uma proteína que se liga a ciclina D-cdk 4/6, inibindo a fosforilação da pRb e prevenindo a entrada na fase S. Em sua atividade máxima, a proteína p53 inicia uma cascata de eventos que culminam na apoptose, com a morte celular elimina-se o clone celular possivelmente contendo erros de replicação com um DNA defeituoso.

A replicação viral necessita forçar a célula a entrar na fase S e utilizar ao máximo os fatores de replicação celulares. Na maioria das vezes, isto se dá por inativação dos genes supressores pRb e pela liberação da transcrição permitindo a formação dos complexos E2F-DP. No caso do HPV, a proteína E7 se liga a pRb, permitindo a expressão e formação do complexo E2F-DP (Dyson et al., 1989). A inativação da pRb permite também a inativação da p53, a inibição em conjunto destes dois fatores de inibição permite a plena replicação do DNA, e mais importante ainda, subvertem os mecanismos normais de morte celular por

inibição tanto da via intrínseca, como da via extrínseca da apoptose, provocando um aumento substancial do tempo de vida celular, fenômeno conhecido como imortalização” celular.

Nas células de mamíferos, as proteínas p53 são mantidas em baixas concentrações graças ao controle das proteínas MDM-2 e MDM-X, que se ligam a p53 promovendo sua poliubiquitinação. A expressão das MDM's são reguladas positivamente pela p53, este mecanismo auto-regulado permite pequenas variações nas atividades destas proteínas (Wu et al., 1993). Sinais de estresse celular possuem efeito inibitório sobre as proteínas MDM, promovendo a liberação da p53 de seu controle negativo. No momento em que a pRb é inibida pela E7 e E2F, ocorre a regulação da proteína ARF que se liga à proteína MDM e diminui sua atividade (Levine et al., 2009).

O equilíbrio entre estes fatores permite a célula permanecer em estados quiescentes, contudo em casos de hiperexpressão de oncogenes inibidores de p53 e pRb ocorre o crescimento exacerbado destas linhagens celulares.

Interações com o sistema imune

As interações imunológicas entre o hospedeiro e o HPV possuem características especiais que dificultam seu estudo. O HPV possui extrema especificidade sobre a espécie humana, dificultando seu estudo em modelos animais e cultura de células.

A inoculação de vacinas contendo VLP's de proteínas do capsídeo de HPV's de alto risco, como HPV-16 e HPV-18 tem conferido uma imunidade duradora e forte o suficiente para prevenir infecções futuras, cumprindo satisfatoriamente o papel de vacinas profiláticas para as populações estudadas até 2007 (Kahn and Burk, 2007). Contudo, a imunidade conferida por uma primoinfecção natural não demonstra força ou persistência suficiente para prevenir novas infecções (Carter et al, 2000), muito menos se correlaciona com a detecção de HPV-DNA (Andersson et el, 2008). A participação de anticorpos não parece ser o mecanismo mais eficaz de combate natural à infecção pelo HPV, a descrição da síndrome de WHIN, onde existe a ausência dos receptores CXCR4, em que a mobilidade e o recrutamento dos neutrófilos estão comprometidos, parece indicar uma maior participação da imunidade celular no clearance das células infectadas pelo HPV (Gulino, 2003).

O componente mais imunogênico do HPV é a proteína L1, cujos títulos podem ser medidos por ELISA. In vivo, as infecções causadas por papilomavírus desencadeiam a produção de anticorpos que apresentam maior reatividade contra as proteínas L1 em sua

conformação pentamérica (Christensen et al., 1994). Contudo, em infecções naturais os títulos de anticorpos são baixos e sua detecção é difícil. Para os tipos mais estudados, HPV-6, 11, 16 e 18, o tempo de soroconversão médio é de seis meses, embora 30 a 50% dos pacientes parecem jamais adquirir imunidade contra qualquer partícula viral (Carter et al., 2000).

CLASSIFICAÇÃO

As variações nos genes das proteínas L1, E6 e E7 são determinantes na classificação dos novos tipos de HPV. A ICTV (International Council on the Taxonomy of Viruses) determina que variações maiores que 10% individualizam novos tipos de HPV, variações entre 2 e 10% permitem a classificação de subtipos, enquanto que variações menores que 2% são considerados variantes de um mesmo tipo de HPV (Bernard et al. 1994). Os tipos de HPV são identificados por números, de acordo com a ordem de descrição, desta forma o primeiro a ser descrito foi o HPV 1, o segundo foi o HPV 2, e assim por diante. Existem mais de 200 tipos de HPV descritos. Porém apenas cerca de 100 tipos possuem sua sequência genômica completamente descrita (de Villiers, 2004), Figura 13.

Figura 13.

POTENCIAL DE ONCOGÊNESE

Os HPV são classificados de acordo com a tendência em provocar a transformação para lesões malignas. São classificados com de baixo risco oncogênico, ocorrendo em lesões benignas e intraepiteliais, raramente em lesões cancerosas (tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e CP6108). O grupo de alto risco oncogênico ocorre em lesões de alto grau e especialmente nos carcinomas de colo uterino, anus e glândula (tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 68, 73, e 82), existem ainda tipos de provável alto risco oncogênico (26, 53 e 66) e os tipos 34, 57 e 83 são considerados de risco indeterminado (Muñoz, 2003; Wheeler, 2008).

Normalmente o ciclo de replicação dura quatro semanas e a infecção é auto-limitada, sendo eliminada pelo sistema imune espontaneamente. Contudo em alguns casos o vírus

escapa às defesas do sistema imune, resultando em infecções persistentes. Pode ocorrer integralização do DNA viral ao DNA celular, com a síntese contínua das proteínas E6 e E7, permitindo a imortalização celular, este fenômeno ocorre mais comumente com os tipos HPV-16 e HPV-18, nestes casos é importante ressaltar que apenas 2% evoluem para lesões malignas, sendo necessária a participação de outros eventos ainda não completamente claros para esta transformação (Meijer et al, 2000). Foi demonstrado que a proteína E6 se liga a uma proteína celular ligante do gene supressor tumoral p53, inativando-o por ubiquinação, evitando a supressão do crescimento celular tumoral (Beaudenon, 2008). Uma vez estabelecida a lesão maligna, a participação de um tipo específico de HPV tem sido demonstrada em mais de 90% dos casos, pela detecção de DNA viral nos tecidos afetados, de fato, os genes virais E6 e E7 são invariavelmente expressos pelas células tumorais (Yugawa, 2009).

COFATORES NA PATOGÊNESE

Como já citado anteriormente, apenas uma pequena parte das infecções persistentes evoluem para formas neoplásicas, havendo a necessidade de eventos biológicos adicionais para esta transformação. Estes facilitadores adicionais são conhecidos como cofatores e incluem, segundo relatos da literatura científica, herança genética, respostas imunológicas, hormônios como a progesterona, tabagismo e promiscuidade (Magnusson, 2000).

TRANSMISSÃO

A transmissão do HPV é atualmente considerada como sexual, figurando desta forma como uma das principais doenças sexualmente transmissíveis, principalmente por sua frequência (Kjaer et al., 2001). Podem ocorrer transmissões esporádicas por outras vias, como fômites ou perinatal, tendo sido descrita a presença de HPV em líquido amniótico, pele e orofaringe de recém-nascidos em até 73% dos casos (Cason et al., 1995.; Kaye et al.; 1996), contudo esta aparente elevada contaminação não resultou em altos níveis de infecção materno-fetal nas populações estudadas.

Transformação oncogênica da primoinfecção ao carcinoma invasivo

O curso das doenças causadas pelo papilomavírus possui etapas conhecidas e bem delineadas. Em uma fase inicial e geralmente autolimitada da doença ocorrem alterações

inflamatórias típicas. Contudo, a persistência destas infecções pode cursar com alterações progressivas que culminam com o carcinoma invasivo. O curso destes eventos pode ser dividido em três etapas distintas: um período inicial de inflamação, um período intermediário de alterações displásicas epiteliais, que diversos autores consideram neoplasias intraepiteliais, e um período posterior com lesões características de carcinoma com extravasamento deste crescimento para além da lâmina basal, caracterizando a carcinoma invasivo.

Apesar de um elevado número de pessoas sofrerem inflamações por papilomavírus humano, apenas uma fração desta população irá desenvolver as formas mais avançadas da doença, fatores pessoais, ambientais e relacionados ao agente etiológico devem ser considerados. Atualmente, é amplamente aceito que as inflamações persistentes são necessárias para o surgimento das transformações neoplásicas, especialmente na presença de tipos de papilomavírus mais oncogênicos. Grande parte dos autores considera como persistente uma inflamação comprovada por mais de seis meses, na grande maioria dos casos pode ser demonstrada a ativa replicação do HPV nestes tecidos (Ho, et al., 1998).

