

ANÁLISE *IN SILICO* DA VARIABILIDADE GENÉTICA DO GENE E7 DAS VARIANTES DO HPV 16

Tainá Maria Vidal dos Santos; Gabriella Silva Nogueira; Antônio Humberto Pereira da Silva Júnior.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE – CENTRO DE FORMAÇÃO DE PROFESSORES

antoniohumbertojr@yahoo.com.br

RESUMO:

O câncer cervical tem se constituído em um sério problema de saúde pública no mundo. Constitui-se na quarta maior causa de mortalidade, sendo o segundo tipo mais comum de câncer em mulheres com idade entre 15 e 44 anos. Estudos genéticos sugerem que as infecções persistentes por HPV atuam no processo de transformação celular e no desenvolvimento da neoplasia cervical. Dentre os seus constituintes genéticos, o gene E7 é um dos principais mediadores desta malignidade, contribuindo com a progressão das lesões estabelecimento do estágio de pré-câncer e de câncer invasivo. Este trabalho teve como objetivo analisar a diversidade genética *in silico* do gene E7, considerado um dos principais oncogenes virais relacionados ao câncer cervical. Foram utilizadas as sequências do gene E7 dos 10 subtipos de HPV16, depositadas no banco do NCBI. Para a identificação dos sítios polimórficos utilizou-se o programa MEGA6, e para a identificação de regiões de epítomos, os programas ProPredI e ProPredII. Os resultados apontam para um total de 6 regiões polimórficas do gene E7, localizadas nas posições 647, 666, 732, 789, 795 e 846 do genoma do HPV16. Das variantes estudadas, sete apresentaram regiões polimórficas. Analisando a sequência de aminoácidos da oncoproteína E7, tem-se apenas uma variação não-sinônima N29S, sugerindo que a maioria das regiões polimórficas identificadas no gene E7, são do tipo sinônimas, mostrando uma conservação destes sítios. Além disso, essas variantes apresentam epítomos imunogênicos com moléculas do MHC classe I, simbolizando o seu papel nos mecanismos de escape imunológico para a progressão das lesões cervicais.

Palavras-Chave: HPV, E7, câncer cervical.

INTRODUÇÃO

O câncer cervical tem, como uma das suas principais causas, as infecções pelo papilomavírus humano, estando relacionado em mais de 95% dos casos de carcinoma cervical (CHATURVEDI, 2010).

Mundialmente, a incidência de casos de câncer cervical é de 14/100.000 habitantes, sendo maior nos países em desenvolvimento, com cerca de 15,7 casos para cada 100.000 habitantes, e menor em países desenvolvidos, co

m uma taxa de 9,9 casos a cada 100.000 habitantes. No Brasil, a incidência de novos diagnósticos de câncer cervical foram de 18.503 novos casos e 8.414 óbitos no ano de 2012, sendo considerada a quarta maior causa de mortes no Brasil, suplantadas pelo câncer de mama, pulmão e coloretal (GURGEL, 2015).

O exame citológico é o método mais amplamente utilizado para prevenção do câncer cervical, contudo ainda apresenta algumas falhas como baixa sensibilidade e

(83) 3322.3222

contato@conbracis.com.br

www.conbracis.com.br

divergência na interpretação das lesões. Alguns países têm adotado o rastreamento do câncer cervical pela detecção do HPV, entretanto, este teste apresenta baixa especificidade, além disso, não demonstra o estágio em que a infecção se encontra, nem o quanto poderá evoluir clinicamente (DERCHAIN *et al.*, 2005).

As infecções persistentes causadas pelos HPVs de alto risco (HR HPV) estão relacionadas com cânceres em diversos sítios corporais em humanos, tais como na cérvix, orofaringe, pênis, ânus, vagina e vulva (JEMAL *et al.*, 2013). Recentes estudos têm mostrado uma diminuição na incidência dos casos e mortes causadas pelo câncer cervical (JEMAL *et al.*, 2013; VACCARELLA *et al.*, 2013). Contudo, os casos de cânceres não cervicais associados a uma infecção persistente causada por HR HPVs tem aumentado, especialmente nos casos de câncer da orofaringe e do ânus (JEMAL *et al.*, 2013).

