

# O papel da proteína HBx no desenvolvimento do hepatocarcinoma celular

## *The role of HBx protein in the development of hepatocellular carcinoma*

Maria Aparecida da Silva Pinhal, Michelle Remião Ugolini,  
Juliana Pinto Moreira Santos, Luciene Satye Taniguti

Recebido: 1/2/2007  
Aprovado: 23/5/2007

### Resumo

A infecção crônica causada pelo vírus da hepatite B, conhecido como HBV, está fortemente associada ao aparecimento do hepatocarcinoma (HCC), um tumor maligno com mau prognóstico, cujo desenvolvimento é relacionado à proteína X do referido vírus. A integração do DNA viral, que codifica a proteína HBx no genoma da célula hospedeira, aumenta a expressão dessa proteína e, conseqüentemente, aumenta sua interação com os genes e proteínas reguladoras da célula hospedeira. A proteína HBx desenvolve uma variedade de funções biológicas, como transativação genética, interação com a proteína P53, interferência no reparo do DNA, repressão de proteólises fisiológicas, modulação da proliferação celular e apoptose e indução da migração de células malignas, apresentando também importante papel no desenvolvimento do HCC associado à infecção pelo HBV. Entretanto, diferentes níveis de expressão do gene da HBx em hepatócitos determinam resultados diversos e até opostos em relação ao ciclo celular e apoptose. Através de inúmeros mecanismos, a proteína HBx é capaz de coordenar o balanço entre proliferação celular e morte celular programada, o que é determinante no desenvolvimento do HCC, principalmente em pacientes com infecção crônica por HBV.

### Unitermos

Vírus da hepatite B (HBV); Hepatocarcinoma celular (HCC); proteína X do vírus da hepatite B (HBx); P53; fator nuclear kappa-B (NF-kB); PTEN (gene supressor de tumor).

### Abstract

Hepatitis B virus chronic infection is strongly associated to the development of the hepatocellular carcinoma (HCC), a malignant tumor presenting poor prognosis, which is associated to Hepatitis B virus X protein (HBx). The interaction of viral DNA encoding HBV transactivator X protein enhances HBx expression and subsequent interaction with cellular genes and regulatory proteins. HBx performs a variety of biological functions, such as gene transactivation, P53 protein interaction, interferes with DNA repair, repression of physiological proteolysis, modulation of cell proliferation and apoptosis, induction of malignant cell migration, playing an important role in the development of HCC associated with Hepatitis B virus (HBV) infection. However, different levels of HBx expression in the hepatocytes results in distinct and opposite cellular responses of cell cycle and apoptosis. Through a variety of mechanisms, the expression of HBx protein may coordinate the balance between cell proliferation and apoptosis, which is essential for the development of HCC, mostly in patients chronically infected with HBV.

### Keywords

Hepatitis B virus (HBV); hepatocellular carcinoma (HCC); hepatitis B X protein (HBx); P53; nuclear factor kappa-B (NF-kB); PTEN (tumor suppressor gene).

## Introdução

O hepatocarcinoma celular (HCC), classificado como um câncer primário de fígado, se origina de hepatócitos e equivale a 80% dos casos de câncer de fígado, encontrado em uma frequência três vezes maior em homens do que em mulheres<sup>1</sup>. É o 5º tumor maligno mais freqüente no mundo<sup>2</sup> e a faixa etária com maior predomínio de ocorrência desta patologia nos Estados Unidos e na Europa está entre as 6ª e 7ª décadas; enquanto que, em áreas onde há grande incidência, o tumor ocorre em pacientes mais jovens, entre as 3ª e 5ª décadas. Em muitas regiões da África e da Ásia, o HCC corresponde a cerca de 20 a 30% de todos os tipos de doenças malignas, contra apenas 1 a 2% nas Américas do Norte e Sul e na Europa<sup>1</sup>.

O hepatocarcinoma celular pode ser prevenido, sendo a prevenção classificada em primária e secundária. A prevenção primária é baseada principalmente na interrupção, através da utilização de vacinas, da transmissão do vírus da hepatite B (HBV), cuja infecção crônica está fortemente associada ao desenvolvimento do HCC. Já a prevenção secundária depende da detecção precoce do tumor, constando da sua remoção cirúrgica quando ainda não se desenvolveram as repercussões clínicas do HCC (mal estar geral, dor abdominal, sensação de abdome cheio, anorexia, perda de peso, ascite, icterícia, náuseas, vômitos e febre), mas a dosagem no sangue da alfafetoproteína (um marcador tumoral produzido em 75 a 80% dos fígados acometidos pelo HCC mas não pelo fígado normal) pode ser detectada<sup>1</sup>. A alfafetoproteína (AFP) é uma proteína predominantemente fetal que sinaliza o desenvolvimento hepático. É secretada por células derivadas do endoderma do saco vitelínico, fígado e intestino fetal. Ao nascer, sua expressão é silenciada, não podendo mais ser detectada em adultos, exceto nos casos de regeneração hepática ou HCC<sup>3</sup>. O exame para detecção de AFP é recomendado nos casos de suspeita de HCC<sup>4</sup>.

Chama muita atenção no diagnóstico do câncer do fígado, o seu pequeno tempo de evolução; ou seja, ao diagnóstico, o paciente apresenta uma doença geralmente muito avançada e um tempo de aparecimento da sintomatologia muito curto. Além disso, tempo que o HCC leva para duplicar o volume de massa tumoral é muito rápido em comparação com outros tumores, sendo, em média 4 meses. A sobrevida após o diagnóstico de um paciente com HCC clinicamente detectável é extremamente curto, assim considerando, o índice de mortalidade passa a ser de praticamente 100%<sup>4</sup>. Devido a essa rápida e silenciosa evolução e à falta de tratamentos responsivos, o HCC é a 3ª causa de morte por câncer no mundo<sup>2</sup>.

Por meio de testes sorológicos e detecção de seqüências de ácido nucléico viral integrados ao genoma das células tumorais, o hepatocarcinoma celular foi fortemente associado à persistência da infecção pelo vírus da hepatite B (HBV), um vírus de DNA com envoltório, pertencente à família hepadnaviridae<sup>5</sup>. O HCC associado ao HBV está entre os dez mais freqüentes cânceres do mundo e o risco relativo de que um portador do HBV desenvolva o HCC é de aproximadamente 1:200, um dos maiores riscos relativos conhecidos de cânceres<sup>6</sup>. Recentemente foi estimado que 53% dos casos de

HCC estavam relacionados à infecção por HBV<sup>7</sup>. A associação entre o surgimento do HCC e infecção pelo vírus da hepatite B será posteriormente discutida neste trabalho.

A infecção pelo HBV é encontrada em todo o mundo, com taxas de prevalência bastante variadas<sup>5</sup>, o que determina uma distribuição geográfica muito heterogênea da incidência do HCC<sup>2</sup>. Portadores crônicos do HBV constituem o maior reservatório da infecção; em alguns países, particularmente no Oriente Médio, 5 a 15% dos habitantes são portadores do vírus, apesar de a maioria ser assintomática<sup>5</sup>. Nos Estados Unidos, é estimado que 1,5 milhões de pessoas estejam infectadas pelo vírus da hepatite B e que 300.000 novos casos ocorram anualmente<sup>5</sup>. Cerca de 300 desses indivíduos morrem com hepatite aguda fulminante e em torno de 5 a 10% dos pacientes infectados tornam-se portadores crônicos. Além disso, aproximadamente 4.000 pacientes morrem anualmente de cirrose relacionada à hepatite B, e 1.000 de hepatocarcinoma celular<sup>5</sup>.