O material genético do HPV pode ser encontrado na célula infectada em três formas, epissomal, integrado e na forma mista. Na fase inicial da infecção, ocorre a internalização do vírus, seu material genético é direcionado ao núcleo celular, e inicia-se o processo de replicação do próprio material na forma de fita dupla circular (o epissomo), simultaneamente, inicia-se o processo de transcrição das proteínas codificadas pelo DNA viral diretamente a partir da fita dupla circular, inicialmente, ocorre a transcrição dos genes precoces que codificam as proteínas E1, E2, E4, E5, E6 e E7, posteriormente ocorre a transcrição das proteínas tardias responsáveis pela formação do capsídeo, L1 e L2. Neste período, ocorre o surgimento das alterações dérmicas e mucosas próprias da lesão inflamatória causada pelo vírus, e estas alterações serão mais severas quando houver uma carga viral mais elevada, ocorrendo uma replicação viral mais intensa e uma maior eliminação de partículas virais (Lillo, 2005).

Em um período posterior, pode ocorrer a integração de parte do material genético do papilomavírus ao DNA celular. Esta “integração” ocorre invariavelmente com apenas parte do DNA viral, iniciando-se no meio da região precoce com fragmentação do gene E2. Por este motivo esta proteína deixa de ser expressa e ocorre uma auto-regulação das proteínas E6 e E7. Neste período ocorre uma maior inativação dos genes de supressão tumoral pRB e p53, com uma maior inibição da apoptose e uma consequente maior evidência de deformações

celulares, descritas como atipias celulares intensas (displasia grau III), o crescimento celular desordenado se instala progressivamente, com ruptura dos limites epiteliais e invasão além da lâmina basal, configurando o carcinoma invasivo. Esta progressão não ocorre universalmente, de fato na maioria dos casos as lesões inflamatórias são auto-limitadas. O tempo transcorrido entre a primoinfecção e o surgimento do carcinoma invasivo é variável, sendo na maioria dos casos necessário de 5 a 20 anos para que estes eventos ocorram plenamente (Woodman, 2007), vide figura 14.

Figura 14.

FORMAS CLÍNICAS

A infecção pelo HPV tem sido descrita em três formas de apresentação: clínica, subclínica e latente. A forma clínica mais comum se traduz no surgimento de lesões dérmicas exofíticas de superfície granulosa, que podem ser únicas, mas geralmente são múltiplas e de tamanhos variados entre milímetros a poucos centímetros, cada lesão. Podem apresentar alterações de coloração em relação à pele normal, geralmente eritematosas ou hiperpigmentares. Estas lesões são conhecidas como verrucóides ou condilomatosas (verrugas ou condilomas) e são mais encontradas em áreas dérmicas mais umedecidas, em especial nas regiões anogenitais, como vulva, pequenos e grandes lábios, introito vaginal, vagina, colo uterino, anus, canal anal, glândula peniana, uretra distal e meato uretral. Os sintomas relatados incluem os relacionados diretamente a presença destas lesões proliferativas, como presença das tumorações, sangramentos e pruridos provocados por atrito, e até mesmo sintomas secundários a obstruções locais, como por exemplo, obstrução urinária. Em casos raros podem ocorrer lesões gigantes com necroses superficiais e sangramentos, estas lesões são conhecidas como tumores de Burske-Levenstein. A incidência destas formas clínicas tem aumentado nos últimos anos nos países em desenvolvimento, mais caracteristicamente em pessoas com vida sexual promíscua (Franceschi, 2009).

As lesões subclínicas apresentam-se como áreas difusas de hiperplasia epitelial não papilífera da camada germinativa (Meisels, 1976) e sua diferenciação histológica é plana ou micropapilar (Reid, 1984). Estas lesões ocorrem mais comumente no colo uterino e glândula e podem ser mais bem observadas após a aplicação de ácido acético a 5% que coagula e precipita as proteínas intracelulares, demonstrando um epitélio acetobranco, máculas e pápulas (Lauro et al., 2000). Nas formas latentes não evidenciam-se lesões macroscópicas e

nem ocorrem sintomas, só permitindo sua identificação através de técnicas de biologia molecular. Nestas formas o DNA viral se encontra na forma episomal, replicando-se lentamente, apenas a cada replicação celular, podendo ocorrer sua reativação e permitindo o recrudescimento de formas infecciosas.

Referências

Andersson K, Waterboer T, Kirnbauer R, Slupetzky K, Iftner T, de Villiers E M, Forslund, O, Pawlita M, Dillner J.. Seroreactivity to cutaneous human papillomaviruses among patients with nonmelanoma skin cancer or benign skin lesions. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 2008; 17: 189–195.

Baker T S, Newcomb W W, Olson N H, Cowser L M, Olson C, Brown J C. Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. 1991 *Biophys J*; 60 (6): 1445–1456.

Banerji J, Rusconi S, Schaffner W. Expression of a beta-globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences. 1981; *Cell* 27: 299–308.

Barbosa M S , Lowy D R , Schiller J T. Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins. *J Virol* 1989; 63 (3): 1404–1407.

Benoist C, Chambon P. In vivo sequence requirements of the SV40 early promotor region. 1981 *Nature*; 290: 304–310.

Berg M , Stenlund A. Functional interactions between papillomavirus E1 and E2 proteins. *J Virol* 1997; 71 (5): 3853–3863.

Berget S M , Moore C , Sharp P A. . Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. 1977 *Proc Natl Acad Sci USA*; 74: 3171–3175.

Bernard C, Mougin C, Laurent R, Lab M. Oncogene activation: an informative marker for the human papillomavirus-lesions severity. 1994 *Cancer Detect Prev*;18(4):273-82.

Bernfield M , Götte M , Park P W, Reizes O, Fitzgerald M L, Lincecum J, Zako M. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. 1999 *Ann Rev Biochem*; 68: 729–777.

Bernfield M, Kokenyesi R, Kato M, Hinkes M T, Spring J, Gallo R L , Lose E J. Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. 1992 *Annu Rev Cell Biol* 8: 365–393.

Boshart M, Gissman L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. 1984 EMBO J; 3: 1151–1157.

Boshart M, zur Hausen H. Human papillomaviruses (HPV) in Buschke–Loewenstein tumors: physical state and identification of a tandem duplication in the non-coding region of a HPV 6-subtype. 1986 J Virol 58: 963–966.

Buck CB, Cheng N, Thompson CD, Lowy DR, Steven A C, Schiller J T, Trus B L. Arrangement of L2 within the papillomavirus capsid. 2008 J Virol; 82 (11): 5190–5197.

Carter J J, Koutsky L A, Hughes J P, Lee S K, Kuypers J, Kiviat N, Galloway DA. Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. 2000 J Infect Dis; 181: 1911–1919.

Carter J J, Wipf G C, Benki S F, Christensen N D, Galloway D A. Identification of a human papillomavirus type 16-specific epitope on the c-terminal arm of the major capsid protein L1. 2000 J Virol; 77 (21): 11625–11632.

Cason J, Kaye J N, Jewers R J, Kambo P K, Bible J M, Kell B, Shergill B, Pakarian F, Raju K S, Best J M. Perinatal infection and persistence of human papillomavirus types 16 and 18 in infants. J Med Virol 1995; 47(3):209-18.

Challberg M D, Kelly Jr T J. Adenovirus DNA replication in vitro. Proc Natl Acad Sci USA 1979; 76:655–659.

Chen X S, Garcea R L, Goldberg I, Casini G, Harrison S C. Structure of small virus-like particles assembled from the L1 protein of human papillomavirus 16. 2000 Mol Cell; 5: 557–567.

Chow L T, Gelinas R E, Broker T R, Roberts R J. An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. 1977 Cell; 12: 1–8.

Christensen N D, Kirnbauer R, Schiller J T, Ghim S J, Schlegel R, Jenson A B, Kreider J W. Human papillomavirus types 6 and 11 have antigenically distinct strongly immunogenic conformationally dependent neutralizing epitopes. 1994 Virology; 205: 329–335.

Figuras

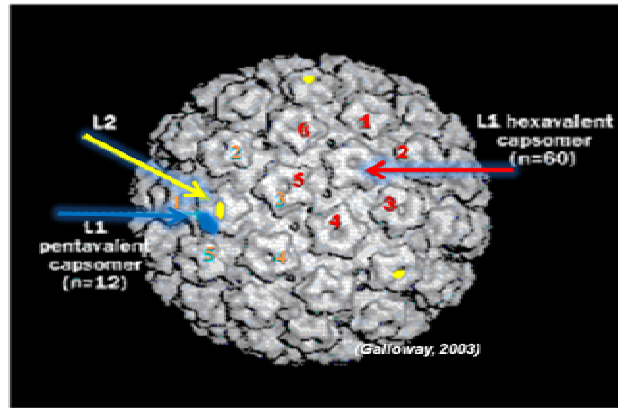


Figura 1. modelo em computação gráfica do capsídeo do Vírus HPV (Galloway, 2003).

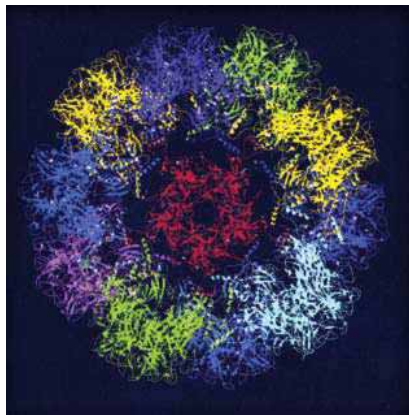


Figura 2. Pentâmero icosaédrico formado por cinco unidades de L1 e uma unidade de L2 (em vermelho), representação em computação gráfica das moléculas (Chen 2000).