É importante salientar, que diversos cofatores podem contribuir com a patogenicidade das infecções provocadas pelo HPV. Dentre os inúmeros fatores ambientais que podem estar relacionados podemos citar o uso de contraceptivos orais, tabagismo e a possibilidade da paciente apresentar co-infecções, por exemplo, clamídea e HIV (DE FREITAS *et al.*, 2012; AMARAL *et al.*,

2014). A própria natureza genética do hospedeiro infectado pode contribuir no curso da carcinogênese, no que se refere à susceptibilidade imunológica do hospedeiro (JIANG *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2008; AMARAL *et al.*, 2014).

Morfológicamente, os papilomavírus representam um grupo de vírus não-envelopados, com um capsídeo icosaédrico, com cerca de 55nm de diâmetro. O seu genoma codifica proteínas envolvidas para a formação do capsídeo (proteínas L1 e L2) e diversas proteínas não estruturais, codificadas pelos genes E1, E2, E3, E4, E5, E6 e E7 (figura 1), alguns podendo estar ausentes (VAN DOORSLAER, 2013).

Os oncogenes E5, E6 e E7 possuem as funções de estimular a proliferação celular, estimulando a sua sobrevivência e modulando a diferenciação dos queratinócitos (DIMAIO; PETTI, 2013). Por sua vez, a oncoproteína E7 apresenta um papel fundamental nesta transformação celular. Atua degradando as proteínas da família do retinoblastoma (pRb), o que afeta diretamente na manutenção correta do ciclo celular. Sua degradação leva à proliferação celular. Além disso, E7 também atua degradando outras proteínas importantes de controle do ciclo celular, como a proteína p21, que se ativa na presença de algum dano celular e atua nos mecanismos de resposta aos

danos e reparo dos erros (ROMAN; MUNGER, 2013).

Dentre os diversos processos biológicos de atuação da oncoproteína E7 dos HR HPVs, estão amplificação do genoma do HPV durante a replicação viral, a imortalização celular em cooperação com E6, inibição de CDK2, aumento da expressão de E2F2, alterações mitóticas, bloqueio dos mecanismos apoptóticos, quebras na dupla fita de DNA, inibição da senescência, instabilidade protéica, a exemplo dos baixos níveis da proteína p53, dentre outras ações (ROMAN; MUNGER, 2013).

Dessa maneira, muitos estudos têm mostrado uma associação entre a variabilidade genética dos HPVs na persistência e progressão das lesões até o estabelecimento do câncer cervical (BURK et al., 2003; BURRONI et al., 2013). As alterações nas sequências dos nucleotídeos dos HR HPVs podem alterar o seu potencial oncogênico, levando algumas variantes a tornarem-se mais oncogênicas do que outras.

A importância do estudo da heterogeneidade genética dos HPVs é de suma importância para se avaliar os riscos de desenvolvimento de lesões cervicais, em especial, aqueles considerados de alto risco, a exemplo do HPV16, -18 e do -31 (BURK et al., 2003; QUINT et al., 2010; ZUNA et al., 2011).

Sendo assim, o conhecimento da diversidade genética encontrada no genoma destas variantes, em especial, nos genes que são responsáveis pela invasão e proliferação dos queratinócitos, torna-se um dado importante no entendimento do grau de patogenicidade causada pela infecção (BURK et al., 2013).

O presente trabalho tem por objetivo realizar uma análise *in silico* da variabilidade genética do gene E7 do HPV16 e avaliar a repercussão biológica destas alterações nucleotídicas, que podem levar a tornar uma variante mais patogênica no curso da carcinogênese.

METODOLOGIA

Mineração dos Dados Genômicos

A obtenção das sequências genômicas do gene E7 das variantes do HPV16, se deu através do banco de dados do National Center of Biotechnology Information (NCBI), utilizando-se os acessos de referência fornecidos em BURK et al. 2013.

A sequências depositadas no NCBI foram coletadas e, seguidas, posteriormente, para a análise da variabilidade do gene E7.