A principal forma de transmissão do HBV é a direta, pelo contato pessoal, íntimo com fluidos corporais de indivíduos infectados. O antígeno de superfície do HBV (HbsAg) pode ser encontrado na maioria dos fluidos corporais, incluindo o sangue, a saliva, o sêmen e as secreções cervicais. Da mesma forma, a transmissão da mãe para o filho na hora do parto também é comum. Em condições experimentais, uma quantidade mínima de 10<sup>-4</sup> mL de sangue contaminado é capaz de causar infecção<sup>8</sup>.

O resultado da infecção pelo HBV depende do equilíbrio entre o inóculo viral, a capacidade patogênica do vírus e as defesas do hospedeiro. Se a quantidade de células infectadas é pequena e a defesa é adequada, a infecção pode ser curada espontaneamente, sem sintomas, caracterizando a forma subclínica da hepatite B. Se a quantidade de células infectadas é grande, a infecção pode determinar o surgimento da doença infecciosa (30%)<sup>4</sup>. Na Figura 1 estão relacionadas as manifestações clínicas da hepatite B, as frequências com que ocorrem e as suas possíveis conseqüências<sup>9</sup>.

Em alguns poucos casos (0,1-0,5%), a resposta imunológica do hospedeiro contra o vírus é tão exagerada que há destruição maciça dos hepatócitos (hepatite fulminante), o que pode ser fatal. Cerca de 50% dos casos de hepatite fulminante estão relacionados à infecção pelo HBV. Seu principal sintoma é o desenvolvimento de alterações neurológicas (sonolência, confusão mental), além de sangramentos e dificuldade respiratória<sup>4</sup>.

Em cerca de 3-8% dos adultos, a defesa imunológica não consegue destruir as células infectadas e a inflamação (hepatite) persiste. Quando a persistência da infecção é maior que seis meses, definindo assim o quadro de hepatite crônica, as chances de cura espontânea são muito baixas<sup>4</sup>.

No caso de crianças que entram em contato com o vírus no parto, o sistema imunológico ainda é, nesta fase, incapaz de desenvolver resposta imune protetora. Isto faz com que um grande número de células se infecte e que, com o tempo,

o sistema imune desenvolva uma “tolerância”, determinando hepatite crônica em 90% dos casos. Em crianças de 1 a 5 anos, o risco de hepatite crônica já diminui para 20-50%<sup>4</sup>.

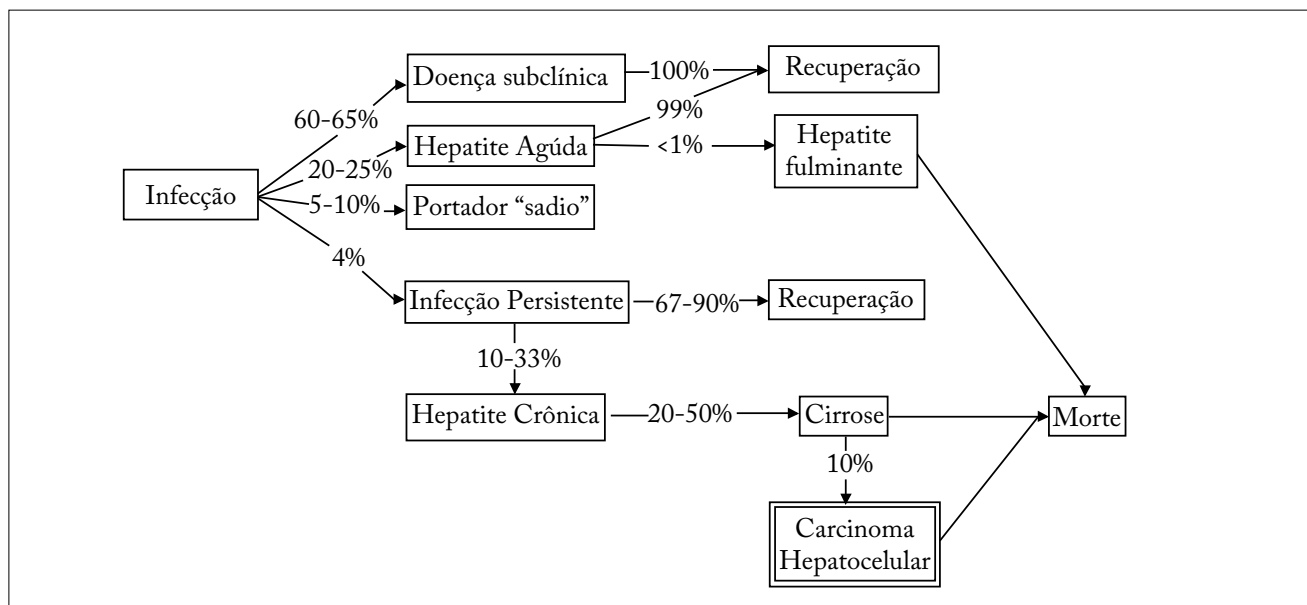
Na hepatite B crônica ativa, a presença contínua de focos inflamatórios resulta em necrose dos hepatócitos, colapso da trama reticular do fígado e fibrose progressiva desencadeando, portanto, a cirrose hepática. Cerca de até 50% das pessoas com cirrose irá desenvolver HCC, mas o carcinoma hepatocelular pode surgir mesmo antes da cirrose. De fato, o risco anual de desenvolvimento do HCC é de 0,06-0,3% em portadores sãos, 0,5-0,8% em pacientes com hepatite crônica ativa e 1,5-6,6% em pacientes com cirrose<sup>4</sup>.

O diagnóstico da hepatite B pode ser feito através de exames sorológicos que identifiquem partículas virais (como a HBsAg e a HBeAg) e anticorpos de fase aguda e crônica (como o Anti-HBc IgG, o Anti-HBc IgM, e o Anti-HBs IgG)<sup>4</sup>. Um estudo recente demonstrou que o exame de HBsAg positivo (um antígeno de superfície viral) aumentava em 27-37 vezes o risco de desenvolvimento de HCC se comparado a indivíduos não infectados<sup>10,11</sup>. O risco de desenvolvimento do HCC também se elevava quanto maior fosse a carga viral do indivíduo infectado<sup>12</sup>.

Atualmente estão descritos 8 genótipos de HBV (de A a H), entretanto os dados que correlacionam determinados genótipos virais com a patogênese do HCC relacionado ao HBV ainda são por demais controversos<sup>13,14</sup>. O capsídeo do HBV apresenta simetria icosaédrica e guarda em seu interior o DNA circular parcialmente duplicado e o complexo da polimerase. Seu genoma possui seis genes, sendo quatro de função conhecida: C, P, S e X<sup>8</sup>.

