

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

CARINA VICTORIA MANZINI BALDI

**Efeito do fator de necrose tumoral (TNF) em
queratinócitos humanos que expressam as
proteínas E6 e E7 de papilomavírus humano
tipo 16 (HPV 16)**

São Paulo
Data do Depósito na SPG:
31/10/2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ANEXO - SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Carina Victoria Manzini Baldi

Local e data de nascimento: São Paulo. 28 de Dezembro de 1979.

EDUCAÇÃO

Universidade de São Paulo. 2003

Ciências Biológicas

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Estágio no exterior

Imperial College and Ludwig Institute for Câncer Research – Londres/UK. 2003-04

Programa de Aperfeiçoamento ao Ensino (PAE)

- 2005

Instituto de Química/USP – curso: Bioquímica para Nutrição

Prof. Dr Bayardo Torres

- 2006

Instituto de Química/USP – curso: Bioquímica para Medicina

Prof. Dr Alicia Kowaltowsk, Prof Dr Frederico Guerra and Prof Dr Carla Columbano

OCUPAÇÃO

Cientista no Centro de Pesquisa e Tecnologia (CPT) - Johnson & Johnson. Desde Julho 2008

PUBLICAÇÕES E CONGRESSOS

1. Sogayar MC, Camargo AA, Bettoni F, Carraro DM, Pires LC, Parmigiani RB, Ferreira EN, de Sá Moreira E, do Rosário D de O Latorre M, Simpson AJ, Cruz LO, Degaki TL, Festa F, Massirer KB, Sogayar MC, Filho FC, Camargo LP, Cunha MA, De Souza SJ, Faria M Jr, Giuliatti S, Kopp L, de Oliveira PS, Paiva PB, Pereira AA, Pinheiro DG, Puga RD, S de Souza JE, Albuquerque DM, Andrade LE, Baia GS, Briones MR, Cavaleiro-Luna AM, Cerutti JM, Costa FF, Costanzi-Strauss E, Espreafico EM, Ferrasi AC, Ferro ES, Fortes MA, Furchi JR, Giannella-Neto D, Goldman GH, Goldman MH, Gruber A, Guimarães GS, Hackel C, Henrique-Silva F, Kimura ET, Leoni SG, Macedo C, Malnic B, **Manzini B CV**, Marie SK, Martinez-Rossi NM, Menossi M, Miracca EC, Nagai MA, Nobrega FG, Nobrega MP, Oba-Shinjo SM, Oliveira MK, Orabona GM, Otsuka AY, Paço-Larson ML, Paixão BM, Pandolfi JR, Pardini MI, Passos Bueno MR, Passos GA, Pesquero JB, Pessoa JG, Rahal P, Rainho CA, Reis CP, Ricca TI, Rodrigues V, Rogatto SR, Romano CM, Romeiro JG, Rossi A, Sá RG, Sales MM, Sant'Anna SC, Santarosa PL,

- Segato F, Silva WA Jr, Silva ID, Silva NP, Soares-Costa A, Sonati MF, Strauss BE, Tajara EH, Valentini SR, Villanova FE, Ward LS, Zanette DL; Ludwig-FAPESP Transcript Finishing Initiative. **A transcript finishing initiative for closing gaps in the human transcriptome.** Genome Research, v. 14, n. 7, p. 1413-1423, 2004.
2. PARMIGIANI RB, MAGALHÃES GS, GALANTE PA, **MANZINI CV**, CAMARGO AA, MALNIC B.. **A novel human G protein-coupled receptor is over-expressed in prostate cancer. A novel human G protein-coupled receptor is over-expressed in prostate cancer.** Genet Mol Res, Brazil, v. 30, n. 3, p. 521-531, 2004.
 3. FERREIRA EN, PIRES LC, PARMIGIANI RB, BETTONI F, PUGA RD, PINHEIRO DG, ANDRADE LE, CRUZ LO, DEGAKI TL, FARIA M JR, FESTA F, GIANNELLA-NETO D, GIORGI RR, GOLDMAN GH, GRANJA F, GRUBER A, HACKEL C, HENRIQUE-SILVA F, MALNIC B, **MANZINI CV**, MARIE SK, MARTINEZ-ROSSI NM, OBA-SHINJO SM, PARDINI MI, RAHAL P, RAINHO CA, ROGATTO SR, ROMANO CM, RODRIGUES V, SALES MM, SAVOLDI M, DA SILVA ID, DA SILVA NP, DE SOUZA SJ, TAJARA EH, SILVA WA JR, SIMPSON AJ, SOGAYAR MC, CAMARGO AA, CARRARO DM. **Identification and complete sequencing of novel human transcripts through the use of mouse orthologs and testis cDNA sequences. Identification and complete sequencing of novel human transcripts through the use of mouse orthologs and testis cDNA sequences.** Genet Mol Res, Brazil, v. 30, n. 3, p. 493-511, 2004.
 4. **MANZINI, C.V.B.**; BOCCARDO, E.; FIORINI, A.; TORRES, C.; BRENTANI, H.; VILLA,L.L. **HPV16 E7-expression confers resistance to tumor necrosis factor (TNF): evidences from global gene expression analysis.** Poster apresentado no 24th International Papillomavirus Conference and Clinical Workshop. Pequim, China. 2007
 5. **MANZINI, C.V.B.**; BOCCARDO, E.; FIORINI, A.; TORRES, C.; BRENTANI, H.; VILLA,L.L. **Effects of Tumor Necrosis Factor (TNF) on HPV 16 E7-expressing keratinocytes gene expression profile.** Pôster apresentado na XXXX Reunião Anual Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 2007, Salvador/BA.
 6. **MANZINI, C.V.B.**; BOCCARDO, E.; , COLO, A; FIORINI, A.; TORRES, C.; BRENTANI, H.; REIS, L.F.L.; VILLA, L.L. **Effect of Tumor Necrosis Factor (TNF) on global gene expression of HPV16 E7-expressing keratinocytes.** HPV National Meeting, 2006. Campos do Jordão/SP
 7. **HPV e o Cancer de Colo de Útero.** 2005. Palestra ministrada no VI Simpósio Nacional de Biologia Molecular Aplicada à Medicina. Araras/SP. 2005

8. IV São Paulo Research Conference. Participação em Simpósio. São Paulo/SP. 2005

9. PARMIGIANI R.B.; MANZINI, C.V.B.; CAMARGO A.A.; MALNIC, B; GALANTE, P.A; MAGALHÃES; G.S. **Identification of a novel G-protein-coupled receptor expressed in prostate cancer.** Pôster apresentado na XXXII Reunião Anual Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular (SBBq), 2003, Caxambu/MG.

10. RENO, L.A.C.; MANZINI, C.V.B.; MARKUS, R.P. **Influence of the light dark cycle environmental lightining on nicotine evoked 3H glutamate release in rat cerebellum slices.** Poster apresentado no XXXII Congresso brasileiro de farmacologia e terapêutica experimental, 2001, Águas de Lindóia/SP.

CARINA VICTORIA MANZINI BALDI

Efeito do fator de necrose tumoral (TNF) em queratinócitos humanos que expressam as proteínas E6 e E7 de papilomavírus humano tipo 16 (HPV 16)

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Bioquímica

Orientadora: Dra. Luisa Lina Villa
Co-orientador: Dr. Enrique Boccardo

São Paulo
2008

Carina Victoria Manzini Baldi

Efeito do fator de necrose tumoral (TNF) em queratinócitos humanos que expressam as proteínas E6 e E7 de papilomavírus humano tipo 16 (HPV 16)

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Bioquímica*

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

À minha querida mãe, por suas sábias lições de esperança; sempre repetindo palavras essenciais que me infundiram a confiança necessária para realizar os meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Eis que chegou o momento de expressar sinceros agradecimentos a muitos e tantos adorados familiares e amigos – tanto aos “velhos” e queridos quanto aos que se revelaram ao longo desse tempo.

Bem sei que corro o risco de não dar conta desse “muitíssimo obrigado” como é merecido, pois é difícil expressar tamanha gratidão.

Devo contar que esta não foi uma caminhada breve, mas uma travessia que parecia sem fim, principalmente pelas intercorrências pessoais de toda ordem, que me atropelaram. Esses entraves, longe de obscurecerem o trajeto, aumentaram-lhe o brilho. E, ao invés de me deterem, impulsionaram-me com mais força.