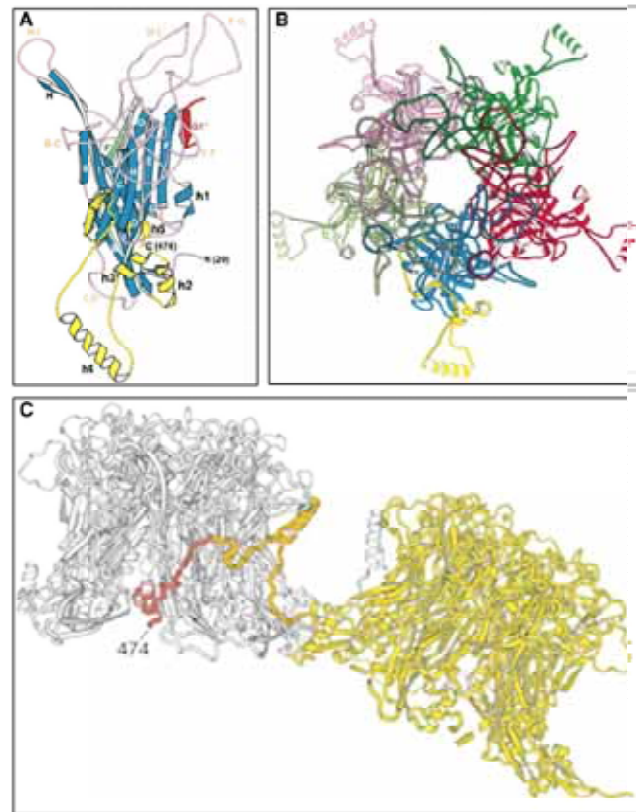


Figura 3. Estrutura do HPV L1. (A) Estrutura do monômero, (B) Capsômero com interação pentamérica (Chen et al., 2000). (C) Detalhe do braço C-terminal promovendo a adesão interpentamérica (Modis et al., 2002).

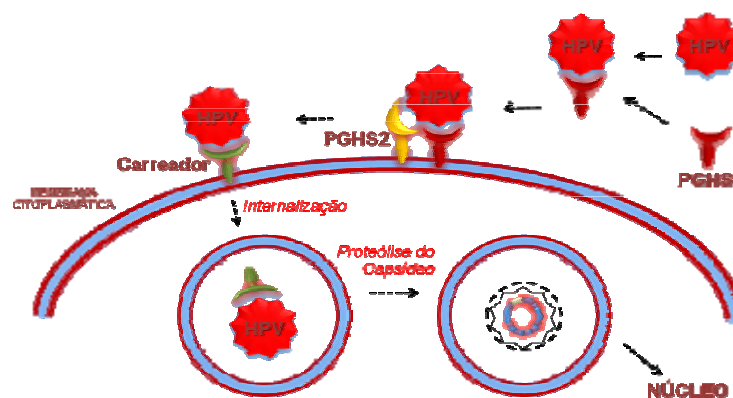


Figura 4. Ligação do HPV aos receptores peptídeo-glicanos na matrix extracelular (PGHS1) que os direcionam aos receptores de superfície (PGHS2) com internalização por carreadores protéicos. No citoplasma ocorre proteólise do capsídeo e direcionamento do epissomo ao núcleo.

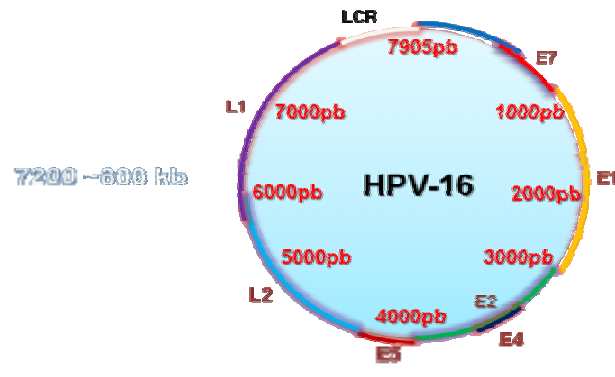


Figura 5. DNA do HPV-16 e genes codificados com região de controle de transcrição (LCR).

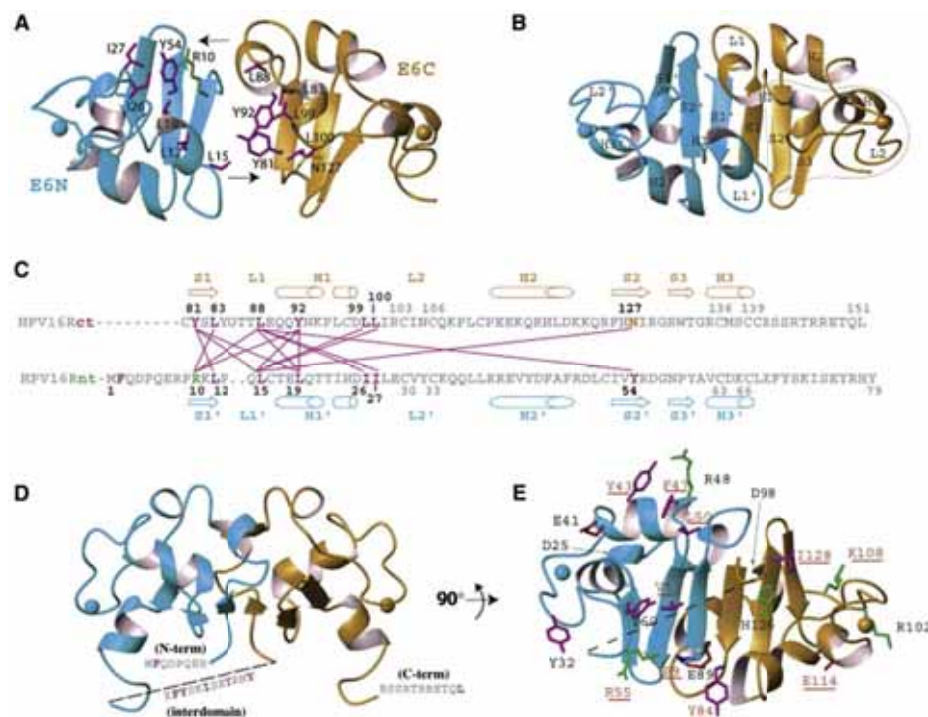


Figura 6. Modelo pseudodimérico da proteína E6. **(A)** modelo com os segmentos N-terminal e C-terminal com os segmentos hidrofóbicos demonstrados. **(B)** modelo com os segmentos hidrofóbicos interagindo. **(C)** Demonstração linear dos segmentos hidrofóbicos. **(D)** Mapa do modelo com os segmentos não previstos no modelo. **(E)** Demonstração dos resíduos conservados em todas as proteínas E6 (Normine et al., 2006).

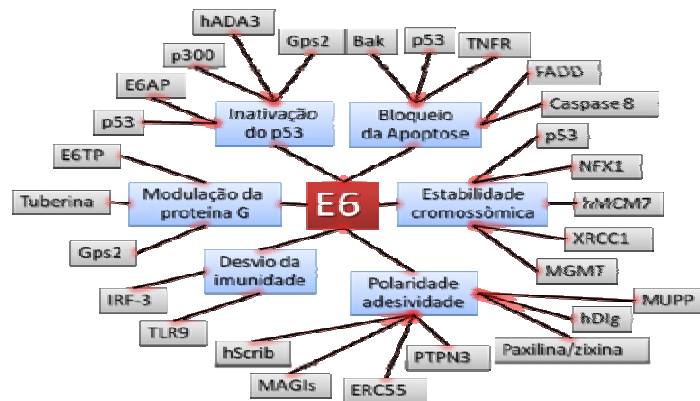


Figura 7. Proteínas que interagem com a E6, alterando diversas vias metabólicas (Howie, 2009).

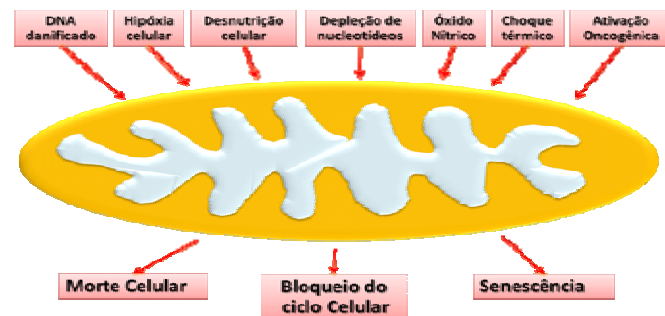


Figura 8. Sinais de estresse celular desencadeando sinais mitocondriais.