O gene C e a região Pré-C codificam os antígenos do esqueleto (HBcAg), formador do capsídeo e o HbeAg (antígeno solúvel, não estrutural), que podem ser reconhecidos pelo sistema imune; o gene P codifica uma polimerase, que tem com função a duplicação do DNA, e a realização da transcrição reversa; o gene S é a região do genoma que codifica as proteínas que constituem espículas presentes no envoltório externo, sendo elas: LHBsAg; MHBsAg e SHBsAg, os quais correspondem a, respectivamente, 20 a 30%; 20 a 60% do HBsAg. No processo de infecção do hepatócito; a proteína S participa como elemento de adsorção do HBV à membrana hepatocítica; através de uma região de ligação com albumina sérica humana<sup>8</sup>. Agregados de HbsAg assim como o próprio DNA viral são frequentemente encontrados em abundância no soro durante a infecção, o que indica a presença de vírions no organismo<sup>5</sup>.

O gene X codifica a proteína HBx, uma proteína reguladora multifuncional que atua como transativadora indireta da transcrição dos genes virais, além de muitos genes da célula hospedeira, por interagir com inúmeras proteínas celulares, exibindo uma atividade pleiotrópica<sup>2,5,15-17</sup>. A HBx é essencial na manutenção da replicação viral e parece estar intimamente relacionada com o desenvolvimento do HCC em pacientes com hepatite B crônica. HBx foi desempenha um papel importante causando ausência da regulação da replicação dos hepatócitos através de diversos mecanismos, levando ao desenvolvimento do HCC. Neste trabalho, será abordada a importância da HBx no desenvolvimento do HCC e os mecanismos por ela mediados.



**Figura 1**  
**Esquema dos potenciais da infecção pelo vírus da hepatite B em adultos.**  
**As percentagens indicam os índices encontrados nos EUA<sup>7</sup>**

## Desenvolvimento

O HBV desempenha um papel importante na predisposição ao HCC através de alterações na regulação gênica da célula hospedeira. Diversos modelos foram criados para tentar explicar o papel do HBV na hepatocarcinogênese, entretanto dois mecanismos têm sido apontados como principais no desenvolvimento do HCC<sup>16</sup>. No primeiro mecanismo, a integração do genoma viral no cromossomo da célula hospedeira resulta em perda da função de genes supressores de tumor, e/ou ativação de protooncogenes próximos ao local de inserção do DNA viral<sup>3,16</sup>. Entretanto a inserção do genoma viral em locais de conhecidos oncogenes tem se mostrado rara; além disso, nenhum sítio específico de inserção se mostrou mais freqüente<sup>2</sup>. O segundo mecanismo envolve a expressão de moléculas transativadoras derivadas do genoma viral, capazes de influenciar a transdução de sinais intracelulares e alterar a expressão gênica da célula hospedeira. A principal molécula transativadora derivada do genoma viral é a proteína HBx<sup>16</sup>. A integração do DNA viral que codifica a proteína HBx, aumenta a sua expressão na célula hospedeira e, conseqüentemente, altera o funcionamento de genes e proteínas regulatórias desta célula (hepatócito)<sup>3</sup>.

Estudos demonstraram que o gene HBx quando inserido no genoma de hepatócitos, além de codificar a proteína HBx, é ainda capaz de gerar uma instabilidade no genoma da célula hospedeira, favorecendo o aparecimento de rearranjos cromossômicos e conseqüentes mutações<sup>18</sup> (na maioria das vezes deleções parciais). Baseando-se em observações, é possível especular que essa integração genômica, por si própria pode causar uma desregulação de enzimas chaves no controle do ciclo celular, levando a uma proliferação celular desordenada<sup>2</sup>.

Apesar da proteína HBx não conseguir se ligar diretamente ao DNA de fita dupla, ela é capaz de ativar a transcrição de diversos genes virais e do hospedeiro através da indução da ativação de inúmeros fatores de transcrição incluindo o AP-1 (ativador da proteína 1) e o fator nuclear  $\kappa$ -B (NF $\kappa$ -B). A HBx interage com várias proteínas quinases citoplasmáticas, entre elas a proteína quinase C (PKC), proteína quinase Ras/Raf mitogênica ativada, IKK, PI-3K (fosfatidilinositol-3-quinase), Akt (Serina 47-treonina quinase, também conhecida como proteína B quinase), família Janus quinase, e c-Jun-NH<sub>2</sub>-terminal quinase (proteína quinase ativada por estresse) podendo ativar inúmeras cascatas de transdução de sinais intracelulares<sup>19</sup>. A HBx ainda pode se ligar à proteína P53, um conhecido produto de um gene supressor de tumor, inativando-a e levando à indução da proliferação de células malignas<sup>20</sup>.

A proteína HBx ainda interfere nos mecanismos de reparo do DNA, desregula as proteólises fisiológicas, regula negativamente o funcionamento dos complexos da cadeia respiratória nas mitocôndrias e altera os pontos regulatórios do ciclo celular<sup>21</sup>.

Através desses mecanismos de ativação transcricional de diversos genes celulares e interação com inúmeras proteínas celulares, a HBx é capaz de coordenar o balanço entre proliferação celular e morte celular programada, ativando ou bloqueando a apoptose<sup>22</sup>.

A HBx quando expressa em diferentes quantidades, em diferentes hepatócitos determina resultados distintos e até opostos

em relação ao ciclo celular e apoptose. A maioria dos trabalhos publicados que correlacionam a proteína HBx com infecções crônicas por HBV demonstram que, quando expresso em baixos níveis, tal proteína ativa cascatas de transdução de sinais que levam à proliferação celular e perda dos mecanismos apoptóticos o que predispõe ao HCC. Entretanto, outros trabalhos, que focavam a infecção aguda e inicial por HBV, demonstraram que a proteína HBx quando altamente expressa pode controlar a proliferação celular e ativar mecanismos apoptóticos<sup>23</sup>.

Estudos demonstraram que durante infecções crônicas por HBV, e/ou quando o gene HBx encontra-se expresso em baixos níveis, a proteína HBx é capaz de desencadear diversos mecanismos proliferativos e anti-apoptóticos, dependentes ou não de P53<sup>24</sup>. A seguir abordaremos especificamente alguns desses mecanismos moleculares, determinados por baixas concentrações da proteína HBx, no desenvolvimento do HCC, bem como seu envolvimento em metástases. Para fins didáticos, dividimos os mecanismos em dependentes da proteína P53, mecanismos dependentes de NF $\kappa$ B e outros mecanismos (baseados na ligação de HBx com diversas proteínas celulares).

## Mecanismos dependentes de P53

A P53 é uma fosfoproteína nuclear que atua como uma proteína supressora de tumor. Ela participa de múltiplos processos celulares, incluindo a inibição da proliferação e transformação neoplásica celular, controle do ciclo celular, ativação do reparo de DNA, e ativação da apoptose (Figura 2). No âmbito molecular, a proteína P53 atua como um fator de transcrição estimulando a expressão dos genes que contém regiões promotoras capazes de se ligar à P53. A ligação da HBx à P53 além de dificultar a passagem desta proteína do citoplasma para o núcleo da célula, ainda é capaz de inativar suas funções<sup>25</sup>.