Se o desafio era enorme, as motivações eram grandiosas, somadas às espontâneas generosidades que fizeram possível a transformação de instantâneos momentos de angústia e sofrimento em uma forte vontade de concluir esta etapa.

Talvez esta tese seja o resultado mais visível desse processo de construção de uma pessoa em meio a uma conjuração de afetos e amizades. Dessa forma, dando continuidade à história, dedico algumas palavras àqueles que dela fazem parte direta ou indiretamente. Assim, agradeço...

À Dra. Luisa Villa pela oportunidade.

Ao amigo Enrique Boccardo pela paciência e dedicação, pelas discussões e principalmente pelo companheirismo e respeito.

Ao Dr. Alex Fiorini e a Ana Estela Coló por todo o tempo dedicado a me ensinar a técnica de *Microarray*, auxiliando nos experimentos e na obtenção dos mais variados materiais.

Ao Dr. Luiz Fernando Lima Reis por toda a contribuição intelectual.

Ao Ricardo Moura e ao Rodrigo Vieira pela incrível ajuda com Real Time.

À Dra. Helena Brentani, ao César Torres e ao André Barreto por toda a análise estatística deste trabalho.

À Stella, por facilitar tanto a minha vida.

À Lara, por ser A Lara!

Ao Zé e ao João pela amizade.

À Neide, pela constante sensação de serenidade transmitida e pelo companheirismo.

À Aline Bolpetti, por compartilhar comigo do mesmo momento.

À Laura Sichero por sua paixão por ciência.

À Tati pela sua incondicional disponibilidade.

À todo o grupo de Virologia pela união durante a complicada fase de transição pela qual passamos.

À Prof. Dra. Bettina Malnic, por quem tenho profunda admiração.

À querida Adriana Mercadante, que sutilmente me ensinou tanto.

Ao Pedro Galante, por me convencer que eu nasci cientista.

Ao meu paidrasto Alberto, que abraçou o desafio de me adotar como filha e me ajudou a chegar até aqui.

A minha grande amiga Zanith, que é parte da minha vida. Com quem me confesso, de quem tomo broncas; com quem me divirto, de quem sinto falta; com quem me identifico, de quem agradeço a Deus por fazer parte da minha vida.

Ao Rodrigo Louro por sua extensa paciência, por sua amizade, por entender como funciona um computador, por discutir ciência, por adorar futebol, por entender de cerveja, por participar da minha vida.

Ao Alexandre, por me fazer sentir em família. Por todas as sementes plantadas em mim, a partir de uma amizade consolidada.

Ao Rodrigo Rudge, pela sinceridade de uma amizade.

Aos meus queridos primos, Raphael e Simone, que me acolheram com MUITO carinho num momento importantíssimo

Ao Paulo, pelas pirações embasadas cientificamente.

À Paola, por achar lindo o que eu faço!

À Johnson & Johnson por me abrir as portas de um novo mundo.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP- pelo apoio financeiro.

Ao Instituto de Química da USP por todo o suporte educacional.

Ao Instituto Ludwig de Pesquisas sobre o Câncer por toda infra-estrutura e investimento.

Success is a science; if you have the conditions, you get the result.
Oscar Wilde

RESUMO

Baldi, CVM. **Efeito do fator de necrose tumoral- α (TNF) em queratinócitos humanos que expressam as proteínas E6 e E7 de papilomavírus humano tipo 16 (HPV 16)**. 2008. 183p. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Os papilomavírus são pequenos vírus de DNA dupla-fita, não envelopados, mucoepiteliotrópicos, capazes de infectar inúmeros vertebrados superiores de maneira espécie-específica. A infecção por estes vírus está associada a uma série de desordens proliferativas que levam desde de a formação de verrugas comuns até a do carcinoma invasivo. Aproximadamente 200 tipos de papilomavírus humano (HPVs) foram identificados, sendo que cerca de 40 deles infectam o trato genital. Dentre estes, os chamados HPVs de alto-risco estão associados etiológicamente ao carcinoma de colo de útero, enquanto que os de baixo-risco estão relacionados às lesões epiteliais benignas. A infecção por HPVs de alto-risco é muito comum, no entanto, a maioria destas é transitória e somente uma pequena proporção de mulheres desenvolvem o carcinoma. Entretanto, algumas mulheres são incapazes de eliminar esta infecção, levando a persistência viral e o conseqüente desenvolvimento da neoplasia. Para que a infecção pelo HPV persista é necessário um mecanismo de escape ao sistema imune do hospedeiro. O mecanismo de escape à resposta imune inata parece ser característico da infecção pelo HPV, pois o ciclo infeccioso deste vírus não promove inflamação. A infecção por HPV promove a liberação de citocinas, tal como o fator de necrose tumoral (TNF). Esta citocina possui um potente efeito citostático em queratinócitos normais e imortalizados com HPV, enquanto que em queratinócitos imortalizados com HPV18 este efeito não é observado. Do mesmo modo, observamos que a expressão do oncogene E6 de HPV16 ou 18 é suficiente para promover resistência ao efeito antiproliferativo do TNF em culturas em monocamada e organotípica. A expressão aumentada e contínua destes ocogenes é sabidamente o principal evento favorável ao desenvolvimento do câncer de colo de útero. Estas

proteínas são essenciais na indução da transformação celular, visto que interferem na regulação do ciclo celular e apoptose. O produto dos genes E6 e E7 se liga ao produto dos genes supressores de tumor p53 e pRb, respectivamente, levando a sua degradação pela via de proteólise dependente de ubiquitina. As bases moleculares desta resistência ao TNF ainda são pouco conhecidas. Neste estudo, comparamos o efeito desta citocina em queratinócitos normais e que expressam E6 ou E7. Observamos através de cDNA Microarray a expressão de um grupo de genes, entre eles TCN1, DEK, HMGB2, INHBA, MCM2, MCM5 e MMP9, com expressão diferencial entre as células sensíveis e as resistentes ao TNF.

Palavras chave: HPV, TNF, Microarray, expressão gênica, proliferação celular

ABSTRACT

Baldi, CVM. **Efeito do fator de necrose tumoral- α (TNF) em queratinócitos humanos que expressam as proteínas E6 e E7 de papilomavírus humano tipo 16 (HPV 16).** 2008. 183p. PhD Thesis – Graduate Program in Chemistry ou Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Papillomaviruses are small, non-enveloped, epitheliotropic, double-stranded DNA viruses that infect mucosal and cutaneous epithelia in a wide variety of higher vertebrates in a species-specific manner. Papillomavirus infections are associated to a series of proliferative disorders that range from common warts to invasive carcinomas. Almost 200 types of human papillomaviruses (HPVs) have been identified and approximately 40 of them infect the genital tract. Only the so-called high-risk HPV types mediate human carcinogenesis, whereas the low-risk HPVs have been linked to benign epithelial lesions. High-risk genital HPV infection is very common, and the majority of individuals clear their infection with time. However, a proportion of women cannot effectively clear the virus, and the persistence of a high-risk HPV is the major risk factor for the development of ano-genital malignancies. To persist, HPV must escape the host immune system. Effective evasion of innate immune recognition seems to be the hallmark of HPV infections, since the infectious cycle is one in which viral replication and virion release is not associated with inflammation. Furthermore, HPV infections promote cytokine release, as tumor necrosis factor-alpha (TNF). This cytokine has a potent cytostatic effect on normal and HPV16 immortalized keratinocytes, while it does not affect HPV18 immortalized keratinocytes proliferation. In addition, we have observed that expression of HPV 16 or 18 E7 oncogene is sufficient to overcome TNF antiproliferative effect in monolayer and organotypic cell cultures. The increased and sustained expression of HPV oncogenes, E6 and E7, is the main contributor to the development of cervical cancer. Both E6 and E7 proteins are essential to induce and maintain cellular transformation, due to their

interference with cell-cycle and apoptosis regulation. The most manifest function of the E6 protein is to promote the degradation of p53, while E7 is known to bind to and promote the proteasomal degradation of the retinoblastoma tumor suppressor gene product, pRb, and its family members. The molecular basis of TNF resistance is not well understood. In this study we compared the effect of TNF between normal and HPV16 E6 or E7 expressing keratinocytes. We observed by cDNA Microarray the differential expression of a common set of genes in TNF-sensitive cell lines, including TCN1, DEK, HMGB2, INHBA, MCM2, MCM5 and MMP9, that differs from those modulated in TNF-resistant cells.