Alinhamento Múltiplo

Para a realização do alinhamento das sequências, utilizou-se o programa Molecular

Evolutionary Genetics Analysis versão 6.0 (MEGA6).

As sequências foram alinhadas utilizando-se a ferramenta ClustalW e, posteriormente, investigado os sítios polimórficos das sequências variantes do HPV16.

O programa MEGA também permite a obtenção da sequência de aminoácidos da proteína E7 do HPV16, além de identificar variações nestas sequências.

As sequências obtidas das variantes foram submetidas à uma análise filogenética, utilizando-se o algoritmo de Neighbor-Joining, para a identificação das linhagens e sublinhagens.

Análise de Predição de Epítomos Imunogênicos

Para a identificação de possíveis epítomos imunogênicos de MHC classe I e MHC classe II, foram utilizados os programas ProPred I e ProPred II.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Identificação das Regiões Polimórficas

O HPV16 faz parte da família dos alfapapilomavírus. Nesta famílias, também fazem parte outros HPVs como o HPV31, HPV33, HPV35, HPV52, HPV58, e HPV67 (BURK *et al.*, 2013).

O alvo deste estudo, o HPV16, é considerado de alta prevalência na população brasileira, em especial no Nordeste do Brasil (GURGEL *et al.*, 2015). Muitos estudos têm demonstrado que variantes do HPV16 podem afetar a oncogenicidade, persistência e progressão da infecção viral (ZUNA *et al.*, 2011).

No banco de dados do NCBI, são encontradas quatro linhagens para o HPV16, sendo classificadas em A, B, C e D e dez sublinhagens, classificadas em A1, A2, A3, A4, B1, B2, C, D1, D2 e D3. Estas variantes oncogênicas apresentam diferentes graus de patogenicidade, sendo a variante D, com maior grau de associação com os riscos de desenvolver lesão cervical e câncer (BERUMEN *et al.*, 2001; ZUNA *et al.*, 2011).

Sendo assim, as alterações nucleotídicas observadas no gene E7 podem estar relacionadas com a persistência viral e a progressão das lesões, visto a natureza de atuação celular deste gene. Suas sequências disponibilizadas no banco de dados do NCBI, permitiram a identificação de 06 (seis) regiões polimórficas, localizadas nas posições 647, 666, 732, 789, 795 e 846 do genoma completo do HPV16.

O gene E7, tem seu início na posição 562 até a posição 858 do genoma completo do HPV16, compreendendo 296 nucleotídeos.

Foram observados, na posição 647 do genoma, a variação A/G, em três isolados (3/10), os isolados AF534061.1, HQ644298.1 e AF472509.1. Na posição 666, identificou-se um total de isolados de 1/10, com a variação G/A, correspondendo ao isolado HQ644236.1; na posição 732, a variação T/C nos isolados AY686579.1, totalizando 2/10; na posição 789, a variação T/C com 6/10 isolados, sendo eles o AF536180.1, HQ644298.1, AF472509.1, HQ644257.1, AY686579.1 e AF402678.1 e, pode-se observar, que nestes últimos isolados com variação na posição 789, também evidenciou-se uma variação na posição 795 do tipo T/G, totalizando os mesmos 6/10 isolados. E, finalmente, foi identificado, na posição 846, a variação T/C em apenas um dos isolados, o AF534061.1 (tabela 1).

Em estudo realizado por GURGEL *et al.*, 2015, O HPV16, seguido do HPV31 e do HPV58 foram os mais prevalentes na população do nordeste brasileiro, sendo a distribuição dos alfa-papilomavírus, bastante frequente em nossa região. Os resultados obtidos na análise de variabilidade genética do gene E7 do HPV16 reforça os achados na literatura sobre a patogênese deste tipo viral na carcinogênese cervical, além de identificar as variantes genéticas que possam estar mais correlacionadas com um curso mais agressivo ao longo da infecção viral e

com os dados clínicos e citológicos das pacientes portadoras de infecções por HR HPVs.

A relação filogenética destes subtipos de HPV16, baseada no estudo do oncogene E7, pode contribuir na identificação de novas linhagens circulantes numa dada população, com novas variações e com diferentes potenciais oncogênicos (figura 2).