Ao se complexar com a P53, a proteína HBx inibe a sua seqüência específica de ligação com o DNA e, conseqüentemente, a P53 deixa de ser funcional. O complexo HBx-P53 é incapaz de se ligar aos promotores gênicos e ativar (como no caso do gene supressor de tumor PTEN)<sup>26</sup> ou inibir (como no caso do gene da AFP - alfafetoproteína) a transcrição do RNAm (Figura 3)<sup>3</sup>.

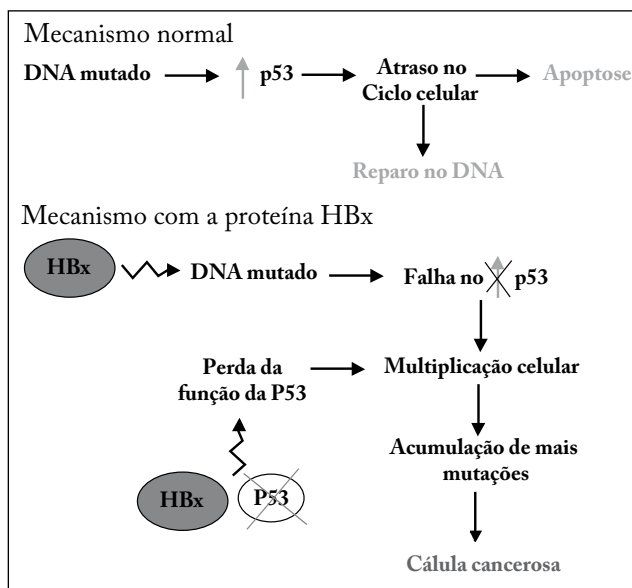
Assim, o HBx impede a ligação da P53 com o sítio promotor do gene PTEN (um conhecido supressor de tumor freqüentemente inativado em inúmeras neoplasias), impedido a sua transcrição e modulando negativamente a sua expressão. O gene PTEN, quando transcrito, inibe constantemente a via da PI-3K desfosforilando o PIP-3 em PIP-2. A manutenção dos baixos níveis de PIP-3 é essencial para que não haja ativação da enzima Akt que é conhecida como um importante mediador de sobrevivência, proliferação e crescimento celular. Quando não há transcrição do gene PTEN, ocorre um acúmulo de PIP-3 (fosfatidilinositol-3-fosfato) o que leva à fosforilação (ativação) da Akt (Figura 3). A ativação da Akt é um estímulo anti-apoptótico, e de proliferação celular que pode levar ao desenvolvimento do HCC<sup>26,27</sup>.

A proteína viral HBx também pode ativar diretamente a cascata sinalizadora de sobrevivência celular dependente de PI-3K

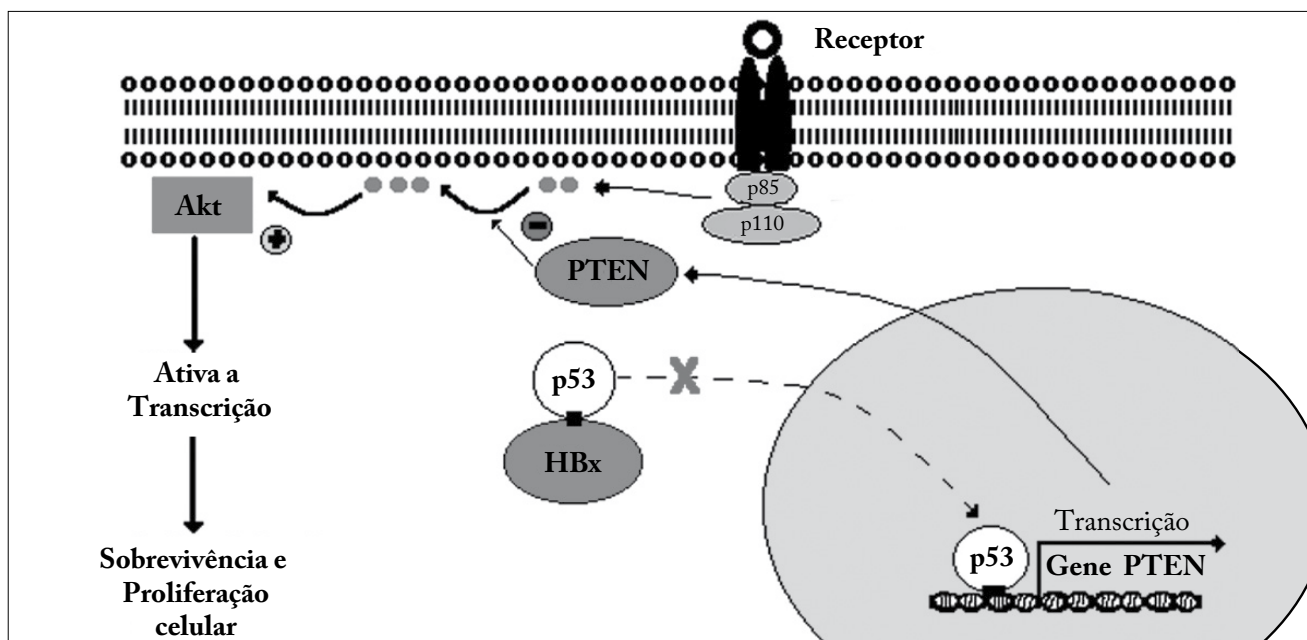
de maneira não dependente de P53. HBx pode ativar diretamente PI-3K, que aumenta a produção de PIP-3 e este composto promove a fosforilação e conseqüente ativação da proteína Akt, protegendo a célula da morte por apoptose. Nesse mesmo estudo, foi demonstrado que a proteína viral HBx também era capaz de inativar a caspase 3, uma enzima pró-apoptótica<sup>22,27</sup>.

Como já foi mencionado, a proteína P53 ao se ligar ao sítio promotor do gene da AFP, mantém sua transcrição inibida. A formação do complexo HBx-P53 deixa o promotor gênico livre e a transcrição desse gene é ativada. Estudos recentes têm demonstrado que a secreção de AFP estimula o crescimento, proliferação celular, e a oncogênese. A AFP é um importante marcador tumoral encontrado em 75-80% dos casos de HCC, o que comprova a importância desse mecanismo para o surgimento dessa neoplasia<sup>3</sup>.

Trabalhos recentes demonstraram que a HBx é capaz de ligar a enzimas mitocondriais (complexos I, II, III, IV, V da cadeia respiratória) deprimindo o seu funcionamento<sup>28</sup>. Essas enzimas, envolvidas no transporte de elétrons e translocação de prótons da cadeia respiratória, quando deprimidas levam a um aumento do estresse oxidativo e da formação de ROS (espécies reativas de oxigênio). Apesar da peroxidação lipídica causada por esse aumento de ROS ser uma sinalização pró-apoptótica, estudos comprovaram que esse estresse oxidativo pode também ser responsável por mutações no gene que codifica a P53. Essas mutações alteram o funcionamento da P53, e a célula fica incapaz de sofrer apoptose<sup>29</sup>.