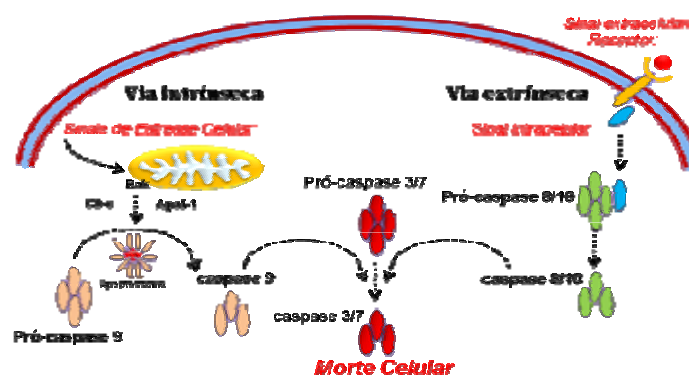


Figura 9. Vias intrínseca e extrínseca da apoptose.

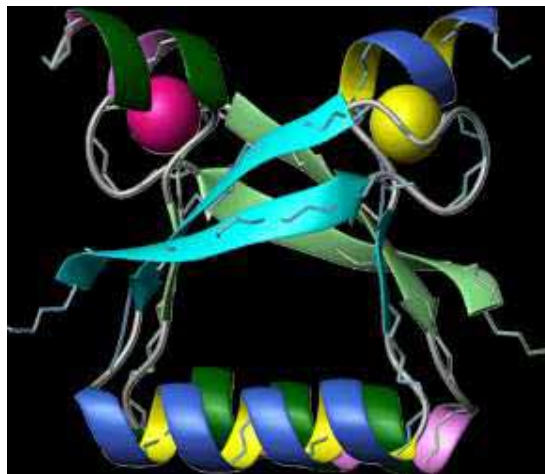


Figura 10. Modelo computacional da proteína HPV-E7 (Ohlenschlager et al., 2006)

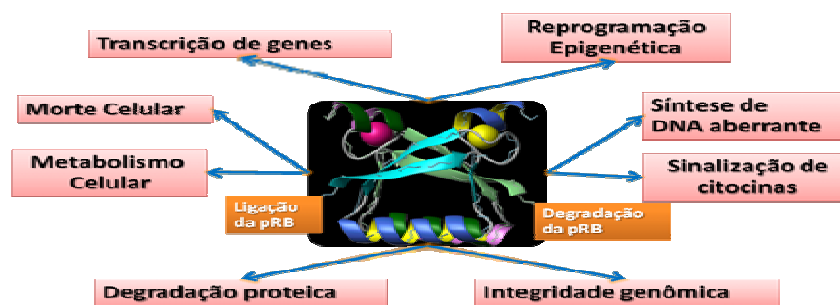


Figura 11. Ligação da proteína E7 ao pRB e inibição de suas atividades.

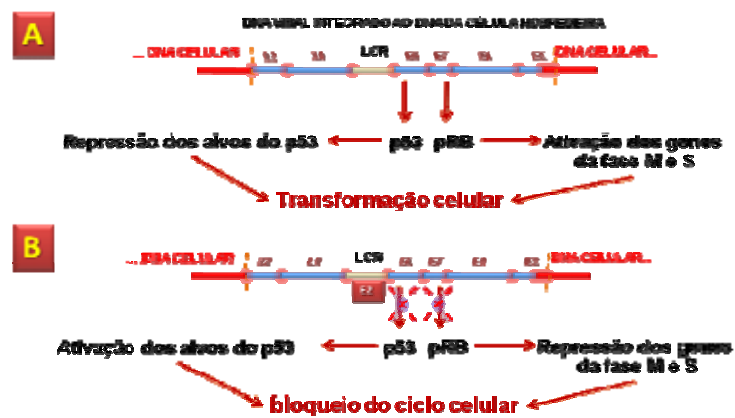


Figura 12. Representação esquemática do HPV-18 DNA integrado. (A) Replicação ativa das proteínas E6 e E7 pela promoção da região LCR. (B) Presença da proteína E2 provocando a inibição das proteínas E6 e E7 e seus efeitos sobre os fatores de supressão tumoral p53 e pRb.

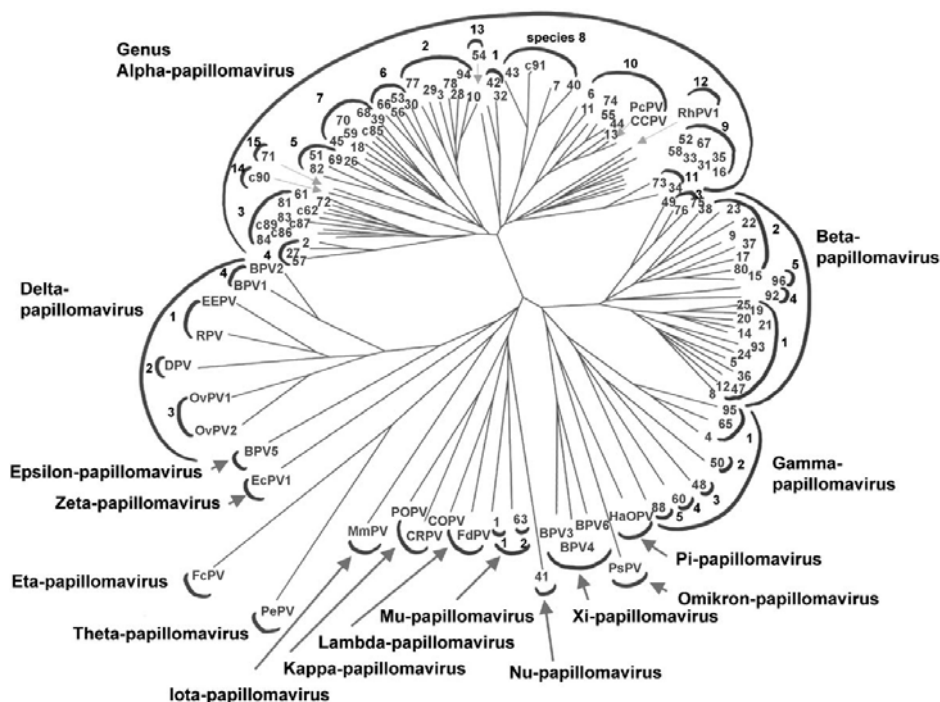


Figura 13. Árvore filogenética dos 118 tipos de HPV. Baseado no sequenciamento da região ORF L1 (De villiers, 2004).

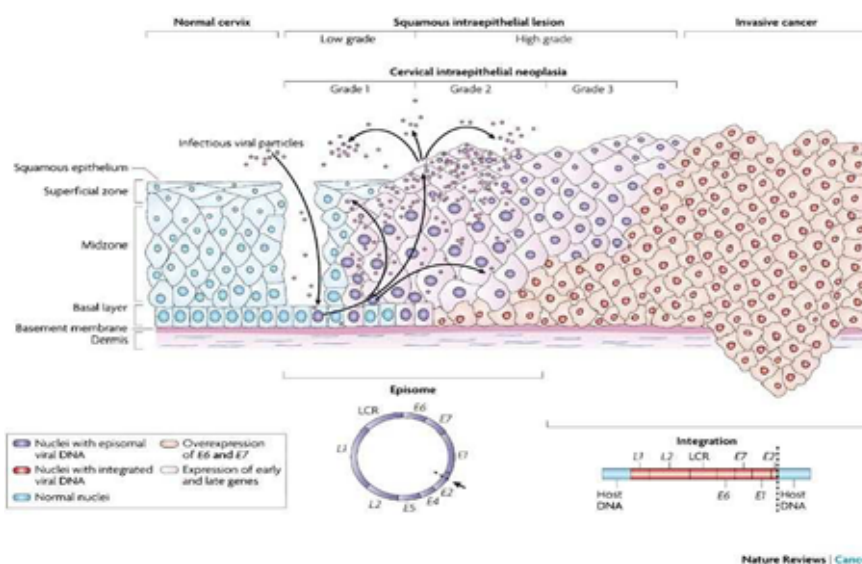


Figura 14. Ciclo biológico do papilomavírus e alterações epiteliais correspondentes correlacionadas à integração do DNA viral (Ciaran, 2007).