Keywords: HPV, TNF, Microarray, gene expression, cell proliferation

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
1. PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV).....	13
2. Ciclo de vida e infecção viral (figura 2).....	14
3. Potencial Oncogênico do HPV	17
4. Estrutura e Função das Proteínas Virais	19
5. Resposta imune contra o HPV	25
6. O fator de necrose tumoral (TNF).....	27
7. TNF e HPV	31
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
MATERIAS E MÉTODOS	34
1. VETORES RETROVIRAIS	34
1.1. Proteína E6 de HPV16	35
1.2. Mutantes da proteína E6 de HPV 16.....	35
1.3. Proteína E7 de HPV16	37
1.4. Mutantes da proteína E7 de HPV 16.....	37
2. ISOLAMENTO DO DNA DOS VETORES EM LARGA ESCALA (Maxi-preparação) 40	
3. PURIFICAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO POR GRADIENTE DE DENSIDADE (CsCl) 41	
4. TRANSFEÇÃO DA LINHAGEM CELULAR ECOTRÓPICA BOSC 23	42
5. INFECÇÃO DA LINHAGEM CELULAR ANFOTRÓPICA AM-12	43
6. INFECÇÃO DOS QUERATINÓCITOS PRIMÁRIOS HUMANOS	43
7. CULTURA DE CÉLULAS	44
7.1. Cultura em monocamada	44
7.2. Cultura Organotípica (<i>raft</i>) de queratinócitos	44
7.2.1. Preparação do equivalente dérmico	45
7.2.2. Cultura organotípica de queratinócitos normais (figura 7 e figura 8)	46
8. EXTRAÇÃO DE RNA E TRATAMENTO COM DNASE	48
9. NORTHERN BLOT	49
10. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS	50
11. ENSAIOS DE WESTERN BLOT	50
12. MEDIDA DA PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	51
12.1. Em cultura em monocamada: Incorporação de ³ H-Timidina	51
12.2. Em raft: IHQ com anti-BrdU.....	52
13. PREPARAÇÃO DOS RAFT PARA IMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ).....	52
14. ESTUDO DE EXPRESSÃO GÊNICA POR MICROARRAYS DE CDNA	54
14.1. Amplificação de RNA.....	54
14.1.1. Síntese da primeira fita do cDNA	54
14.1.2. Síntese da segunda fita do cDNA	54
14.1.3. Purificação do cDNA dupla-fita.....	55
14.1.4. Transcrição in vitro (RiboMAX, Large Scale RNA production – Promega). ..	55
14.1.5. Purificação do RNA amplificado	55
14.2. cDNA Microarray	56
14.2.1. Plataforma de Microarray de cDNA do Instituto Ludwig de Pesquisas sobre o Câncer/Hospital A.C.Camargo (Chip 4.8K01)	56
14.2.2. Marcação indireta para geração de alvos fluorescentes	56
14.3. Pré-hibridização das lâminas	58
14.4. Hibridizações em lâminas de <i>microarrays</i> de cDNA	58
14.4.1. Estação de hibridização:	59
14.5. Captação das imagens.....	59
14.6. Quantificação das imagens	59
14.7. Normalização dos dados	60
14.8. Análise dos dados	61

14.8.1. Análise de enriquecimento de categorias de ontologia gênica (GO)	61
15. VALIDAÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS	62
15.1. PCR em Tempo Real	62
15.1.1. Síntese de cDNA (RT).....	62
15.1.2. Análise de expressão gênica por PCR em Tempo Real	63
RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
1. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS ONCOGENES E6 E E7 DE HPV 16 EM PHK 66	
2. MEDIDA DA PROLIFERAÇÃO CELULAR EM CULTURAS EM MONOCAMADA E RAFTS.....	76
2.1. Medida de incorporação de [metil- ³ H] timidina (cultura em monocamada) ...	79
2.2. Medida de incorporação de BrdU (<i>raft</i>)	82
3. ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM CULTURAS ORGANOTÍPICAS	85
4. CDNA MICROARRAY	90
4.1. Amplificação de RNA.....	92
4.2. Desenho experimental.....	97
4.3. Pré-análise	98
4.3.1. Normalização dos dados.....	98
4.4. Análise dos dados	103
4.4.1. Comparação entre os sistemas de cultura em monocamada e <i>raft</i> (tabela 4)	107
4.4.2. Comparação entre amostras tratadas e não com TNF no sistema de cultura em monocamada e <i>raft</i> (tabela 4).....	109
4.5. ESCOLHA DE GENES:.....	112
CONCLUSÕES	148
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	150

INTRODUÇÃO

1. PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

Os papilomavírus pertencem à família *Papillomaviridae*, que compreende um grupo heterogêneo de vírus altamente espécie-específicos, que apresentam tropismo por células dos epitélios escamosos (Revisado por Zur Hausen, 1996). Estes são pequenos vírus de DNA, sem envelope e icosaédricos que se replicam no núcleo das células. O vírion têm diâmetro de aproximadamente 50 nm e é formado por uma molécula circular de DNA dupla fita, com cerca de 8Kb, compreendida dentro de um capsídeo composto por 72 capsômeros. O capsídeo é constituído por duas proteínas estruturais (L1 e L2) codificadas pelo genoma viral, o qual encontra-se associado a histonas celulares formando um complexo similar à cromatina (Howley, 1996; Zur Hausen, 1996).

O genoma dos HPVs pode ser dividido em três regiões funcionalmente diferentes: uma região controladora denominada LCR (*Long Control Region*), uma região precoce ou região E (*Early*) e uma região tardia ou L (*Late*) (figura 1). A LCR possui de 500 a 1000 pares de bases e encontra-se entre os genes L1 e E6 (Chan *et al.*, 1989). Essa região contém a origem de replicação de DNA, ao qual se ligam fatores de replicação de origem viral e celular, além de possuir o promotor precoce principal e seqüências reguladoras da transcrição (Broker, 1987). O produto da transcrição viral é um mRNA policistrônico que pode ou não ser processado em transcritos alternativos (Arends *et al.*, 1990). Os genes da região L (L1 e L2) codificam para proteínas estruturais do capsídeo, enquanto que os genes da região E (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) codificam para proteínas com diversas funções reguladoras envolvidas na persistência genômica, replicação do DNA viral, transcrição de genes virais e regulação da proliferação celular (Revisado por Howley, 1996; McMurray *et al.*, 2001).

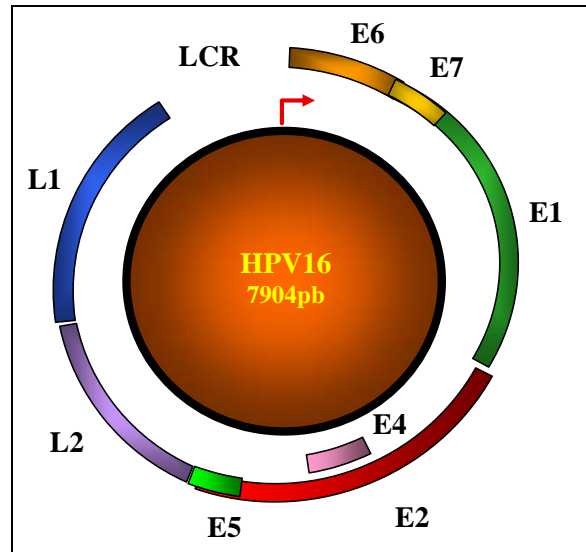


figura 1: Mapa físico do genoma do HPV16. Região precoce (*Early*), região tardia (*Late*) e a LCR (*Long Control Region*) que corresponde à região regulatória.

2. Ciclo de vida e infecção viral (figura 2)

O ciclo de vida do HPV está intimamente ligado à diferenciação dos epitélios. Num epitélio escamoso o crescimento ocorre em camadas estratificadas onde, apenas as células da camada basal são capazes de se dividir ativamente. Após deixar a camada basal, as células filhas param de se dividir e começam a diferenciar, produzindo tipos específicos de queratina. À medida que o processo de diferenciação progride, a queratina acumula na célula e o envelope nuclear se fragmenta. Nas camadas mais diferenciadas do epitélio, as células não possuem mais atividade metabólica e apresentam grandes quantidades de queratina (Watt, 1998).