**Figura 2**  
**Papel da Proteína P53 no Processo de Apoptose.**  
 P53 é uma proteína supressora de tumor que quando estimulada leva à apoptose ou ao reparo de DNA. A proteína HBx pode ligar-se à P53 ou causar mutações no seu gene e as funções da P53 ficam alteradas<sup>16</sup>



**Figura 3**

**Ação da proteína viral HBx no processo de transcrição. Ao se ligar à proteína P53, a proteína HBx inibe a transcrição do gene PTEN (um conhecido supressor de tumor frequentemente inativado em neoplasias), que mantém a via PI-3K (fosfatidil inositol 3 quinase) inativa. Dessa forma a proteína Akt (enzima mediadora de sobrevivência e proliferação celular) é ativada, levando à sobrevivência e proliferação celular<sup>2</sup>**

## Mecanismos dependentes de NFkB

O fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) é um fator de transcrição que reconhece e se liga a seqüências específicas do DNA e interage com proteínas do complexo de transcrição basal (como a RNAse), ativando a expressão de genes específicos. Estes genes participam da ativação de células imunes e regulação de processos celulares, incluindo: estresse oxidativo; proliferação; apoptose; diferenciação e transformação oncogênica<sup>30</sup>. Um exemplo de genes transcritos pelo NF- $\kappa$ B é a uroquinase ativadora de plasminogênio (UPA), que está envolvida na invasão cancerosa e metástase<sup>31</sup> e diversos proto-oncogenes, como o gene transcritor da proteína P21, que está envolvida na oncogênese e regula diretamente o ciclo celular na fase G1<sup>32</sup>.

O NF- $\kappa$ B é formado por homodímeros ou heterodímeros de proteínas transcritas por um oncogene chamado c-Rel: as proteínas da família Rel, as quais apresentam domínios que possibilitam a ligação ao DNA e a dimerização<sup>30</sup>. Entre os dímeros existentes, o heterodímero composto pelas proteínas P50 (NF- $\kappa$ B1) e P65 (Rel-A) é o mais importante nos hepatócitos<sup>33</sup>.

Usualmente, o complexo NF- $\kappa$ B é retido no citoplasma por estar ligado a uma segunda família de proteínas representadas pelas inibidoras IKB's (principalmente IKB- $\alpha$  e IKB- $\beta$ ), as quais mascaram o local de sinalização para a sua entrada no núcleo. Além disso, as proteínas P100 e P105, que também são membros da família de proteínas Rel, exercem regulação inibitória sobre a atividade do NF- $\kappa$ B, induzindo a permanência das suas proteínas no citoplasma por um processo ainda pouco esclarecido<sup>33</sup>.

A proteína HBx é capaz de induzir a entrada do NF- $\kappa$ B no núcleo, por diferentes mecanismos, permitindo assim a transcrição de genes. O mecanismo clássico se caracteriza pelo acionamento de diferentes cascatas enzimáticas mediadas pela proteína quinase C e pelo complexo Ras-Raf proteína quinase. A via de ativação envolve ainda a ativação do complexo de quinases de IKB (IKK) composto pelas enzimas IKK- $\alpha$  e IKK- $\beta$ <sup>34</sup>, as quais fosforilam IKB- $\alpha$  (inibidora do complexo NF- $\kappa$ B) que acarretam a translocação das proteínas do complexo NF- $\kappa$ B para o núcleo<sup>33</sup>. A ativação, mediada pela HBx, das cascatas enzimáticas citadas, pode ser provocada pela sua ação direta sobre as enzimas, ou indiretamente, através da indução do estresse oxidativo e da produção de TNF- $\alpha$  e fatores de crescimento que também agirão ativando-as<sup>35</sup>.

De forma adicional, a HBx é capaz de causar a redução dos níveis citoplasmáticos das proteínas reguladoras do NF- $\kappa$ B, P100 e P105, diminuindo a retenção deste fator de transcrição no citoplasma. Além disso, a proteína HBx interage com proteases celulares, interferindo diretamente na atividade de enzimas proteolíticas envolvidas na degradação da IKB- $\alpha$ , o que causa uma diminuição dos níveis celulares desta proteína inibidora e possibilita que o complexo NF- $\kappa$ B seja transferido para o núcleo<sup>21,35</sup>.

A associação entre a superexpressão do NF- $\kappa$ B e sua translocação para o núcleo com a presença da HBx e o desenvolvimento do HCC, suporta as hipóteses que associam esse fator de transcrição a oncogênese mediada pela HBx<sup>36</sup>.

## Outros mecanismos que envolvem HBx

A proteína HBx é capaz de se ligar a outras proteínas citoplasmáticas, entre elas: a ECC3 (um fator de transcrição envolvido no reparo de deleções no DNA, cujos mecanismos ainda permanecem desconhecidos)<sup>20</sup> e a serina protease Hepsin. A HBx liga-se diretamente à Hepsin promovendo a proliferação celular e também bloqueando a apoptose. Além disso, a formação de complexos HBx-Hepsin promove a expressão de HbeAg em hepatócitos, o que indica que esse complexo estimula a replicação do DNA<sup>37</sup>.

A HBx ainda interage com a XAP-1/UVDDDB, uma proteína celular envolvida no reparo de DNA e em atividades transcricionais (inclusive aquelas envolvidas na replicação viral). Dessa forma, a HBx pode inativar a proteção contra danos de DNA incidentalmente, ao ativar a atividade transcricional da proteína XAP-1/UVDDDB<sup>38</sup>.

A inibição da capacidade do reparo de DNA provocada pela interação da HBx com a XAP-1/UVDDDB, com a ECC3 e com a P53 (proteína também associada ao reparo de DNA), pode contribuir para o acúmulo de erros no DNA do hepatócito, levando eventualmente, ao desenvolvimento do HCC<sup>20,37,38</sup>.

A Jagged 1 é uma proteína sinalizadora que controla a proliferação e diferenciação celular, sendo de grande importância em vários tumores malignos. Em um estudo recente, a proteína Jagged 1 foi altamente expressa em 79,2% dos casos de HCC. Esse estudo também mostrou que alterações na expressão de HBx levaram a consistentes alterações nos níveis da Jagged 1 *in vitro*. Além disso, a Jagged 1 parece interagir diretamente com a proteína HBx em tecidos com hepatocarcinoma celular<sup>39</sup>.

A proteína HBx pode se ligar à seleno proteína (SeP) uma glicoproteína monomérica antioxidante que evita a peroxidação lipídica decorrente de um aumento do estresse oxidativo da célula, e deprimir suas funções nos hepatócitos. O aumento da peroxidação lipídica (causada tanto pela inibição das enzimas mitocondriais – processo descrito anteriormente – quanto pela inibição da SeP) estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias, que além de cronificar o processo pode lesar o tecido hepático<sup>40</sup>.

Alguns tumores expressam proteínas ligantes de Fas (FasL), que reconhecem o receptor de morte Fas nos leucócitos. O acoplamento da Fas L com o Fas resulta na morte apoptótica dos leucócitos, sendo um importante mecanismo de escape tumoral às respostas imunes do hospedeiro<sup>30</sup>.