Tabelas

Tabela 1 – genes codificados no HPV-DNA

Gene	tamanho	região	Proteína	Atividades protéicas
L1	7200 a 8000 bb	ORF - Late	L1	- Participa na formação da estrutura do capsídeo
L2	~ 5500 bb	ORF - Late	L2	- Participa na formação da estrutura do capsídeo
E1		ORF - Early	E1	- Fixação do DNA viral ao hospedeiro - Ativação da replicação do DNA viral - Ativação dos monômeros de ubiquitina
E2		ORF - Early	E2	- Fixação do DNA viral ao hospedeiro - Ativação da replicação do DNA viral - Estabilização do DNA viral durante a divisão celular - transferência dos substratos de ubiquitina para a E3-ligase E6AP - Estímulo da função supressora do p53 (controle negativo)
E4		ORF - Early	E4	- Transferência dos substratos de ubiquitina para a E3-ligase E6AP
E5		ORF - Early	E5	
E6	~ 150 aa	ORF - Early	E6	- inibição da das vias intrínseca extrínseca da apoptose
E7	~100 aa	ORF - Early	E7	- Inibição da atividade da pRB

DETECÇÃO DE HPV DNA EM AMOSTRAS DE SANGUE, TECIDO PERIANAL E GÁSTRICO POR PAPILLOCHECK TEST E AGILENT BIOANALYZER 2100

^a Aurelino Cândido; ^a Chirleanny Mendes; ^{a,b} Danyelly Bruneska ^{a,b}* José Luiz Lima Filho

^a Grupo de Prospecção Molecular e Bioinformática (ProspecMol), Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE 50670-901, Brazil; ^b Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE 50670-901, Brazil

* Author's address:

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA)

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) - Av. Prof. Moraes Rego, S/N

Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil - CEP: 50670-901

Phone: + 55 81 2126 8484 - Fax: + 55 81 2126 8485

e-mail: joseluiz60@me.com

Keywords: Human Papillomavirus, HPV, Papillocheck, Bioanalyser

RESUMO

A extração de DNA de diferentes origens possui grande importância, tanto para o diagnóstico clínico, investigações médico-legais, como também para estudos científicos. Na prática clínica diária, os materiais obtidos removidos cirurgicamente de pacientes tanto para diagnóstico quanto para tratamento, são fixados em formol e incluídos em blocos de parafina para posterior avaliação histopatológica. O papiloma vírus humano tem sido implicado como

fator essencial na oncogênese de diversas neoplasias epidermóides, sendo identificada sua presença em neoplasias orofaríngeas e gastrointestinais, como esôfago, estômago e cólon, muito embora em incidências variáveis. Duas amostras de material parafinado de tecido anal, dentre 09 testadas, apresentaram resultado positivo para o HPV através da amplificação por primer consensus, assim como 01 amostra de sangue de paciente com alterações gástricas. Apenas 01 caso positivo para HPV-16 foi encontrado nas amostras parafinadas de tecido gástrico utilizando o PapilloCheck como scanner de microarray para genotipagem das amostras. Estes dados indicam a necessidade de otimização de protocolos de identificação e genotipagem para o HPV, viabilizando uma análise epidemiológica mais ampla da infecção pelo HPV no trato digestivo.

ABSTRACT

DNA extractions from a wide sources are very important, for clinical diagnosis, forensis investigations, and also for cientifical studies. Specimens surgically removed for clinical diagnosis and treatment are fixed in formalin solutions and included in parafin block for histopatology. In order to evaluate the role of human papillomavirus in epidermoids cancers the HPV-DNA have been identified in orofaringeal, anogenital and gastrointestinal cancer specimens with a wide range of results. This paper reports the DNA extration from paraphin embeebed tissues, from anogenital and gastric mucosa specimens and the HPV primers amplification (PCR) and detection, using Agilent Bioanalyser 2100 and Papillocheck test.

1 INTRODUÇÃO

A extração de DNA de diferentes origens possui grande importância, tanto para o diagnóstico clínico, investigações médico-legais, como também para estudos científicos. Em grande parte das vezes, as amostras a serem analisadas possuem DNA em pequenas

quantidades. Desta forma, métodos que permitam a extração e amplificação do DNA obtido a partir destas fontes encontram-se em constante aperfeiçoamento (Barea, 2004; Bueno, 2004; Doan & Monuki, 2008). Na prática clínica diária, os materiais obtidos removidos cirurgicamente de pacientes tanto para diagnóstico como para tratamento, são fixados em formol e incluídos em blocos de parafina para posterior avaliação histopatológica (Bielawski *et al.*, 2001). O DNA contido neste material pode ser necessário tanto para fins diagnósticos, como para estudos científicos (Lehmann & Kreipe, 2001). O DNA extraído, mesmo em pequenas quantidades pode ser amplificado por técnicas de polimerização em cadeia (PCR), obtendo-se concentrações suficientes para análise (Mies, 1994).

O papiloma vírus humano tem sido implicado como fator essencial na oncogênese de diversas neoplasias epidermóides (zur Hausen, 2009). O estudo de sua participação no surgimento de carcinomas gástricos cervicais e anogenitais permitem identificar as infecções persistentes por HPV como o elemento desencadeador destas patologias (Meijer *et al.*, 2000). Estudos realizados nas últimas décadas associam a presença do HPV DNA com a oncogênese dos carcinomas epidermóides cervicais e anogenitais, identificando-o na maioria dos tecidos oriundos destas neoplasias (Munger *et al.*, 2002). Relatos diversos descrevem a identificação da presença do HPV DNA em outras neoplasias, em especial de neoplasias orofaríngeas e gastrointestinais, como esôfago, estômago e cólon, muito embora em incidências variáveis (zur Hausen, 2009).

Em virtude da comprovada participação do HPV na oncogênese de diversas neoplasias, diversos estudos foram delineados com o objetivo de identificar sua presença nestes tecidos. De fato, técnicas que permitiram o isolamento do HPV DNA nestas amostras permitiram a identificação de diversos tipos de HPV, sendo que alguns foram implicados mais intensamente na gênese de neoplasias, enquanto que outros tipos estavam mais associados com lesões benignas (zur Hausen, 2009). Estas descobertas permitiram a

classificação dos tipos de HPV em baixo, médio e elevado risco de oncogênese, de acordo com sua maior ou menor participação no surgimento de neoplasias (Munoz, 2003; Wheeler, 2008).

No presente estudo, foram analisadas amostras de tecido gástrico e anal parafinizado como fonte de DNA para identificação da presença do HPV, assim como de amostras de sangue circulante, pela metodologia de PCR e microarray.

2 METODOLOGIA

2.1 Amostras biológicas

18 amostras de tecidos parafinizados foram utilizadas neste estudo, sendo 09 de tecido gástrico e 09 provenientes da região anal. Tais amostras foram obtidas no Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco de acordo com o comitê de ética CAAE - 0014.0.172.000-08. Foram incluídos neste estudo amostras de tecido não-parafinizado e amostras de sangue coletados de pacientes normais ou portadores de alterações no sistema digestivo.

2.2 Extração DNA parafinizado

O protocolo para extração de DNA a partir de material parafinado foi realizado utilizando-se o kit comercial QIAamp DNA FFPE Tissue de acordo com as normas do fabricante, exceto pela etapa de desparafinização. Foram obtidos 30 cortes histológicos a partir dos blocos parafinizados com espessura de 0,2 μm , os quais foram misturados a 180 μL de tampão ATL e 20 μL de solução de proteinase K, seguido de incubação overnight a 56°C, sob leve agitação. Posteriormente, adicionou-se a amostra 400 μL de tampão AL e etanol (1:1 v/v) e homogeneizou-se vigorosamente. O lisado foi cuidadosamente transferido para uma coluna acoplada a tubo de 2 mL. Realizou-se uma centrifugação a 8000 rpm por 1 min e o filtrado

foi descartado. A coluna foi lavada em duas etapas, utilizando-se 500 µL dos tampões AW1 e AW2, separadamente. Em cada etapa realizou-se uma centrifugação a 8000 rpm por 1 min, sendo o filtrado descartado. Ao final da 2ª lavagem uma nova centrifugação foi realizada a 14000 rpm por 3 min. A eluição do DNA ligado à coluna foi realizada adicionando-se 50 µL de tampão ATE e incubando-se à temperatura ambiente por 10 min, seguida de centrifugação a 14.000 rpm por 1 min. Esta etapa foi repetida duas vezes e o material eluído foi armazenado a -20°C. A concentração do DNA das amostras biológicas e da amplificação por PCR foi analisada utilizando DNA 7500 LabChip® Kit no Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent technologies, Waldbronn, Germany).

2.3 Identificação do HPV

A identificação da presença do HPV nas amostras biológicas foi realizada por PCR utilizando os primers consensus GP5+/6+ e MY09/11. O volume final da reação foi de 20 µL contendo 2 µL do DNA extraído, 10mM Tris/HCl pH 8.0, 50 mM KCl, 2.5 mM of each dNTP, 10 mM each of primer and 2,5U da Platinum Taq (Invitrogen). As condições de amplificação foram as seguintes: (i) 94°C por 3 minutos; (ii) 34 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; (iii) extensão final a 72°C por 10 min. Os primers consensus para a região do gene L1 GP5+ (5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3') e GP6+ (5'-GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC-3') amplificam 150pb com temperatura de anelamento de 45°C. Os primers MY09 (5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3') e MY11 (5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3') foram utilizados para amplificação de uma região de 450pb deste mesmo gene, sob temperatura de anelamento de 55°C. Como controle positivo foi utilizado o plasmídeo pBR322.HPV16, gentilmente cedido pelo Instituto Butantan.

O gene β -globina foi utilizado como gene repórter para garantia da qualidade da extração do DNA das amostras biológicas, amplificando uma região de 268pb. A amplificação foi preparada para o volume final de 25 μ L e as condições da PCR foram: desnaturação inicial por 10 min a 94°C, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 62°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min. A etapa de extensão final foi realizada a 72°C por 7 min (Simoanto et al., 2007). Como controle negativo da reação foi utilizada água ultrapura e como controle positivo foi utilizado DNA extraído de sangue humano.