Durante a infecção pelo HPV, as proteínas virais fazem com que as células não parem de se dividir em resposta ao início da diferenciação. Isso é necessário para que a progênie viral seja produzida. Para que a infecção pelo vírus persista é necessário que o vírion infecte a camada basal do epitélio, o que ocorre normalmente através de microlesões. Uma vez no núcleo, o genoma viral permanece na forma epissomal e o promotor que regula a transcrição dos genes

precoces é ativado. Nas células infectadas o DNA viral se replica, sendo possível encontrar de 50 a 100 cópias de DNA episossomal por célula. Quando ocorre a divisão celular o genoma viral é dividido entre as células filhas, que ao migrarem para as camadas superiores do epitélio, durante o processo de diferenciação, continuam com o ciclo celular ativo (Fehrmann e Laimins, 2003). À medida que as células infectadas diferenciam, o promotor que regula a transcrição dos genes tardios é ativado. Isso indica o início da fase produtiva do ciclo de vida do HPV, marcada principalmente pelo aumento do número de cópias do genoma viral. Nas camadas mais superiores do epitélio, o DNA viral é empacotado em novos capsídeos e a progênie do vírus é liberada junto com a descamação das células epiteliais (Hebner e Laimins, 2006).

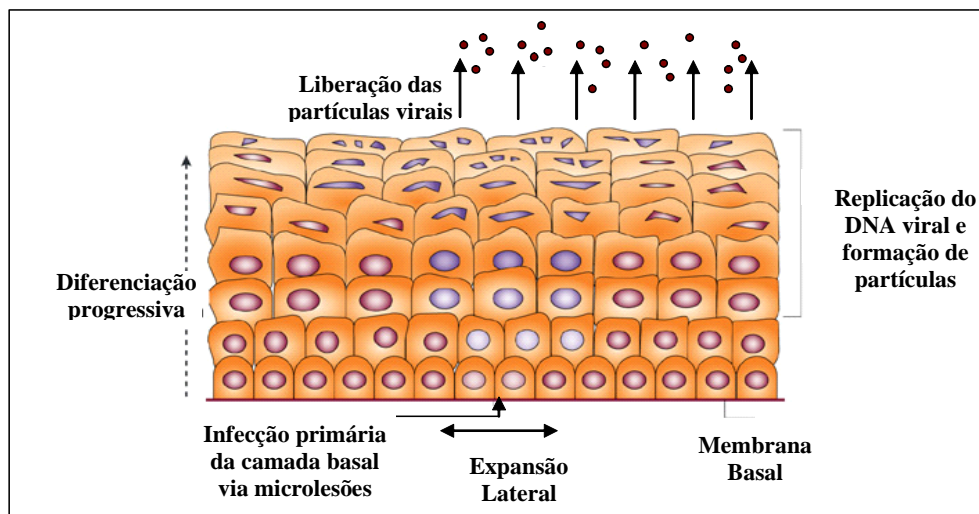


figura 2: Ciclo de vida do HPV. Para que a infecção seja produtiva, o vírus precisa infectar células da camada basal do epitélio. Isso normalmente ocorre através de microlesões, na pele ou na mucosa. As células infectadas dividem e se espalham lateralmente. Algumas dessas células progenitoras entram no programa de diferenciação e migram para as camadas suprabasais, onde genes virais serão ativados, o DNA do vírus será replicado e as proteínas do capsômero serão expressas. As partículas virais surgem e são liberadas na superfície da mucosa onde podem infectar outras células (Modificado de Zur Hausen, 2002).

As patologias geralmente associadas à infecção por estes vírus incluem lesões de pele ou de mucosas. De acordo com o sítio preferencial de infecção, os diferentes tipos de HPV podem ser classificados em genitais, não genitais e associados a epidermodisplasia verruciforme. A infecção por tipos genitais está associada ao aparecimento de lesões benignas e malignas na região ano-genital. Os tipos não genitais estão associados ao aparecimento de verrugas comuns

e verrugas plantares. Os tipos relacionados a epidermodisplasia verruciforme estão associados apenas às lesões verrucosas características desta doença autossômica recessiva (Villa, 1997).

A infecção por tipos genitais de HPV é considerada a doença sexualmente transmissível mais comumente diagnosticada (Trottier e Franco, 2006). Até o momento mais de 120 tipos diferentes de papilomavírus humano foram descritos. Destes aproximadamente 40 infectam especificamente o trato anogenital (De Villiers, 2001) e podem ser classificados segundo o tipo de lesão ao qual estão associados (Lorincz *et al.*, 1992; Lowy *et al.*, 1994; Zur Hausen, 1996):

- 1) Tipos de baixo risco oncogênico – (HPV 6, 11, 42, 43 e 44 entre outros) associados às lesões do colo uterino de baixo grau e às verrugas genitais
- 2) Tipos de alto risco oncogênico – (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 45 e 58 entre outros) associados às lesões intraepiteliais de alto grau, e carcinomas invasivos do colo uterino.

Atualmente o HPV é considerado o principal agente etiológico do carcinoma do colo uterino, uma doença com 471.000 novos casos diagnosticados e aproximadamente 230.000 mortes registradas a cada ano (Revisado por Parkin *et al.*, 2001; Pisani *et al.*, 2002). No Brasil o câncer do colo do útero é a terceira neoplasia maligna mais comum entre as mulheres. Para 2006, as estimativas sobre incidência previram o aparecimento de 19.260 novos casos (Inca, 2006). A alta incidência de carcinoma do colo uterino em regiões menos desenvolvidas parece estar ligada a uma combinação de fatores como desnutrição, falta de prevenção para as lesões precursoras, alto índice de paridade e condições de higiene (Franco *et al.*, 1995).

Apesar da alta prevalência, a maior parte das infecções não leva ao aparecimento de lesões visíveis, podendo ser eliminadas pelo sistema imune em um curto período de tempo (IARC-Working-Group, 2007). Contudo, em um pequeno número de mulheres estas infecções virais

não são eliminadas, podendo permanecer por anos. A infecção persistente por HPV de alto risco é considerada o principal fator de risco para o desenvolvimento de lesões precursoras do carcinoma do colo uterino (Schlecht *et al.*, 2001).

O HPV-16 é o tipo mais prevalente sendo encontrado em aproximadamente 30% das mulheres infectadas com citologia normal (Van Den Brule *et al.*, 1990; Bauer *et al.*, 1991). Além disso, este tipo viral é encontrado em 50% de todos os cânceres de colo uterino e lesões intraepiteliais de alto grau (Bosch *et al.*, 1995; Kulasingam *et al.*, 2002) e 25% das lesões intraepiteliais de baixo grau (Alts-Group, 2000).

3. Potencial Oncogênico do HPV

A síntese contínua das proteínas precoces E6 e E7 do HPV parece ser uma etapa essencial para o desenvolvimento e manutenção de tumores malignos, visto que ocorre sempre durante a gênese dos tumores anogenitais associados a este vírus (Zur Hausen, 1996). Diferentes sistemas têm mostrado que as funções das proteínas transformantes codificadas pelos HPV associados ao câncer anogenital em humanos, podem ser reproduzidas *in vitro* (Matlashewski *et al.*, 1987; Pirisi *et al.*, 1987; Bedell *et al.*, 1989). Dentre esses estudos, os dados iniciais de maior importância, foram a constatação de que os HPV-16, 18 e 31, os mais correlacionados às lesões do trato anogenital e com potencial para progressão maligna, são capazes de imortalizar culturas primárias de queratinócitos normais de prepúcio ou células epiteliais da cérvix uterina (o mesmo não acontecendo com HPVs de baixo risco) (Kaur e McDougall, 1988; Schlegel *et al.*, 1988; Woodworth *et al.*, 1990).

Durante o processo de imortalização de queratinócitos humanos normais, os HPV de alto risco promovem alterações de proliferação e de diferenciação celular. Estas células tornam-se

altamente proliferantes mesmo na presença de fatores indutores de diferenciação celular, como fatores protéicos presentes no soro e altas concentrações de cálcio, e continuam dividindo indefinidamente *in vitro*, não se diferenciando (Schlegel *et al.*, 1988; Zhou *et al.*, 1996).