A proteína viral HBx apresenta importante papel na ativação do FasL por meio de distintos mecanismos. Um deles se dá pela ativação do Nur77, um receptor nuclear implicado no

estímulo do FasL<sup>41</sup>. A HBx também interage com os fatores de transcrição Erg-2 e Erg-3, aumentando a sua capacidade transcricional, o que causa uma maior expressão do FasL<sup>42</sup>. Além disso, a HBx pode agir indiretamente, aumentando a expressão de interleucina-18 no hepatócito, a qual também induz a expressão da FasL<sup>43</sup>.

## Metástase

A evolução de um tumor primário para um tumor secundário (caracterizado pela metástase) requer a capacidade das células cancerosas em degradar a matriz extracelular e alterar as interações moleculares que permitem a adesão entre as células, possibilitando então, a invasão das células tumorais aos tecidos sanguíneo e linfático<sup>44</sup>.

A proteína HBx está relacionada com a ruptura da adesão entre o citoesqueleto e os complexos de caderina presentes em células hepáticas, cuja ligação previne a migração e invasão das células cancerosas<sup>45</sup>. Acredita-se que a HBx também cause uma redução da expressão da subunidade alfa5 de integrinas (proteínas expressas na superfície celular e envolvidas com processos de adesão e reconhecimento celular), diminuindo a sua adesão à fibronectina<sup>46</sup>, o que determina alterações na capacidade de adesão dos hepatócitos e o aumento da sua capacidade invasora.

Além disso, a presença da proteína HBx também altera a expressão de metaloproteínas da matriz extracelular (MMP's) específicas, conhecidas como gelatinases (metaloproteínas de matriz tipo 2 e 9), que degradam o colágeno tipo IV (um importante componente da lâmina basal das células), estando envolvidas em uma variedade de processos patofisiológicos, incluindo a metástase tumoral<sup>47</sup>. Recentes estudos demonstraram que a HBx também é capaz de estimular a metaloproteínase tipo 1 (MT1-MPP) que por sua vez induz a produção de metaloproteínase tipo 2, a qual é comumente associada a mal prognóstico. A ativação das MMP's leva a uma destruição da matriz extracelular, facilitando a migração celular e invasão de tecidos adjacentes<sup>48</sup>.

A expressão da metaloproteínase de matriz tipo 9 (MMP-9) é aumentada pela HBx através da ativação de fatores de transcrição como a AP-1 e o NF-KB (já discutido anteriormente). A Metaloproteínase de matriz tipo 2 (MMP-2) pode ser induzido pela ação da HBx e da COX-2<sup>44</sup>.

A expressão da COX-2 pode ser induzida pela HBx, a partir da ativação de um fator de transcrição chamado de fator nuclear de células T ativadas (NFAT), cuja ativação nos hepatócitos, está associada ao aumento do cálcio intracelular e ao estresse oxidativo gerado pela interação do HBx com a mitocôndria. A COX-2 e a HBx apresentam ações semelhantes e sinérgicas, agindo, ambas, no aumento da mobilidade celular; através do aumento da expressão de metaloproteínas de matriz; e na neovascularização (angiogênese), a partir da superexpressão de enzimas pró-angiogênicas e de fatores de crescimento, como o fator de crescimento vascular e endotelial (VEGF), determinando a formação de novos vasos sangui-

neos, o que é essencial à manutenção e ao desenvolvimento dos tumores<sup>44</sup>.

Quando super expresso, o gene HBx determina a formação de agregados protéicos da proteína HBx que se acumulam na forma de largos grânulos intra-citoplasmáticos. A formação dos grânulos ocorre devido à presença de resíduos de cisteína que favorecem o aparecimento de pontes dissulfeto entre as moléculas. É provável, porém ainda incerto, que esses agregados protéicos atuem diretamente na função do sistema ubiquitina-proteossômico levando a célula a um atraso no ciclo celular e à apoptose através de um mecanismo independente da P53<sup>22</sup>.

No citoplasma a proteína HBx ainda é capaz de ativar várias quinases citoplasmáticas que atuam inibindo a fase G<sub>1</sub> do ciclo celular. Entretanto, quando a proteína HBx encontra-se em altas concentrações parece estar envolvida com atividade pró-apoptótica, como a ativação conjunta do proto-oncogene myc e/ou da proteína c-Jun-NH<sub>2</sub>-terminal quinase, juntamente com a ausência de estimulação do NFkB<sup>49</sup>. Mutações no gene HBx levam à perda de ambos mecanismos descritos (apoptóticos e controle do ciclo celular), levando à proliferação celular desordenada e predispondo ao HCC<sup>22</sup>.

A integração do gene HBx no genoma dos hepatócitos é freqüentemente truncada, ou apresenta mutações pontuais<sup>50</sup>. Estudos demonstraram que mutações no gene HBx levam a uma diminuição da atividade de transcrição do gene, um descontrole da proliferação celular e à perda dos mecanismos apoptóticos<sup>51</sup>. Assim, indivíduos que apresentam um precoce desenvolvimento do HCC, após infecção por HBV, freqüentemente apresentam mutações no gene HBx<sup>52</sup>. Em outros estudos, todos os portadores de HCC estudados que apresentavam uma mutação específica no gene HBx (mutação da porção C-terminal da proteína HBx). Apesar dessa mutação a proteína HBx ainda era capaz de se ligar à proteína P53, formando complexos HBx-P53, cujos mecanismos hepatocarcinogênicos já foram discutidos<sup>29,53</sup>.

## Comentários

Apesar do papel da proteína HBx no desenvolvimento do HCC ainda ser bastante controverso na literatura, existem muitas evidências de que essa proteína exerça importante função na regulação do ciclo celular, seja impedindo ou promovendo a proliferação celular desordenada.

Estudos recentes, como o de Lupberg publicado em 2007, demonstraram que uma depleção específica no gene X é capaz de inibir fortemente o crescimento e a proliferação celular<sup>54</sup>. Semelhantemente, em 2006, Chan já havia comprovado que bloqueando a transcrição da HBx reduzia-se significativamente a proliferação celular e o desenvolvimento tumoral *in vivo*, além de sensibilizar as células à ação do TNF- $\alpha$  (um importante mediador de apoptose)<sup>55</sup>.

Entretanto existem estudos comprovando que a HBx exerça uma função pró-apoptótica quando altamente expressa<sup>23</sup>,

ou até mesmo uma função tumor protetora quando ligada a outras quinases, como a PKC<sup>56</sup>. Também foi observado que a expressão completa do genoma de HBV, e não somente a expressão do gene X, levou a uma inibição do ciclo celular e, portanto, não houve proliferação<sup>57</sup>.

É importante ressaltar que cada estudo analisou uma concentração de HBx diferente, e que expressões diferentes dessa proteína podem levar a respostas distintas e até mesmo opostas, o que justificaria, ao menos em parte, essa discrepância nos resultados das pesquisas. A localização da proteína HBx também é de extrema importância quando analisamos sua função. A HBx pode ser encontrada no citoplasma, núcleo ou mitocôndria, e em cada um desses sítios ela altera mecanismos particulares e provavelmente não coincidentes. Portanto estudos que priorizem diferentes sítios, provavelmente obterão resultados díspares. Não se deve ignorar também o fato de que o genoma que codifica a HBx apresenta-se freqüentemente

mutado e que a localização dessas mutações pode alterar a função da HBx.