2.4 Genotipagem do HPV

O PapilloCheck® HPV-screen DNA-chip foi utilizado para simultaneamente detectar e genotipar o HPV presente nas amostras biológicas. A genotipagem pelo PapilloCheck permite identificar os 06 sorotipos de baixo risco (06, 11, 40, 42, 43, 44) e 18 sorotipos de alto risco (16,18, 31, 33, 39, 44/45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 82). O teste se baseia na amplificação de uma região de 350pb do gene E1 do HPV através de 24 pares de sondas tipo-específicas. O controle interno para amplificação do gene ADAT1 é visualizado pelo fluoróforo Cy5 no canal verde, enquanto que o resultado positivo para o vírus é visualizado no canal vermelho pelo uso do fluoróforo Cy3. Cada chip analisado compreende 12 poços de 10mm², cada um deles contendo 140 spots capazes de identificar os 24 tipos de HPV, além dos 4 controles de processo. Cada HPV é identificado por 5 spots compostos pelas sondas específicas para hibridização. Os resultados são considerados positivos pelo PapilloCheck quando a amostra apresentou resposta positiva para os controles de amostra, PCR e hibridização, indicados no software utilizado pelo CheckScannerTM, assim como em pelo menos 3 dos 5 spots de leitura de cada tipo de HPV.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Identificação do HPV pelos primers consensus MY09/11 e GP5+/6+

Várias ferramentas laboratoriais têm sido utilizadas para detecção de DNA viral em amostras biológicas. Este é o primeiro trabalho que avalia a qualidade da extração de DNA de amostras de tecido gástrico e anal conservadas em parafina pelo uso do Bionalyzer 2100 (Agilent) e a presença de HPV pelo uso de primers consensus e pelo *microarray* do Papillocheck (Greiner). Amostras de sangue e tecidos não parafinizadas também foram utilizadas no estudo. A Tabela 01 enumera as amostras trabalhadas com a correspondente análise clínica/histopatológica e os resultados de identificação por PCR.

Tabela 1

O material extraído foi analisado no Agilent 2100 Bioanalyzer, sendo possível visualizar na Fig. 01 que amostras parafinizadas apresentam DNA mais fragmentado quando comparado ao DNA extraído de sangue. Amostras extraídas de parafina de tecido gástrico apresentaram concentração mais baixa de DNA extraído em relação às amostras de tecido anal.

Fig. 1

Para o tecido perianal, 3 amostras, dentre as 9 trabalhadas, não apresentaram amplificação para o gene controle da beta-globina, negatizando também para a amplificação do DNA de HPV pelos primers consensus GP5+/6+ e MY09/11. No entanto foi possível identificar a amplificação da região do gene L1 do HPV em duas amostras, utilizando os primers GP5+/6+. Nestes casos não foi possível identificar resposta positiva para os primers MY09/11 (Fig. 2). A amostra de número 03 é proveniente de bloco de parafina de amostra coletada de paciente masculino com diagnóstico de condiloma acuminado, enquanto que a amostra 06 foi obtida de paciente feminino diagnosticada com adenocarcinoma bem diferenciado. A associação de infecções pelo HPV e anormalidades epiteliais no ânus e reto

vem sendo investigada desde meados da década de 1980, desde então, através de técnicas para detecção de HPV DNA demonstrou-se sua presença em mais de 50% dos casos de doenças condilomatosas e carcinomas epidermóides anorretais (Frazer, Medley *et al.*, 1986; Scholefield, Sonnex *et al.*, 1989).

Fig. 2

Em mulheres, ainda não está clara a existência de uma relação direta entre infecções cervicais e anais. Contudo, existe uma prevalência bem maior de HPV no canal anal de mulheres com neoplasias intraepiteliais cervicais de grau III quando comparadas com mulheres que apresentaram resultados normais em testes colpocitológicos (Veo, Saad *et al.*, 2008).

As amostras de tecido gástrico apresentaram maior dificuldade de amplificação do gene controle da beta-globina, coincidindo com extrações de DNA com menor concentração final. Nenhuma amostra gástrica apresentou resultado positivo para amplificação do DNA viral (Figura 2). Em todos os testes foi utilizado um controle positivo representado pelo DNA extraído de sangue humano com adição do plasmídeo pRB322 contendo o genoma completo do HPV-16.

Amostras de DNA extraído de sangue e de tecido não-parafinizado também foram analisadas quanto à presença do DNA viral. A fig. 3 apresenta os resultados de amplificação para a beta-globina destas amostras nos painéis A e B, aonde é possível observar que houve amplificação da região deste gene homólogo no tamanho esperado de 268 pb. No painel C observa-se o resultado para a avaliação da presença de HPV nas referidas amostras. Neste caso a amostra de numero 19, extraída de sangue, apresentou resultado positivo para a amplificação do DNA viral pelo primer MY09/11, com diagnóstico histopatológico de adenocarcinoma gástrico. Amostras de tecido gástrico são normalmente utilizadas na pesquisa da presença do HPV, contudo alguns autores realizaram a busca da presença do

DNA do papilomavírus no sangue circulante, principalmente através de técnicas de PCR com primers GP5+/6+ e MY09/11, como também utilizando chips comerciais de detecção de HPV DNA, como o EasyChip Blot Kit (Lin et al., 2008).

Fig. 3

3.2 Genotipagem das amostras

Todas as amostras extraídas de tecido anal e gástrico parafinizados, além de amostras frescas foram analisadas no PapilloCheck (Greiner), independente de apresentarem resultado positivo para a presença do HPV. Apenas a amostra 12 apresentou resultado consistente com a presença do HPV-16 no material extraído de paciente feminino, com 32 anos de idade, diagnosticado com gastrite crônica ativa moderada associada ao *H. pylori*.

Esta amostra apresentou resultado negativo para os testes de amplificação pelos primers consensus, sendo discordante do resultado obtido pelo PapilloCheck. Esta inconsistência também foi observado em amostras de raspagem cervical de mulheres entre 20 e 65 anos, utilizando-se PapilloCheck test e PCR com primer GP5+/6+ e captura híbrida, observaram-se inconsistências entre os métodos, principalmente para tipos de HPV de alto risco oncogênico (Jones et al. 2009). Dados inconsistentes em relação ao uso de primers consensus já foram relatados por Karlsen et al. (1996), no qual amostras de biopsias foram testadas para os primers consensus MY09/11, GP5+/6+ e CP (E1). O PapilloCheck, que consistem em um microarray de detecção simultânea de 24 tipos de HPV, apresenta maior sensibilidade que os demais métodos testados, incluindo captura híbrida e PCR-EIA (método de imunensaio mediado por PCR enzimático via GP5+/6+) (Peevor et al., 2009).

4 CONCLUSÕES

Técnicas que permitam o estudo da presença do DNA do papilomavírus em células de tecidos inclusos em formalina possuem uma importância relevante, haja vista que na prática clínica é comum o estudo histopatológico por microscopia óptica com coloração de hematoxilina e eosina.

Fragmentos teciduais parafinizados apresentam conservação do DNA viral, sendo possível a identificação gênica por técnicas de amplificação (PCR) utilizando-se primers consensus adequados, em nosso caso em 02 das 18 amostras avaliadas para a detecção do gene que codifica a proteína L1 do HPV-16 com o uso do primer GP5+/6+.

Também foi possível detectar DNA de HPV em amostras de sangue circulante de paciente com adenocarcinoma gástrico com o primer MY09/11.

O PapilloCheck foi um método sensível para detecção do DNA viral, embora não tenha apresentado resultados coincidentes com os testes de PCR.

A otimização da extração de DNA das amostras parafinizadas pode aumentar a eficiência de ambos os testes, de PCR e microarray, melhorando a qualidade do material avaliado e a sensibilidade/reprodutibilidade dos testes, permitindo estudos de identificação gênica em materiais oriundos de estudos histopatológicos e previamente preservados em blocos de parafina. Estudos com materiais de variadas origens teciduais e com diferentes primers podem contribuir para melhoria da técnica permitindo uma maior amplitude de sua aplicabilidade, podendo se tornar uma ferramenta importante no auxílio ao diagnóstico, principalmente em patologias que atingem órgãos de difícil acesso.