Análise da Sequência de Aminoácidos

A análise *in silico* das sequências do gene E7 dos subtipos do HPV16, depositadas no banco de dados do NCBI, permitiu, com o uso das ferramentas do programa MEGA, identificar a sequência de aminoácidos destes subtipos virais do HPV16 (BURK *et al.*, 2013).

Os dados obtidos demonstraram que a existência de alterações nas sequências de nucleotídeos do gene E7 do HPV16, em 07 isolados, mostrou alterações do tipo sinônima. Nos outros 03 isolados, a modificação observada foi na posição N29S, uma troca de uma asparagina por uma serina (tabela 2), o que pode interferir na composição da estrutura tridimensional da proteína, alterando sítios de ligação às proteínas de defesa do organismo infectado, bem como afetando fatores de controle da progressão do ciclo celular e descontrole da proliferação e dos mecanismos

apoptóticos, contribuindo com o aumento da longevidade celular (GURGEL *et al.*, 2015).

Predição de Epítomos Imunogênicos

No mecanismo de infecção, uma das principais ações que precisam ser constantemente investigadas, diz respeito à forma de interação das oncoproteínas do HPV com as moléculas mediadoras da resposta imune no hospedeiro. Embora muito se saiba dos mecanismos de evasão imunológica mediada pelo vírus, conhecer as suas inter-relações podem favorecer a elaboração de estratégias de combate à progressão das lesões cervicais (DE FREITAS, 2012).

Os resultados *in silico* apontam para a existência de epítomos imunogênicos da oncoproteína E7 com moléculas pertencentes ao sistema imunológico.

As variantes N29S, apresentaram, para esta região da proteína, epítomos com moléculas de classe I do MHC, como a HLA-A24, HLA-A*3302, HLA-B*3501, HLA-B*5101, HLA-B*5401, HLA-B*51, HLA-B*5801 e MHC-Kk.

Em relação ao MHC classe II, não se observou, para a variação N29S, os epítomos imunogênicos.

No entanto, analisando-se outras regiões do gene E7, dos 10 subtipos estudados, é notável que a oncoproteína E7 apresenta epítomos imunogênicos em outras regiões da

sua cadeia protéica, reforçando a possibilidade de diferentes formas de atuação das variantes virais, sobre o sistema imunológico do hospedeiro.

CONCLUSÕES

O estudo destas relações moleculares entre o vírus e a natureza do hospedeiro, são primordiais para a elaboração de estratégias mais eficazes de controle e de combate ao câncer cervical.

Os polimorfismos encontrados nas variantes do gene E7 do HPV16, simboliza a diversidade gênica que estes vírus podem sofrer ao longo do processo de adaptação à cada nova condição a ele submetida, favorecendo o surgimento de linhagens cada vez mais heterogêneas e, possivelmente, capazes de potencializar os seus efeitos no curso da carcinogênese cervical.

Os exames preventivos, a exemplo do teste Papanicolau, precisam ser incentivados na população, bem como a administração das vacinas profiláticas.

Esta heterogeneidade encontrada no gene E7 do HPV16, um tipo considerado de alto risco, aponta para a necessidade de maiores investigações moleculares, especialmente no que se refere aos mecanismos de escape imunológico mediados pelo vírus, sendo, dessa forma, necessários mais análises para elucidar as vias de interação com moléculas