Além disso, vale ressaltar que a maioria dos carcinomas de células escamosas, assim como linhagens celulares derivadas de tumores da cérvix uterina, é resistente à supressão de crescimento induzida por diferentes citocinas. A expressão da oncoproteína E7 é capaz de superar o efeito inibitório induzido por TGF- β (*Transforming Growth Factor - β*), uma importante citocina que restringe o crescimento de células epiteliais. Acredita-se que esta resistência se deva em parte ao fato de E7 ser capaz de inibir a atividade dos inibidores de quinases dependentes de ciclinas p21^{cip1} e p27^{kip1}, ambos relacionados à inibição de proliferação induzida pelo tratamento com TGF- β (Pietenpol *et al.*, 1990). De maneira similar, linhagens derivadas de carcinomas da cérvix uterina são resistentes ao efeito citostático do fator de necrose tumoral alfa (TNF) (Villa *et al.*, 1992; Vieira *et al.*, 1996).

A expressão das oncoproteínas de HPVs de alto risco, e principalmente sua cooperação, são fundamentais para a progressão e manutenção do fenótipo imortalizado ou maligno. De fato, a inibição da expressão *in vitro* destas proteínas interrompe a proliferação celular e, em alguns casos, pode ocorrer a reversão do fenótipo maligno ou imortalizado (Barbosa e Schlegel, 1989; Goodwin e Dimaio, 2000; Zur Hausen, 2000). Em 2002, Jiang e Milner demonstraram que a inativação do RNAm de E6 e E7, através da utilização de RNA de interferência (RNAi), promove redução da proliferação celular e aumento da apoptose (Jiang e Milner, 2002). No ano seguinte, Butz e colaboradores descreveram que a inibição da expressão de E6, também através de RNAi, foi capaz de induzir apoptose em células derivadas de carcinomas do colo uterino (Butz *et al.*, 2003).

As observações descritas acima levam a crer que o desenvolvimento de estratégias que possibilitem a inibição de expressão de E6 e E7 pode contribuir para a reversão de eventos celulares envolvidos nos processos de carcinogênese da cérvix uterina.

4. Estrutura e Função das Proteínas Virais

Dentre as primeiras proteínas expressas após a infecção viral encontram-se E1 e E2. Estas proteínas estão envolvidas na replicação viral e formam um complexo que se liga à origem de replicação viral recrutando polimerases e proteínas acessórias que auxiliam a replicação (Mohr *et al.*, 1990; Frattini *et al.*, 1997; Conger *et al.*, 1999). A proteína E1 também possui atividade de helicase, permitindo a separação das fitas do DNA viral a medida que a replicação ocorre (Hughes e Romanos, 1993). A proteína E2, além de contribuir com E1 para o recrutamento da maquinaria de replicação celular, também apresenta a capacidade de regular a transcrição dos genes virais precoces por se ligar à sítios específicos na LCR viral (Cripe *et al.*, 1987). Os sítios de ligação da proteína E2 na LCR são adjacentes aos sítios de ligação de fatores celulares que regulam a transcrição dos genes precoces (Stubenrauch *et al.*, 1998). Em baixos níveis E2 se liga a estes sítios e ativa a transcrição dos genes adjacentes. Em altos níveis, contudo, esta proteína ocupa os sítios de ligação dos fatores de transcrição celulares, inibindo a transcrição dos genes da região precoce (Steger e Corbach, 1997). Uma vez que os fatores de replicação E1 e E2 também são expressos como genes precoces, a habilidade de E2 de ativar ou reprimir a expressão gênica contribui para o controle do número de cópias do genoma viral nas células não diferenciadas (Longworth e Laimins, 2004).

O papel da proteína E4 no ciclo de vida do HPV ainda não está esclarecido. Esta proteína parece ser incorretamente classificada como um produto gênico precoce, uma vez que sua

detecção foi possível somente nas camadas mais diferenciadas do epitélio e associada ao citoesqueleto de queratina. Esta proteína não é requerida para a transformação ou para a persistência episomal do genoma viral. No entanto, a proteína E4 parece estar envolvida na maturação e na liberação das partículas virais para o meio extracelular (Revisado por Hebner e Laimins, 2006).

A proteína E5 encontra-se predominantemente no complexo de Golgi. Esta é a principal proteína transformante de BPV-1 (papilomavírus bovino tipo-1) (Schiller *et al.*, 1986). Por outro lado, em HPV, a proteína E5 apresenta baixa atividade transformante. Esta proteína pode causar transformação em queratinócitos de camundongos, levar ao crescimento independente de ancoragem em fibroblastos de camundongo, além de estimular o crescimento de células epiteliais primárias de fígado de camundongo em cooperação com E7. Nas células infectadas por HPV foi observado que esta proteína amplifica o sinal mitogênico do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF). Além disso, a proteína E5 de HPV-16 é capaz de diminuir a expressão de HLA de classe I (Ashrafi *et al.*, 2005). No entanto, o gene E5 está freqüentemente deletado nos tumores da região anogenital. Além disso, altos níveis de RNAm e proteína são detectados em lesões intra-epiteliais precursoras de baixo grau (Zur Hausen, 2000).

As proteínas que compõem o capsídeo viral, L1 e L2, são expressas tardiamente no ciclo de vida viral, nas camadas mais diferenciadas do epitélio. A proteína L1 é a principal constituinte do capsídeo do papilomavírus e a proteína viral mais abundante, constituindo cerca de 80% do total das proteínas virais (Howley, 1996). Essa proteína abriga epítomos tipo-específicos sendo altamente imunogênicas (Revisado por Zur Hausen, 1996; Thones *et al.*, 2008). A proteína L2, por sua vez, é a proteína viral menos abundante e, embora seja um componente estrutural

adicional do capsídio viral, associada a L1, parece ter um papel importante na incorporação do DNA viral dentro do vírion (Roden *et al.*, 2001)

A replicação do DNA viral é, em grande parte, dependente da maquinaria de replicação celular. O fato do ciclo de vida viral estar intimamente ligado à diferenciação epitelial implica que a síntese de DNA nas camadas mais diferenciadas do epitélio deve permanecer ativa ou ser reativada. O HPV evita que as células em processo de diferenciação parem de proliferar através da expressão da oncoproteína E7 (Cheng *et al.*, 1995b; Banerjee *et al.*, 2006). A expressão desta proteína induz a re-entrada dos queratinócitos no ciclo celular (Banerjee, Genovese *et al.*, 2006). Nesta situação as células reiniciam a síntese de DNA após o início da diferenciação ativando a expressão de fatores celulares necessários à replicação viral. A presença de E7 leva a retenção do núcleo nas camadas superiores, situação incomum ao epitélio normal (Longworth e Laimins, 2004). Além disso, a expressão de E7 também parece ser necessária para a manutenção da forma extracromossomal do vírus nas células da camada basal, função compartilhada pela oncoproteína E6 (Thomas *et al.*, 1999). Apesar do papel de E6 no ciclo de vida produtivo do HPV ainda não ter sido bem estabelecido, estudos demonstram que a expressão desta proteína é necessária para manter o genoma de HPV-31 e HPV-11 em uma forma estável e passível de replicação (Thomas *et al.*, 1999; Oh *et al.*, 2001). O fato de esta função ser compartilhada por E6 de HPV de alto e baixo risco pode indicar que se trata de um mecanismo importante para prevenir a eliminação de um genoma extracromossomal pela célula hospedeira (Longworth e Laimins, 2004).

A forma epissomal do HPV é normalmente encontrada em lesões intra-epiteliais de baixo grau no colo uterino. Contudo, em lesões de alto grau e no carcinoma da cérvix uterina o genoma viral encontra-se predominantemente integrado ao genoma do hospedeiro (Stoler *et al.*, 1992). A

forma de integração mais comumente encontrada nas lesões malignas é aquela onde o gene E2 encontra-se interrompido. Este tipo de integração elimina o controle que E2 exerce sobre o promotor que controla a transcrição de E6 e E7. Sem controle, a expressão destes oncogenes passa a ser constitutiva e se torna um dos eventos centrais na promoção da carcinogênese induzida por HPV (Banks *et al.*, 1987; Smotkin *et al.*, 1989) .

A possibilidade de uma infecção por HPV progredir para uma lesão maligna é freqüentemente atribuída à habilidade das oncoproteínas E6 e E7 manipularem a expressão de diversos fatores reguladores do ciclo celular. A expressão de E6 e E7 de HPV de alto risco é suficiente para induzir a imortalização de queratinócitos primários humanos em sistemas de cultura de células (Hawley-Nelson *et al.*, 1989; Munger, Phelps *et al.*, 1989; Hudson *et al.*, 1990). Entretanto, estas linhagens celulares não são tumorigênicas em camundongos atímicos e necessitam eventos adicionais como a presença do oncogene ras ativado (Hurlin *et al.*, 1991) ou serem cultivadas por dezenas de passagens para se tornarem completamente transformadas (Dipaolo *et al.*, 1989; Durst *et al.*, 1989).