5 REFERÊNCIAS

- Barea, J.A.; Pardini, M.I.M.C.; Gushiken, T. Extração de DNA de materiais de arquivo e fontes escassas para utilização em reação de polimerização em cadeia (PCR). *Rev Hematol Hemoter*, v. 26, n. 4, p. 274-81, 2004.
- Bielawski, K. *et al.* The suitability of DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues for double differential polymerase chain reaction analysis. *Int J Mol*, v. 8, n. 5, p. 573-8, 2001.
- Bueno, V. DNA e aperfeiçoamento das técnicas de extração. *Rev Bras Hematol Hemoter*, v. 26, n. 4, p. 233-4, 2004.
- Doan, L. & Monuki, E. S. Rapid genotyping of mouse tissue using Sigma's Extract-N-Amp Tissue PCR Kit. *J Vis Exp*. 2008 Jan 22;(11).
- Fernandes, J.V. *et al.* Comparação de três protocolos de extração de DNA a partir de tecido fixado em formol e incluído em parafina. *J Patol Lab*, v. 40, n. 3, p. 141-6, 2004.
- Frazer, I.H.; Medley, G.; Crapper, R.M.; Brown, T.C.; Mackay, I.R. Association between anorectal dysplasia, human papillomavirus and human immunodeficiency virus infection in homosexual men, *Lancet* 1986, 20:657-60.
- Jones, J.; Powel, N.G.; Tristram, A.; Flander, A. N.; Hibbitts, S. Comparison of the Papillocheck DNA micro-array human papillomavirus detection assay with hybrid capture II and PCR-enzyme immunoassay using the GP5/6+ primer set. *J Clin Virol*, 2009; 45:100-4.
- Karlsen, F.; Kalanteri, M.; Jenkins, A.; Pettersen E., Kristensen, G., Holm, R. Johansson, B.; Hagmar, B. Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of human papillomavirus, *J Clin Microbiol*, 1996; 34:2095-100.
- Lehmann, U.; Kreipe, H. Real-time PCR analysis of DNA and RNA extracted from formalin-fixed

- and paraffin-embedded biopsies. *Methods*. 2001 Dec;25(4):409-18.
- Lin C Y, et al. Human papillomavirus typing with polymerase chain reaction-based genotyping array compared with type-specific PCR. 2008 *J Clin Virol*; 42: 361-367.
- Meijer, C. J.; Rozendaal, L.; Voorhorst, F. J.; Verheijen, R.; Helmerhost, T. J.; Walboomers, J.M. Human papillomavirus and screening for cervical cancer: state of art and prospects. *Ned Tijdschr Geneesk*, 2000, 26: 1675-9.
- Mies, C. Molecular biological analysis of paraffin-embedded tissues. *Hum Pathol*. 1994 Jun; 25(6):555-60.
- Munger, K. The role of human papillomaviruses in human cancers. *Front Biosci*, 2002; 7:641-9.
- Munoz, N.; Bosh, F. X.; de Sanjosé, S.; Herrero, R.; Castlesague, X., Shah, K.V.; Snijders, P.J.; Meijer, C.J. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Eng J Med*. 2003, 6: 518-27.
- Scholefield, J. H.; Sonnex, C.; Talbot, I.C.; Palmer, J.G.; Whatrup, C.; Mindel, A .; Northover, J.M. Anal and cervical intraepithelial neoplasia: possible parallel. *Lancet* 1989, 2(8666): 765-9.
- Veo, C.A .; Saad, S.S.; Nicolau, S.M.; Melani, A.G.; Denadai, M.V. Study on the prevalence of human papillomavirus in the anal canal of women with cervical intraepithelial neoplasia grade III. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2008; 140:103-7.
- Wheeler, C. M. Natural history of human papillomavirus infections, cytologic and histologic abnormalities and cancer, *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2008 Dec; 35:519-36.
- Zur Hausen, A . Papillomaviruses in the causation of human cancers — a brief historical account. *Virology*, 384 (2009) 260–265.

Legendas das Figuras

Fig. 1. Eletroforese pelo Agilent 2100 Bioanalyzer do produto da extração de DNA das amostras **(A)** de tecido perianal parafinizado (linhas 1 a 9), sangue congelado de pacientes com câncer gástrico (linhas 19 e 20) e **(B)** de mucosa gástrica parafinizada.

Fig 2. Eletroforese pelo Agilent 2100 Bioanalyzer do produto de amplificação do DNA das amostras com os primers de β -globina, GP5+/6+ e MY09/11 **(A)** de tecido perianal e **(B)** de mucosa gástrica. Controles: coluna C+ com sangue fresco adicionado o plasmídeo pBR322, contendo o genoma do HPV-16 (controle positivo) e coluna H2O com água destilada (controle negativo).

Fig 3. Eletroforese pelo Agilent 2100 Bioanalyzer do produto de amplificação do DNA das amostras com os primers de β -globina, GP5+/6+ e MY09/11 **(A)** de sangue congelado (19 e 20) e fresco (SgL), **(B)** tecido perianal em formalina, extraído com kit comercial QIagen (21Q) e com kit comercial Macherey-Nagel (21MN), **(C)** sangue congelado (19^a, 19B, 20^a e 20B), tecido perianal em formalina (21^a e 21B). Controles: coluna C+ com sangue fresco adicionado o plasmídeo pBR322, contendo o genoma do HPV-16 (controle positivo) e coluna H2O com água destilada (controle negativo).

Figuras



Fig. 1

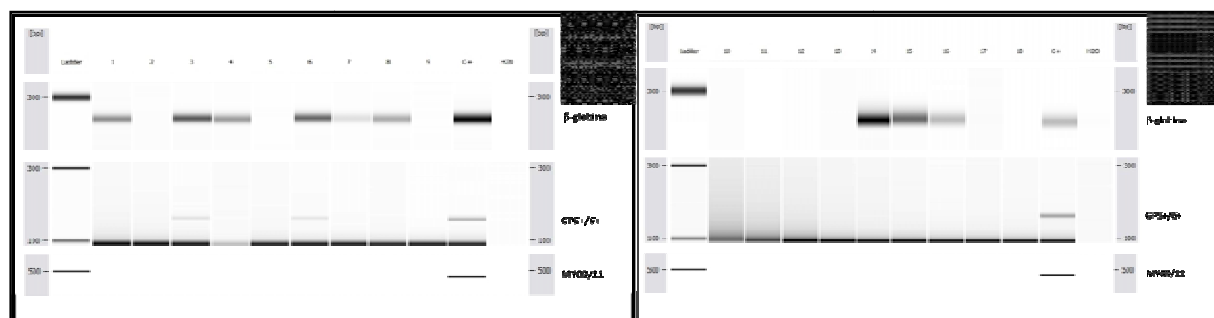


Fig. 2

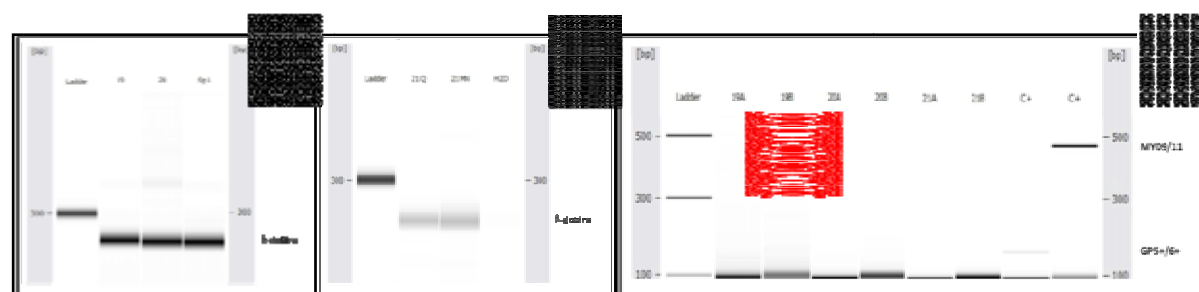


Fig. 3

Tabelas

Tabela 1 – Amostras avaliadas, diagnósticos histopatológicos e primers amplificados.

Amostra	Material	Diagnóstico Histopatológico	Primer amplificado	
1	Tecido perianal parafinizado	Mucosa normal	β -globina	
2	Tecido perianal parafinizado	Ectasia venosa		
3	Tecido perianal parafinizado	Condiloma acuminado	β -globina	GP5+/6+
4	Tecido perianal parafinizado	Carcinoma in situ	β -globina	
5	Tecido perianal parafinizado	Condilomas virais		
6	Tecido perianal parafinizado	Adenocarcinoma bem diferenciado	β -globina	GP5+/6+
7	Tecido perianal parafinizado	Adenocarcinoma medianamente diferenciado	β -globina	
8	Tecido perianal parafinizado	Adenocarcinoma bem diferenciado	β -globina	
9	Tecido perianal parafinizado	Carcinoma de células “em anel de sinete” metastático		
10	Mucosa gástrica parafinizada	Mucosa normal		
11	Mucosa gástrica parafinizada	Mucosa normal		
12	Mucosa gástrica parafinizada	Gastrite crônica ativa moderada associada ao <i>H. Pylori</i>		
13	Mucosa gástrica parafinizada	Carcinoma mal diferenciado		
14	Mucosa gástrica parafinizada	Carcinoma de células em “anel de sinete”	β -globina	
15	Mucosa gástrica parafinizada	Adenocarcinoma focal	β -globina	
16	Mucosa gástrica parafinizada	Carcinoma indiferenciado	β -globina	
17	Mucosa gástrica parafinizada	Adenocarcinoma mal diferenciado		
18	Mucosa gástrica parafinizada	Adenocarcinoma mal diferenciado		
19	Sangue congelado	Adenocarcinoma	β -globina	MY09/11
20	Sangue congelado	Adenocarcinoma	β -globina	
21	Tecido perianal em formalina	Condiloma acuminado	β -globina	
SgL	Sangue fresco	-	β -globina	
C+	Sangue fresco adicionado o plasmídeo pBR322	-	β -globina	GP5+/6+ MY09/11
H2O	Água destilada	-		

CAPÍTULO IV ANEXOS

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

- [1. The contents of Microbes and Infection](#)
- [2. Types of papers](#)
- [3. How to submit a manuscript](#)
- [4. Format](#)
- [5. Conventions](#)
- [6. Organization of original reports](#)
- [7. Format of reviews](#)
- [8. Short communication](#)
- [9. Reprints](#)
- [10. Copyright](#)

Indexed in Medline, Premedline, Excerpta Medica / EMBASE, Current Contents (Life Sciences), Biosis Previews, Science Citation Index⁷

1. The contents of Microbes and Infection

[page top](#) 

Droits de reproduction

Microbes and Infection publishes 15 peer-reviewed issues per year in all fields of infection and immunity, covering the different levels of host-microbe interactions, and in particular

- the molecular and cell biology of interactions between hosts and microbes (viruses, bacteria, parasites and fungi)
- the local response of infected organisms, including pathogenesis
- animal models of infectious diseases
- vaccine development
- all aspects of the immune response to infection

Clinical and epidemiological studies and accounts of clinical trials may be included.