do MHC, dado a essas inúmeras variantes de HPV16 encontradas na população.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, C. M. et al. MDM2 polymorphism associated with the development of cervical lesions in women infected with Human papillomavirus and using of oral contraceptives. *Infectious Agents and Cancer*, v. 9, n. 1, p. 24, 18 jul. 2014.
- BERUMEN, J. et al. Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 93, n. 17, p. 1325–1330, 5 set. 2001.
- BURK, R. D. et al. Distribution of human papillomavirus types 16 and 18 variants in squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the cervix. *Cancer research*, v. 63, n. 21, p. 7215–7220, 1 nov. 2003.
- BURK, R. D.; HARARI, A.; CHEN, Z. Human papillomavirus genome variants. *Virology*, v. 445, n. 1-2, p. 232–243, out. 2013.
- BURRONI, E. et al. Codon 72 polymorphism of p53 and HPV type 16 E6 variants as risk factors for patients with squamous epithelial lesion of the uterine cervix. *Journal of medical virology*, v. 85, n. 1, p. 83–90, jan. 2013.
- CHATURVEDI AK (2010) Beyond cervical cancer: burden of other HPV-related cancers among men and women. *J. Adolesc. Health* 46: S20-S26.
- DE FREITAS, A. C. et al. Susceptibility to cervical cancer: An overview. *Gynecologic Oncology*, 4 abr. 2012.
- DERCHAIN SFM, LONGATTO FILHO A, SYRJANEN KJ (2005) Neoplasia intraepitelial cervical: diagnóstico e tratamento. *Rev Bras Ginecol Obstet* 27:425-33.
- DIMAIO, D.; PETTI, L. M. The E5 proteins. *Virology, Special Issue: The Papillomavirus Episteme*. v. 445, n. 1–2, p. 99–114, out. 2013.
- GURGEL, APAD et al. Prevalence of Human Papillomavirus Variants and Genetic Diversity in the L1 Gene and Long Control Region of HPV16, HPV31, and HPV58 Found in North-East Brazil. *BioMed Research International*. vol. 2015, Article ID 130828, 12 pages, 2015.
- JEMAL, A. et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975–2009, Featuring the Burden and Trends in Human Papillomavirus (HPV)–Associated Cancers and HPV Vaccination Coverage Levels. *Journal of the National Cancer Institute*, p. djs491, 7 jan. 2013.
- JIANG, P. et al. Role of p53 and p21 polymorphisms in the risk of cervical cancer among Chinese women. *Acta Biochimica Et*

Biophysica Sinica, v. 42, n. 9, p. 671–676, set. 2010.

OLIVEIRA, S. et al. The p53 R72P polymorphism does not influence cervical cancer development in a portuguese population: A study in exfoliated cervical cells. Journal of Medical Virology, v. 80, n. 3, p. 424–429, 1 mar. 2008.

QUINT, K. D. et al. HPV genotyping and HPV16 variant analysis in glandular and squamous neoplastic lesions of the uterine cervix. Gynecologic oncology, v. 117, n. 2, p. 297–301, maio 2010.

ROMAN, A.; MUNGER, K. The papillomavirus E7 proteins. Virology, Special Issue: The Papillomavirus Episteme. v. 445, n. 1–2, p. 138–168, out. 2013.

VACCARELLA, S. et al. Worldwide trends in cervical cancer incidence: Impact of

screening against changes in disease risk factors. European Journal of Cancer, v. 49, n. 15, p. 3262–3273, 1 out. 2013.

VAN DOORSLAER, K. Evolution of the Papillomaviridae. Virology, Special Issue: The Papillomavirus Episteme. v. 445, n. 1–2, p. 11–20, out. 2013.

ZUNA, R. E. et al. HPV16 variant lineage, clinical stage, and survival in women with invasive cervical cancer. Infectious Agents and Cancer, v. 6, n. 1, p. 19, 28 out. 2011.

FIGURA 1: Organização genômica do HPV16. O gene E7 encontra-se na posição 562 à 858, com um total de 296 nucleotídeos. Dados obtidos do banco de dados NCBI (acesso em 19 de maio de 2016).