Os genes E6 e E7 são os únicos genes do HPV expressos de forma constitutiva e consistente em todas as linhagens celulares derivadas de carcinomas da cérvix uterina. Estas proteínas cooperam para imortalizar queratinócitos humanos *in vitro* (Munger, Phelps *et al.*, 1989; Watanabe *et al.*, 1989; Halbert *et al.*, 1992; Zur Hausen, 1996; Liu *et al.*, 1997).

A proteína E6 de HPV de alto risco possui cerca de 150 aminoácidos e apresenta quatro domínios Cys-X-X-Cys envolvidos na formação de dois dedos de zinco. Esta proteína é capaz de unir-se à proteína supressora de tumor p53, alterando sua capacidade funcional e promovendo sua degradação pela via de proteólise dependente de ubiquitina (Scheffner *et al.*, 1990; Crook *et*

al., 1991; Lechner *et al.*, 1992; Kesis *et al.*, 1993; Scheffner *et al.*, 1993). A proteína p53 é uma fosfoproteína nuclear de 53 KDa cuja função principal é a manutenção da integridade genômica através da regulação do ciclo celular. Após uma infecção viral, estresse celular ou dano ao DNA, p53 se acumula na célula promovendo a parada do ciclo celular em G0-G1, interrompendo desta forma o processo de replicação celular (Revisado por Harris e Levine, 2005; Aylon e Oren, 2007). Além disso, em determinadas situações, p53 tem a capacidade de desencadear o processo de apoptose (Levine, 1997). A degradação de p53 promovida por E6 elimina este tipo de controle, levando à instabilidade genômica das células infectadas por HPV. Acreditava-se que apenas as proteínas E6 de HPVs de alto risco eram capazes de degradar p53 (Crook *et al.*, 1991; Lechner e Laimins, 1991; 1994), no entanto, em 1998 Storey e colaboradores observaram que E6 de HPV11 (baixo risco) também era capaz de degradar esta proteína, entretanto, de forma bem menos eficiente do que E6 de HPVs de alto risco (Storey *et al.*, 1998).

A interação com a proteína p53 foi a primeira a ser descrita e é a mais conhecida dentre as interações da proteína E6 com proteínas celulares (Zur Hausen, 2000). No entanto, outras interações importantes com fatores celulares já foram descritas (Revisado por Narisawa-Saito e Kiyono, 2007; Tungteakkhun e Duerksen-Hughes, 2008). Dentre estas, pode-se citar:

- E6AP, uma proteína ubiquitina ligase, que após interação com E6 estimula a ubiquitinação de p53 e da própria E6AP, tornando-as alvo para degradação via proteassomo (Scheffner *et al.*, 1993; Rolfe *et al.*, 1995; Scheffner, 1998; Cooper *et al.*, 2003);
- E6BP ou ERC55, uma proteína ligante de cálcio, localizada no retículo endoplasmático, que é degradada após interação com E6, tornando as células epiteliais resistentes a estímulos que promovem a diferenciação destas células (Chen *et al.*, 1995);

- telomerase, um complexo ribonucleoprotéico que sintetiza o telômero, ativado pela expressão de E6, favorecendo a imortalização e participando da transformação celular. A expressão de E6 induz a atividade do promotor hTERT, que conseqüentemente promove a ativação da telomerase (Klingelhutz *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1999);
- hDLG, o homólogo humano da proteína supressora de tumor dos discos de *Drosophila melanogaster*, que quando ligada à E6 interrompe a formação adequada das junções célula-célula, além da perda de polaridade e controle da proliferação celular (Kiyono *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1997);
- p300, um coativador transcricional, que através da interação com E6 inibe a atividade transcricional de p53 (Patel *et al.*, 1999; Zimmermann *et al.*, 1999);
- E6TP1, uma proteína do tipo GAP (GTPase activating protein), que funciona como um supressor de tumor e é degradada após ligação à E6, favorecendo a imortalização celular (Gao *et al.*, 1999; Gao *et al.*, 2001);
- Bak, uma proteína anti-apoptótica integrante da família das proteínas Bcl-2, que é degradada por E6 (Thomas e Banks, 1998; 1999);
- IRF3, um fator de regulação de interferon, que tem sua atividade transcricional inibida pela interação com E6, impedindo a sinalização induzida por interferon (Ronco *et al.*, 1998);

O produto do gene E7 de HPV é uma fosfoproteína com cerca de 100 aminoácidos, cuja principal e mais estudada interação ocorre com a forma hipofosforilada da proteína pRb (p105) e com outros membros dessa família (p107 e p130), através de um motivo LxCxE. A proteína supressora de tumor pRb (produto do gene do retinoblastoma) é uma fosfoproteína nuclear de 105 KDa que tem como principal função regular negativamente o ciclo celular (Munger, Werness *et al.*, 1989; O'connor M, 1997). Para exercer esta função, a forma hipofosforilada de pRb se acumula em forma de complexo com uma família de importantes fatores de transcrição,

denominada E2F, na fase G0/G1 do ciclo celular. Desta forma, genes responsivos à E2F, na sua grande maioria relacionados à proliferação celular (como por exemplo, ciclina A, cdc2 e c-myc), não são transcritos. A proteína E7 de HPV de alto risco, tem a capacidade de se ligar ao complexo pRb/E2F, liberando os fatores de transcrição e, inativando pRb e induzindo sua degradação pela via de proteólise dependente de ubiquitina (Dyson *et al.*, 1989; Iarc-Working-Group, 2007).

Além de pRb a proteína E7 de HPVs de alto risco é capaz de interagir com outras proteínas celulares (Revisado por Narisawa-Saito e Kiyono, 2007), dentre as quais pode-se citar:

- proteínas inibidoras das quinases dependentes de ciclina p21 e p27 são inativadas pela interação com E7 (Funk *et al.*, 1997; Jones *et al.*, 1997b);
- TBP, um fator de transcrição que têm sua atividade desregulada pela interação com E7 (Phillips e Vousden, 1997);
- fatores de transcrição da família AP-1 são transativados pela interação com E7 (Massimi *et al.*, 1996);
- proteína hTid-1, homólogo da proteína supressora de tumor de *Drosophila* Tid56 (Schilling *et al.*, 1998), envolvida na replicação do genoma;
- M2 piruvato quinase, uma enzima glicolítica que tem sua atividade modulada pela interação com E7 (Zwerschke *et al.*, 1999);
- p48, uma das proteínas envolvidas na sinalização mediada por interferon, que tem sua função regulada negativamente pela interação com E7 (Barnard e Mcmillan, 1999);

5. Resposta imune contra o HPV

A resposta contra agentes virais inclui tanto a resposta inata quanto a adquirida. A imunidade adquirida contra agentes virais é mediada pela combinação de mecanismos humorais e

celulares. Anticorpos específicos são importantes no controle inicial da infecção, prevenindo a entrada do vírus na célula hospedeira, e após a liberação das partículas virais das células infectadas, visto que os vírus são inacessíveis aos anticorpos no ambiente intracelular. Os papilomavírus são exclusivamente epiteliotrópicos e seu ciclo de vida depende do processo de diferenciação celular que acontece neste tecido. Estes vírus causam infecções produtivas e crônicas, podendo persistir por vários meses. Além disso, não causam infecções citolíticas nem inflamação, fato que retarda ou mesmo anula uma resposta imune adequada (Kupper e Fuhlbrigge, 2004). Adicionalmente, é possível que algumas proteínas precoces do HPV restrinjam a eficácia da resposta imune por diferentes mecanismos (Revisado por Kanodia *et al.*, 2007).

O caráter transitório da maioria das infecções, aliado aos efeitos observados em estudos epidemiológicos e moleculares, indicam a importância da presença de um sistema eficiente de imunidade celular para o controle das mesmas (Kyo *et al.*, 1994; Rosl *et al.*, 1994; Kadish *et al.*, 1997).