Submission of pure case reports and veterinary studies is discouraged

Three special issues a year ("Forums") focus on the present knowledge of a virulent microbe and the disease it causes, or on critical issues relevant to the scope of the journal

2. Types of papers

[page top](#) 

Droits de reproduction

- original report
- review (commissioned)
- special issue (commissioned)
- short communication ; correspondence

3. How to submit a manuscript

[page top](#) 

Droits de reproduction

Please use our online e-submission site: <http://ees.elsevier.com/micinf>

Submission of revised manuscript: revision should be returned within three months
PLEASE NOTE:

BEFORE submitting and/or resubmitting your paper, it is imperative to have the entire manuscript checked by an English mother-tongue scientist. The journal does not correct the English syntax.

4. Format



Droits de reproduction

General information

Limit the abstract to 200 words or less; limit the text to 3 500 words or less. A maximum of 30 references is allowed; and a maximum of 6 figures and tables (total) is allowed.

Papers not respecting these rules will not be sent to the reviewers

Double-space throughout (including references, figure legends and table footnotes).

Use 2.5-cm (1 inch) margins on all four sides.

Use a font size of at least 12 points.

Number each page top right (title page is 1).

Number each chapter heading, starting with Introduction (see section 6.4. below)

Use either American or English spelling, but not both.

In general, do not use capital letters (except for first letter) for titles, authors names, section headings, etc.

When referring to figures in the main text, "figure" is abbreviated to Fig. (e.g., Fig. 1).

When referring to tables, use Arabic numerals (e.g., Table 2).

Differentiate between zero and the letter O, and between the number one and the letter "1".

5. Conventions



Droits de reproduction

5.1. *Microorganisms*

Follow guidelines of the International Nomenclature Committee. Genus and species are written in full the first time the name appears in text; subsequently, only use the first letter of the genus, followed by the species (e.g., *Escherichia coli*, then *E. coli*). Note the space between the genus abbreviation and the species.

5.2. *Units of measurement*

Follow the Système International (SI). Always respect the space between the number and the unit (e.g., 100 °C, 25 mg). Do not use commas for decimals. Use small "l" for liter.

5.3. *Use of italic/roman type*

Genetic loci are *italicized*; protein products of the loci are not italicized. Latin words in current use, such as *in vitro/vivo/situ*, *via*, *et al.*, *a posteriori*, etc., are not italicized (note the use of abbreviative points for expressions such as *cf.*, *e.g.*, *i.e.*, *et al.*, etc., which appear in roman type).

5.4. When using Greek letters, use the "font" command and not "insert".

6. Organization of original reports



Droits de reproduction

6.1. *Title page*

Title: avoid using uppercase letters other than the first word. Do not use nonstandard acronyms or abbreviations.

Authors' names: full first name followed by family name of each author. Superscript letters (^a, ^b, etc.), not numbers, link the author's name to his/her affiliation. The name of the author responsible for correspondence and proof correction is indicated by an asterisk (*) after the superscript letter. Use commas to separate names; do not use 'and' before the last author's name.

Affiliations: The complete address (department and/or laboratory, college, university, and full postal address) for each author, preceded by the superscript letter (^a, ^b, etc.) should follow the list of names.

Each address is in a separate paragraph.

Up-to-date telephone and fax numbers, e-mail address, and present, complete postal address of the corresponding author appear separately on the title page.

6.2. *Abstract and keywords*

Abstract: a maximum of 200 words, summarizing the objective, and major conclusions. Do not use references, footnotes or abbreviations in the abstract.

Keywords: below the abstract, provide a list of at least 3 keywords which exist in the MeSH® thesaurus. They are in uppercase letters, separated by semi-colons. They are used for indexing your paper and express the precise content.

6.3. *Abbreviations*

Used as an aid to the reader (therefore, sparingly), for words used at least 3 times, they are defined in the text the first time they appear, followed by the abbreviation in parentheses. Use this abbreviation thereafter.

6.4. *Main text of original reports*

Each chapter is numbered according to international standard (1. - 1.1. - 1.1.1., etc.). (See model below). For chapter headings, avoid using uppercase letters other than the first word, and do not use punctuation at the end.

The length of the main text should not exceed 3500 words.

Model for numbering of chapters

1. Introduction

2. Materials and methods

2.1. Infection models

2.1.1. Mouse model

1. Introduction: it should not summarize the results.

2. Materials and methods: avoid the use of commercial names.

3. Results: present the observations, with minimal reference to earlier literature and to interpretations.

4. Discussion: Avoid repeating parts of the Results.

5. Acknowledgments: personal acknowledgments precede those of agencies and institutions.

6.5. *References*

References are limited to 30

In main text

Numbered references appear in the main text between square brackets ([1], [2, 3], [4–7], etc.), in the order of appearance in the text, from 1 to n.

In reference list

Numbering corresponds to the references in the text; the list is not in alphabetical order. Journal titles are abbreviated according to Index Medicus and Biosis. Only published work and manuscripts in press (indicate the journal which has accepted them) appear in the list. Manuscripts in the submitted stage, or in preparation, and personal communications are designated "unpublished" in the text but are not numbered and do not appear in the list at the end.

Please use the order/style given in the following examples, as well as the exact punctuation. Use square brackets for the numbering.

Periodicals

[1] J.-M. Verger, M. Grayon, A. Cloeckaert, M. Lefèvre, E. Ageron, F. Grimont, Classification of *Brucella* strains isolated from marine mammals using DNA-DNA hybridization and ribotyping, Res. Microbiol. 151 (2000) 797-799.

Books

An entire volume:

[2] C. Melchiorre, M. Giannella (Eds.), Highlights in Receptor Chemistry, Elsevier, Amsterdam, 1984.

A chapter in a book:

[3] J.P. Buyniski, R.L. Cavanagh, A.W. Pircio, A.A. Algieri, R.R. Crenshaw, in: C. Melchiorre, M. Giannella (Eds.), Highlights in Receptor Chemistry, Elsevier, Amsterdam, 1984, pp. 195–215.

6.6 Legends of figures

Place all legends (including title for each) together on one page. Figures are consecutively numbered with Arabic numerals (Fig. 1, 2, etc.), according to the order of appearance in the main text.

6.7. Figures

a maximum of 6 figures and tables (total) is allowed.

Magnification is indicated by a scale bar.

In the text, indicate where figures should appear: these call-outs are written as "Fig.1, Fig.2", etc.

Help us reproduce your artwork with the highest possible standards — in both paper and digital format, by consulting: "How to prepare your graphics files" at the e-submission site for instructions, <http://ees.elsevier.com/micinf>

6.8. Tables

In the text, indicate where tables should appear: these call-outs for tables are written as "Table 1, Table 2, " etc.

Tables are consecutively numbered with Arabic numerals (Table 1, 2, etc.), according to the order of appearance in the main text. Each table carries a short title describing its contents in relation to the main text. Except for the heading and bottom of the table, avoid horizontal dividing lines; vertical lines are completely omitted from any table. Instead, the first column is left-aligned, and other columns are generally centered. (When making tables, use "insert" command and not "tabulation").

Only the first letter of each heading is capitalized, and any units appear in parentheses after or under the corresponding heading in roman characters. Footnotes are collected

under a table and referred to in the table by superscript letters (^a, ^b, etc.). References in tables are numbered between square brackets, e.g., [5].

7. Format of reviews



Droits de reproduction

Reviews do not exceed 5000 words. References are limited to 50. Reviews begin with an abstract of about 50 words, stating the topic of the review or summarizing its content. The main text may be divided into sections with subheadings, and it ends with a concluding section.

8. Short communications : follow the instructions for original reports. 100 words (abstract), 2000 words (main text), 20 references maximum, 3 figures/tables total.

9. Reprints



Droits de reproduction

We provide 25 free reprints. To purchase additional reprints, fill in the order form which accompanies the proofs and return it to the publisher together with the corrected proofs.

10. Copyright



Droits de reproduction

Submission implies that the paper reports original research, has not been published previously, is not under consideration for publication elsewhere, and will not be published in whole or in part elsewhere (in the same or in any other language). As soon as the article is accepted, the author is considered to have transferred his or her rights to the publisher; submit a permission request using the online form at

<http://www.elsevier.com/locate/permissionsJ>

January, 2010