É possível que a proteína HBx exerça ambas as funções: oncogênica e protetora tumoral; mas cada uma dessas ações dependerá do seu nível de expressão, da sua localização dentro da célula, e também da presença ou não de mutações em seu genoma.

A proteína HBx é apenas um dos inúmeros possíveis mecanismos envolvidos no desenvolvimento do HCC. Vale lembrar que a própria inclusão do genoma viral na célula hospedeira, por si só, é capaz de desregular o ciclo celular. Além disso, o constante estímulo de reparo tecidual provocado pela cronicidade da hepatite B e a intensa reação inflamatória mediada pelo sistema imunológico são uns dos principais fatores envolvidos na oncogênese. Outras famílias de proteínas, assim como as ativadoras de PreS2, também tem sido implicada nesse processo, porém os estudos também têm se mostrado controversos<sup>58</sup>.

## Referências bibliográficas

1. Ministério da Saúde. Câncer de fígado. [2 telas]. Disponível em URL: [http://www.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=330](http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=330). Acessado em: 23 de janeiro de 2005.
2. Lupberger J, Hildt E. Hepatitis B virus-induced oncogenesis. *World J Gastroenterol* 2007;13(1):74-81.
3. Stacey KO, Kathleen CL, Michelle CB. Hepatitis B viral transactivator HBx alleviates P53-mediated repression of alfafetoprotein gene expression. *J Biol Chem* 2000;275(36):27806-14.
4. Jorge SG. Hepatite B. 2003. [2 telas]. Disponível em URL: [http://www.hepcentro.com.br/hepatite\\_b.htm](http://www.hepcentro.com.br/hepatite_b.htm). Acessado em: 14 de junho de 2005.
5. Eli B, Richard C, Geoffrey S. *Imunologia*. 4ª ed. Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan; 2002. p. 447-54.
6. Guo SP, Wang WL, Zhai YL. Expression of nuclear factor-KB in hepatocellular carcinoma and its relation with the x protein of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 2001;7(3):340-34.
7. Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer* 2001;37(Suppl 8): S4-S66 .
8. Bruss V. Hepatitis B virus morphogenesis. *World J Gastroenterol* 2007;13(1):65-73.
9. Robbins SL, Kumar V, Conran RS. *Patologia estrutural e funcional*. 7ª ed. Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan; 2005. p. 934-6.
10. Hassan MM, Hwang LY, Hatten CJ, Swaim M, Li D, Abbruzzese JL, Beasley P, Patt YZ. Risk factors for hepatocellular carcinoma: synergism of alcohol with viral hepatitis and diabetes mellitus. *Hepatology* 2002;36:1206-13.
11. Yang HI, Lu SN, Liaw YF, You SL, Sun CA, Wang LY, Hsiao CK, Chen PJ, Chen DS, Chen CJ. Hepatitis B e antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2002;347:168-74.
12. Iloeje UH, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Chen CJ. Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load. *Gastroenterology* 2006;130:678-86.
13. Kao JH. Hepatitis B viral genotypes: clinical relevance and molecular characteristics. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:643-50.
14. Sugauchi F, Kumada H, Acharya SA, Shrestha SM, Gamutan MT, Khan M, Gish RG, Tanaka Y, Kato T, Orito E, Ueda R, Miyakawa Y, Mizokami M. Epidemiological and sequence differences between two subtypes (Ae and Aa) of hepatitis B virus genotype A. *J Gen Virol* 2004;85:811-20.
15. Hermes JG, Benjamin B. Nitric oxide disrupts H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – dependent activation of nuclear Factor kB. *J Biol Chem* 2001 Mar 23;276(12):8918-23.
16. Lee AT, Lee CG. Oncogenesis and transforming viruses: the hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma – the etiopathogenic link. *Front Biosci* 2007;12:234-45.
17. Zhang X, Zhang H, Ye L. Effects of hepatitis B virus X protein on the development of liver cancer. *J Lab Clin Med* 2006;147(2):58-66.
18. Livezey KW, Negorev D, Simon D. Increased chromosome alterations and micronuclei formation in human HepG2 cells transfected with the hepatitis B virus HBX gene. *Mutat Res* 2002;505(1-2):63-74.
19. Diao J, Garces R, Richardson CD. X protein of hepatitis B virus modulates cytokine and growth factor related signal transduction pathways during the course of viral infections and hepatocarcinogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001;12(2-3):189-205.
20. Su F, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein activates transcription factor NF-kappaB by acting on multiple cytoplasmic inhibitors of rel-related proteins. *J Virol* 1996;70(7):4558-66.
21. Wang T, Wu Y, Wu MC, Guan XY, Yin ZF. Activating mechanism of transcription factor NF-kappaB regulated by hepatitis B virus X protein in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2004;10(3):356-60.
22. Lee YI, Kang-Parrk S, Do SI, Lee YI. The hepatitis B virus-x protein activates a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent survival signaling cascade. *Hepatology* 2001;34(3):409-15.