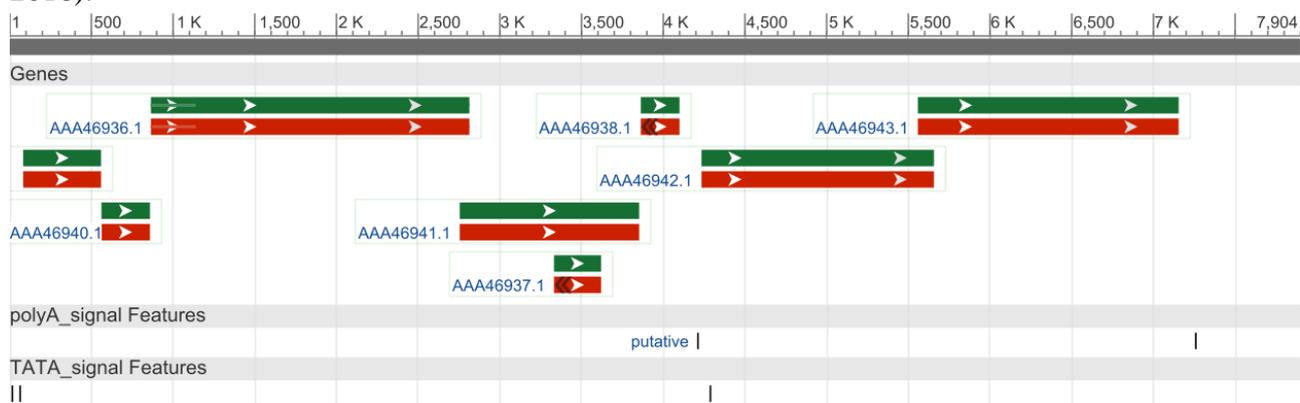


TABELA 1: Variações nucleotídicas encontradas nos isolados do gene E7 do HPV16 (acesso disponível em Burk et al., 2013).

Acesso no	HPV	Posição no	Número de	Polimorfismo
-----------	-----	------------	-----------	--------------

GenBank	Linhagem Tipo	Genoma	Isolados	
K02718.1 HPV16/A	Sequência de referência	Sequência de referência	Sequência de referência	Sequência de referência
AF536179.1 HPV16/A	HPV16 Isolate European German 131	-	-	-
HQ644236.1 HPV16/A	HPV16 Isolate AS411	666	1/10	G/A
AF534061.1 HPV16/A	HPV16 Isolate East Asian type	647 846	3/10 1/10	A/G T/C
AF536180.1 HPV16/B	HPV16 Isolate African-1 type	789 795	6/10 6/10	T/C T/G
HQ644298.1 HPV16/B	HPV16 Isolate Z109	647 789 795	3/10 6/10 6/10	A/G T/C T/G
AF472509.1 HPV16/C	HPV16 Isolate variant (African type 2)	647 789 795	3/10 6/10 6/10	A/G T/C T/G
HQ644257.1 HPV16/D	HPV16 Isolate Qv00512	789 795	6/10 6/10	T/C T/G
AY686579.1 HPV16/D	HPV16 Isolate Qv15321AA	732 789 795	2/10 6/10 6/10	T/C T/C T/G
AF402678.1 HPV16/D	HPV16 Isolate Asian-American variant	732 789 795	2/10 6/10 6/10	T/C T/C T/G

TABELA 2: Segmento do gene E7 dos subtipos virais do HPV16. A sequência de aminoácidos destacada tem início na posição 11 e finaliza na posição 39. Observa-se a variação dos tipos N29S em três, dos 10 subtipos estudados.

Acesso no GenBank	Origem	Sequência de Aminoácidos (Fragmento da Proteína E7 do HPV16)
K02718.1	Sequência de referência	TTDLYCYEQL N DSSEEEDEID
AF536179.1	HPV16 Isolate European German 131	TTDLYCYEQL N DSSEEEDEID
HQ644236.1	HPV16 Isolate AS411	TTDLYCYEQL N DSSEEEDEID
AF534061.1	HPV16 Isolate East Asian type	TTDLYCYEQL S DSSEEEDEID
AF536180.1	HPV16 Isolate African-1 type	TTDLYCYEQL N DSSEEEDEID
HQ644298.1	HPV16 Isolate Z109	TTDLYCYEQL S DSSEEEDEID
AF472509.1	HPV16 Isolate variant (African type 2)	TTDLYCYEQL S DSSEEEDEID

HQ644257.1	HPV16 Isolate Qv00512	TTDL Y CYEQLNDSSEEEDEID
AY686579.1	HPV16 Isolate Qv15321AA	TTDL Y CYEQLNDSSEEEDEID
AF402678.1	HPV16 Isolate Asian-American variant	TTDL Y CYEQLNDSSEEEDEID

FIGURA 2: Relações filogenéticas das sublinhagens do HPV16, baseados na análise da sequência do gene E7 do HPV16, depositada no banco de dados do NCBI.