A entrada do HPV no organismo ocorre através de microlesões da pele ou mucosa e o início da infecção ocorre nas camadas basais da epiderme. Basicamente, na linha de defesa contra a infecção por HPV, os macrófagos parecem ser as primeiras células a serem recrutadas, podendo estar envolvidos na regressão das lesões, seja por um efeito anti-viral direto ou por um mecanismos não específicos (Jenson *et al.*, 1987; Tay *et al.*, 1987). Por outro lado, tanto os macrófagos quanto os queratinócitos ativados, produzem uma série de citocinas, dentre elas o TNF. Sua atividade antitumoral e antiproliferativa pode ser um evento importante na regressão de lesões e tumores induzidos pela infecção persistente por HPV (Luger *et al.*, 1985; Beutler e

Cerami, 1987). Deste modo, a resposta imune mediada por citocinas contribui na erradicação das infecções virais (Kyo *et al.*, 1994).

O estudo da interação entre células que expressam genes do HPV e diferentes citocinas demonstrou que algumas delas em conjunto com fatores de crescimento, são capazes de regular a expressão dos genes precoces de HPV e afetar o crescimento de células que contêm o genoma viral (Kyo *et al.*, 1994; Pao *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 2000). Estudos realizados *in vitro* mostraram que a proliferação, diferenciação e imortalização de queratinócitos humanos podem ser moduladas por citocinas. Entre elas, TGF- β (transforming growth factor) e TNF são potentes inibidores da proliferação destas células, podendo desempenhar um papel importante no controle *in vivo* do crescimento das mesmas (Munger *et al.*, 1992; Villa *et al.*, 1992; Vieira *et al.*, 1996). No entanto, os fatores responsáveis pelo crescimento limitado e a freqüente regressão de lesões potencialmente malignas relacionadas às infecções por HPVs de tipo oncogênico ainda são pouco compreendidos. Assim, o aparecimento de um tumor pode ser interpretado, em parte, como o resultado de um processo de escape ao sistema imune, ao longo do qual, certos mecanismos de controle intra e/ou intercelular estão funcionalmente alterados. Além disso, estes mecanismos podem estar associados à perda de sensibilidade das células infectadas por HPV ao controle imune. Deste modo, seria lógico pensar que somente a existência de mecanismos de comunicação fisiologicamente intactos entre células infectadas por HPV e células inflamatórias poderia garantir uma resposta antiviral apropriada.

6. O fator de necrose tumoral (TNF)

O TNF é uma proteína de 17kDa, cuja estrutura se apresenta na forma de um trímero, com aproximadamente 52kDa. O sítio ativo desta molécula corresponde ao domínio que se liga ao receptor na superfície das células, mantendo a simetria trimérica (Schoenfeld *et al.*, 1991).

Receptores para o TNF estão presentes em praticamente todos os tipos celulares, com exceção dos eritrócitos e linfócitos T não estimulados, sendo que seu número varia de 200 até 10000 por célula (Rothe *et al.*, 1992). Os principais componentes das vias de transdução de sinal desencadeadas pelo TNF envolvem os seus receptores TNFR1 e TNFR2, assim como todas as proteínas associadas a estes receptores, que por sua vez recrutam outras proteínas para transduzir o sinal. Dentro deste contexto, diversos trabalhos relatam que o receptor TNFR1 está envolvido nas atividades antivirais, citotoxicidade, ativação de fatores de transcrição e morte celular, após sua ligação com TNF (Wong *et al.*, 1992; Tartaglia *et al.*, 1993).

O TNF age basicamente de três maneiras: 1) induzindo apoptose através da ativação de caspases, 2) ativando diversas proteínas quinases envolvidas no sistema em cascata das MAP quinases e 3) recrutando componentes de sinalização envolvidos na ativação da transcrição gênica promovida pelo fator NF- κ B (Pahl, 1999). Estas cascatas são complexas e ainda não estão completamente elucidadas.

Uma das principais proteínas ativadas pela ligação do TNF ao receptor TNFR1 é o fator de transcrição NF κ B. Esta proteína está presente de forma inativa no citoplasma associada à família de inibidores I κ B e sua ativação pode ser induzida por mais de 150 estímulos diferentes. Sendo um fator de transcrição, esta proteína apresenta um domínio que permite sua ligação ao DNA e sua localização nuclear (Verma *et al.*, 1995). Uma vez ativado, o NF κ B pode agir no controle da transcrição de mais de 200 genes alvo. Alguns destes genes estão envolvidos na resposta imune (cadeias leves das imunoglobulinas, IL-2), na resposta inflamatória (TNF, linfotóxina, IL-1, IL-6), na adesão celular (E-selectina, V-CAM), na proliferação celular (p53, p21, Ras, c-myc) e no controle da apoptose (TRAF1, TRAF2 e algumas proteínas inibidoras da apoptose, como, cIAP1) (Pahl, 1999).

Nas células, o TNF pode exercer efeitos claramente opostos: apoptose e indução da proliferação (Revisado por Szatmary, 1999; Wallach *et al.*, 1999). Estes efeitos dependem, em parte, da localização nuclear e conseqüente ativação do fator de transcrição NF κ B (Baldwin, 1996; Martin *et al.*, 2001). Este é composto por duas subunidades e normalmente encontra-se retido no citoplasma através da sua associação com proteínas da família I κ B (inibidor de κ B) (figura 3). Atualmente, são conhecidas 5 proteínas da família NF κ B/REL: REL (c-REL), p65 (RELA), RELB, p50/p105 (NF κ B1) e p52/p100 (NF κ B2). A composição do fator NF κ B pode variar, afetando sua atividade transcricional. As proteínas REL pertencem a duas classes que se distinguem pela sua síntese e propriedades de transativação. Uma classe consiste de p65 (RELA), RELB e c-REL. Estas proteínas são sintetizadas e apresentam um domínio RHD (REL homology domain) na região amino-terminal, requerido para a dimerização e ligação ao DNA. Os domínios envolvidos na modulação da transcrição encontram-se na região carboxi-terminal. A segunda classe é constituída pelas proteínas NF κ B1 e NF κ B2, que são sintetizadas como precursores maiores (p105 e p100) com um domínio RDH na região amino-terminal e repetições de anquirina na região carboxi-terminal. Este domínio carboxi-terminal é removido por proteólise dependente de ubiquitina, gerando as proteínas maduras (p50 e p52) que apresentam capacidade de união ao DNA (Karin e Ben-Neriah, 2000).