23. Chang ZS, Zeng LB, Chang CS, Qing WW. Aggregate formation of hepatitis B virus X protein affects cell cycle and apoptosis. *World J Gastroenterol* 2003;9:1521-4.
24. Li D, Chen X, Zhang W. The inhibition of apoptosis of hepatoma cells induced by HBx is mediated by up-regulation of surviving expression. *Jhuazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 2003;23(4):383-6.
25. Elmore LW, Hancock AR, Chang SF, Wang XW, Chang S, Callahan CP, Geller DA, Will H, Harris CC. Hepatitis B virus X protein and P53 tumor suppressor interactions in the modulation of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(26):14707-12.
26. Tae WC, Young CL, Jeong HK, Cheorl HK. Hepatitis B virus X protein modulates the expression of PTEN by inhibiting the function of P53, a transcriptional activator in liver cells. *Cancer Res* 2003;63:3453-8.
27. Kang-Park S, Im JH, Lee JH, Lee YI. PTEN modulates hepatitis B virus-X protein induced survival signaling in Chang liver cells. *Virus Res* 2006;122(1-2):53-60.
28. Lee YI, Hwang JM, Im JH, Kim NS, Lee YI, Kim NS, Kim DG, Yu DY, Moon HB, Park SK. Human hepatitis B virus-X protein alters mitochondrial function and physiology in human liver cells. *J Biol Chem* 2004;279(15):15460-71.
29. Wang XW, Hussain SP, Huo TI, Wu CG, Forgues M, Hofseth LJ, Brechot C, Harris CC. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Toxicology* 2002;181-182:43-7.
30. Abbas AK, Lichtman AH. *Imunologia celular e molecular*. 5ª ed. Rio de Janeiro, Brasil, Elsevier; 2005. p. 191-192;413.
31. Chan CF, Yau TO, Jin DT, Wong CH, Fan ST, Ng IO. Evaluation of nuclear factor Kappa-B, urokinase-type plasminogen activator and HBx and their clinicopathological significance in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2004;10(12):4140-8.
32. Feng Z, He R, Lu Z, Ling Y. Expression of ras oncogene P21 product and proliferating cell nuclear antigen in liver cirrhosis and the correlation with liver cell dysplasia. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2000;8(6):343-5.
33. Su F, Schneider RJ. Hepatitis B virus HBx protein Activates transcription factor NF-KB by acting on multiple cytoplasmic inhibitors of Rel related proteins. *J Virol* 1996;70(7):4558-6.
34. Birbach A, Gold P, Binder BR, Hofer E, Martin RSchimid SA. Signaling molecules of the NF-KB pathway shuttle constitutively between cytoplasm and nucleus. *J Biol Chem* 2002;277(13):10842-51.
35. Chirillo P, Falco M, Puri PL, Artini M, Balsano C, Levrero M, Natoli G. Hepatitis B virus PX activates NF-KB-Dependent transcription through a Raf-Independent pathway. *J Virol* 1996;70(1):641-6.
36. Guo SP, Wang WL, Zhai YQ, Zhao YL. Expression of nuclear factor-kappa B in hepatocellular carcinoma and its relation with the X protein of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 2001;7(3):340-4.
37. Zhang JL, Zhao WG, Wu KL, Wang K, Zhang X, Gu CF, Li Y, Zhu Y, Wu JG. Human hepatitis B virus X protein promotes cell proliferation and inhibits cell apoptosis through interacting with a serine protease hepsin. *Arch Virol* 2005;150(4):721-41. Epub 2004 Dez 21.
38. Becker SA, Lee TH, Butel JS, Slogle BL. Hepatitis virus X protein Interferes with cellular DNA repair. *J Virol* 1998;72(1):266-72.
39. Gao J, Chen C, Hong L, Wang J, Du Y, Song J, Shao X, Zhang J, Han H, Liu J, Fan D. Expression of Jagged1 and its association with hepatitis B virus X protein in hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; [Epub ahead of print].
40. Young SY, Sung GP, Sung MB, Young GK, Guhung J. Hepatitis B virus X protein induces TNF- $\alpha$  expression via down-regulation of selenoprotein P in human hepatoma cell line, HepG2. *BBA* 2003;1638(2003):249-56.
41. Lee MO, Kang HJ, Cho H, Shin EC, Park JH, Kim SJ. Hepatitis B virus X protein induced expression of the Nur77 gene. *Bio Chem Biophys Res Commun* 1991;288(5):1162-8.
42. Yoo YG, Lee MO. Hepatitis B virus X protein induces expression of Fas ligand gene through activity of early growth response factor. *J Biol Chem* 2004;279(35):36242-9.
43. Lee MO, Choi YH, Shin EC, Kang HJ, Kim YM, Jeong SY, Seong JK, Yu DY, Cho H, Park JH, Kim SJ. Hepatitis B virus X protein induced expression of interleukin 18 (IL-18): a potential mechanism for liver injury caused by hepatitis B virus (HBV) infection. *J Hepatol* 2002;37(3):380-6.
44. Enrique LP, Gómez GMV, Gálvez BG, Mira E, Iñiguez MA, Fresno M, Martínez AC, Arroyo AG, Cabrera ML. The hepatitis B virus X protein promotes tumor cell invasion by inducing membrane-type matrix metalloproteinase-1 and cyclooxygenase-2 expression. *J Clin Invest* 2002;110(12):1831-8.
45. Lara-Pezzi E, Roche S, Andrisani OM, Sanchez-Madrid F, Lopez-Cabrera M. The hepatitis B virus HBx protein induces adherens junction disruption in a src-dependent manner. *Oncogene* 2001;20(26):3323-31.
46. Lara-Pezzi E, Majano PL, Yanez-Mo M, Gomez-Gonzalo M, Carretero M, Moreno-Otero R, Sanchez-Madrid F, Lopez-Cabrera M. Effect of the hepatitis B virus HBx protein on integrin-mediated adhesion to and migration on extracellular matrix. *Hepatology* 2001;34(3):409-15.
47. Chung YG, Lee YC, Kim CH. Hepatitis B viral HBx induces matrix metalloproteinase-9 gene expression through activation of ERK and PI-3k/AKT pathways: involvement of invasive potential. *FASEB J* 2004;18(10):1123-35.
48. Ou DP, Tao YM, Tang FQ, Yang LY. The hepatitis B virus X protein promotes hepatocellular carcinoma metastasis by upregulation of matrix metalloproteinases. *Int J Cancer* 2007;120(6):1208-14.
49. Michel B, Robyn P, Robert JS. Tumor necrosis factor alpha inhibition of hepatitis B virus replication involves disruption of capsid integrity through activation of NF-kB. *J Virology* 2003;77(7):4033-42.
50. Huo TI, Wang XW, Forgues M, Wu CG, Spillare EA, Giannini C, Brechot C, Harris CC. Hepatitis B X virus mutants derived from human hepatocellular carcinoma retain the ability to abrogate P53-induced apoptosis. *Oncogene* 2001;20(28):3620-8.
51. Sirma H, Giannini C, Poussin K, Paterlini P, Kremsdorf D, Brechot C. Hepatitis B virus X mutants, present in hepatocellular carcinoma tissue abrogate both the anti-proliferative and transactivation effects of HBx. *Oncogen* 1999;18(34):4848-59.
52. Wang JC, Hsu SL, Hwang GY. Inhibition of tumorigenicity of the hepatitis B virus X gene in Chang liver cell line. *Virus Res* 2004;102(2):133-9.

53. Tu H, Bonura C, Giannini C, Mouly H, Soussan P, Kew M, Paterlini-Brechot C, Kremsdorf D. Biological impact of natural COOH-terminal deletions of hepatitis B virus X protein in hepatocellular carcinoma tissues. *Cancer Res* 2001;61(21):7803-10.
54. Cheng AS, Wong N, Tse AM, Chan KY, Chan KK, Sung JJ, Chan HL. RNA interference targeting HBx suppresses tumor growth and enhances cisplatin chemosensitivity in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 2007 Feb 10. [Epub ahead of print]
55. Chan DW, Ng IO. Knock-down of hepatitis B virus X protein reduces the tumorigenicity of hepatocellular carcinoma cells. *J Pathol* 2006;208(3):372-80.
56. Kekule AS, Lauer U, Weiss L, Lubber B, Hofschneider PH. Hepatitis B virus transactivator HBx uses a tumour promoter signalling pathway. *Nature* 1993;361:742-5.
57. Friedrich B, Wollersheim M, Brandenburg B, Foerste R, Will H, Hildt E. Induction of anti-proliferative mechanisms in hepatitis B virus producing cells. *J Hepatol* 2005;43:696-703.
58. Kekule AS, Lauer U, Meyer M, Caselmann WH, Hofschneider PH, Koshy R. The preS2/S region of integrated hepatitis B virus DNA encodes a transcriptional transactivator. *Nature* 1990;343:457-61.

**Endereço para correspondência:**

Maria Aparecida Pinhal  
Faculdade de Medicina do ABC  
Av. Lauro Gomes, 2000  
CEP 09060-870 – Santo André (SP)  
Disciplina de Bioquímica – Anexo I  
Tel.: (11) 4993-5448 / 4993-5499  
E-mail: maspinhal@yahoo.com.br