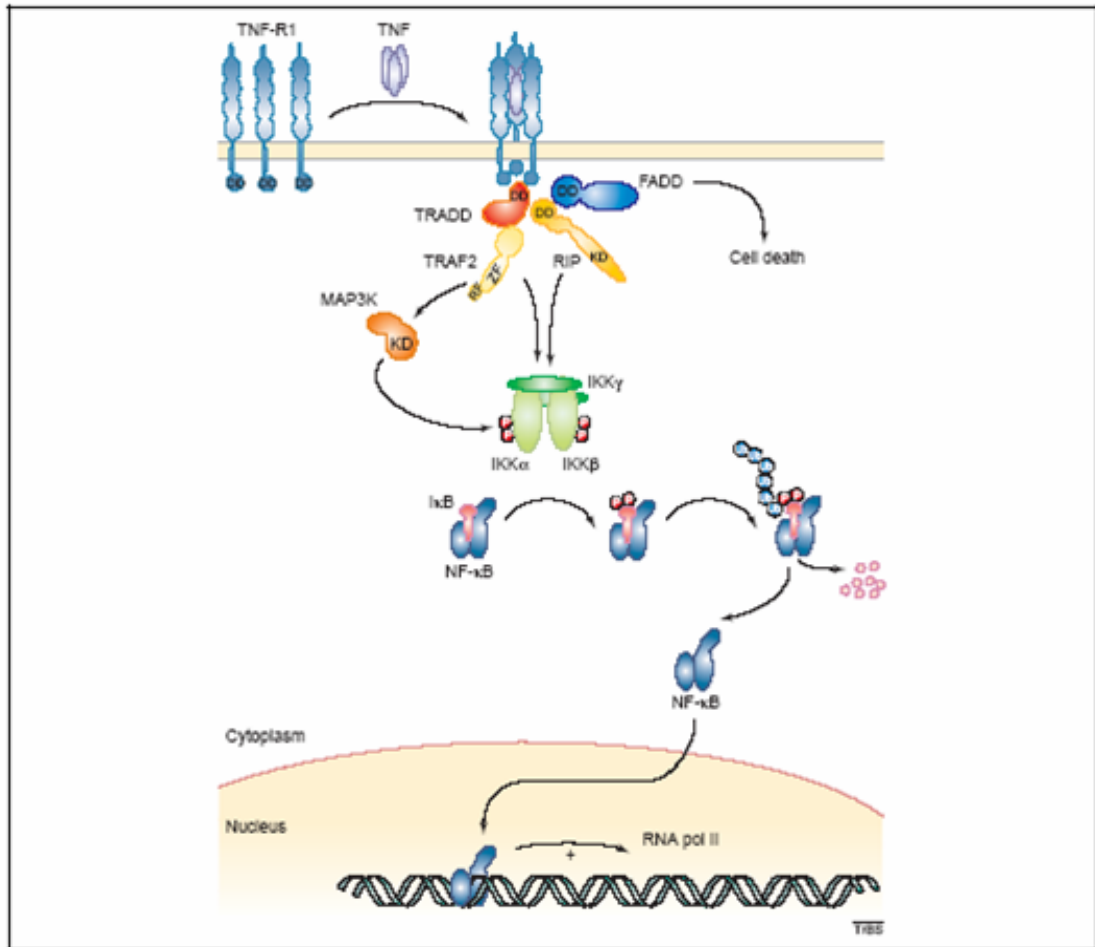


figura 3: Visão geral da via de sinalização de NFκB desencadeada pelo TNF através da ligação ao receptor TNFR1. A ligação ao receptor leva a sua trimerização. A ativação da proteína IKK promove a fosforilação de outra proteína (IκB), que é ubiquitinada e degradada via sistema de proteossoma. Esta promove a translocação do NFκB para o núcleo da célula, aonde se ligará a seqüências promotoras específicas. Abreviações: DD, death domain; FADD, FAS-associated DD protein; IκB, inhibitor of NF-κB; IKK, IκB-kinase; MAP3K, mitogen-activated protein kinase kinase kinase; NEMO, NF-κB essential modulator; NF-κB, nuclear factor-κB; RF, RING (really interesting new gene) finger; RNA pol II, RNA polymerase II; RIP, receptor-interacting protein; TNF, tumor necrosis factor; TNF-R1, TNF receptor 1; TRADD, TNF-receptor-associated DD protein; TRAF2, TNF-receptor-associated factor 2; Ub, ubiquitin; ZF, zinc finger (Extraído de Osborn, 2005).

O TNF amplifica e prolonga a resposta inflamatória estimulando outras células a liberar tanto citocinas, como, por exemplo, IL-1 em tecidos epiteliais, quanto mediadores da sua resposta, como o óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio, que promovem a inflamação e a injúria tecidual. O TNF é essencial para o processo completo da inflamação, tanto que, a diminuição da inflamação é normalmente caracterizada por sua atividade decrescente. A magnitude da resposta inflamatória é crucial: respostas insuficientes resultarão em um baixo número de células imunes, que pode levar às infecções e ao câncer, enquanto que respostas excessivas causarão

morbidade e mortalidade em diversas doenças, tais como: artrite reumatóide, doença de Crohn, arteriosclerose, diabetes, mal de Alzheimer, esclerose múltipla e isquemia miocárdica e cerebral (Tracey, 2002).

O TNF é produzido principalmente por macrófagos ou monócitos ativados (Paul e Ruddle, 1988). Outros tipos de células como as células NK, mastócitos, células endoteliais, queratinócitos e células da musculatura lisa, também são capazes de produzi-lo (Rubin *et al.*, 1986). Esta citocina possui uma ampla variedade de atividades biológicas, tais como: 1) aumento da expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais, fazendo com que haja um acúmulo de leucócitos no local da inflamação; 2) ativação de polimorfonucleares; 3) estimulação da produção de outras citocinas, como, IL 1 e 6 e o próprio TNF, por diversas células do sistema imune; 4) aumento da expressão das moléculas de MHC de classe I, favorecendo a lise mediada pelos linfócitos citotóxicos de células infectadas por agentes virais; e 5) inibição da replicação de alguns vírus (Abbas Ak, 2003).

7. TNF e HPV

Diversos estudos têm analisado o papel do TNF em células infectadas pelo HPV. Algumas pesquisas relatam uma ação direta desta citocina na transcrição das oncoproteínas virais E6 e E7, juntamente com a diminuição da proliferação celular. Linhagens celulares imortalizadas tanto com HPV16 quanto com HPV18, mostraram uma diminuição nos níveis destas proteínas após tratamento com TNF (Kyo *et al.*, 1994). A diminuição de sensibilidade ao TNF, tanto para a transcrição viral, como para a proliferação celular e expressão de proteínas ativadas por esta citocinas, está definitivamente associada à progressão do fenótipo maligno destas células (Rosl *et al.*, 1994). O fator de transcrição AP-1 é essencial para a iniciação e manutenção da expressão viral nas células infectadas pelo HPV. Em células normais e em algumas linhagens

imortalizadas por HPV, o TNF age modificando a composição de AP-1, inibindo conseqüentemente sua atividade transcricional. Este mesmo efeito não ocorre em células transformadas pelo HPV (Soto *et al.*, 1999).

Fibroblastos de camundongo são naturalmente sensíveis ao TNF. No entanto, quando expressam a proteína E6 de HPV16 estas células tornam-se resistentes ao efeito antiproliferativo desta citocina (Duerksen-Hughes *et al.*, 1999). Em fibroblastos humanos observou-se que a expressão do gene E7 de HPV16 promove inibição da apoptose induzida por essa citocina (Thompson *et al.*, 2001). Além disso, culturas organotípicas derivadas de queratinócitos transduzidos com retrovírus que expressam os genes E6/E7 de HPV 16, E6/E7 ou E7 de HPV 18 apresentaram síntese de DNA nas camadas suprabasais do tecido epitelial. Nestes casos, a síntese foi parcialmente inibida pelo tratamento com TNF indicando que estes genes virais conferem aos queratinócitos uma resistência a esta citocina, que não é observada em queratinócitos normais (Boccardo *et al.*, 2004). Estudos mostram que a proteína E6 é capaz de induzir resistência ao TNF, ligando-se ao receptor 1 (TNFR1), protegendo fibroblasto de camundongo, células de osteosarcoma humano e histiócitos/moócitos humanos de apoptoses mediada por TNF (Filippova *et al.*, 2002). Além disso foi observado que a proteína E7 de HPV 16 é capaz de conferir resistência ao efeito antiproliferativo do TNF em queratinócitos (Basile *et al.*, 2001).

Estudos anteriores de nosso grupo demonstraram que células imortalizadas por HPV16 são tão sensíveis ao efeito antiproliferativo exercido pelo TNF, quanto queratinócitos normais. Contrariamente, células imortalizadas tanto por HPV18 quanto por SV40 não paravam de proliferar frente a esta citocina (Villa e Schlegel, 1991; Villa *et al.*, 1992). Alguns trabalhos sugerem que a diferença de atividade das LCRs de HPV16 e 18 poderia ser a principal

responsável pela maior capacidade transformadora do HPV 18. Vale a pena ressaltar que o HPV18 apresenta uma maior capacidade de transformar células *in vitro* do que o HPV16 e que a região promotora deste vírus é de 10 a 50 vezes mais ativa quando comparada à do HPV16 (Romanczuk *et al.*, 1991; Villa e Schlegel, 1991). Resultados semelhantes foram obtidos com linhagens imortalizadas por DNA subgenômico de HPV16 ou HPV18, que expressam apenas as oncoproteínas virais E6 e E7, reguladas pelos seus promotores autólogos (Vieira *et al.*, 1996). No entanto, linhagens celulares tumorais que contém HPV16 e HPV18 são igualmente resistentes ao TNF (Vieira *et al.*, 1996; Bornstein *et al.*, 1997).

O TNF desempenha um papel importante na eliminação de células tumorais por macrófagos ativadas e linfócitos citotóxicos como mecanismo precoce de ação anti-tumoral. Foi observado que esta citocina é capaz de induzir a regressão tumoral de modo comparável a agentes quimioterápicos. Conseqüentemente, a resistência das células tumorais à citotoxicidade do TNF poderia constituir um passo fundamental para o desenvolvimento de tumores *in vivo*. No entanto, os principais aspectos da resistência aos efeitos citotóxicos desta citocina por células tumorais são pouco compreendidos na atualidade. Desta forma, o entendimento dos mecanismos genéticos que modulam os efeitos do TNF nestas células poderia ser de crucial importância no controle da progressão tumoral.

O presente estudo tem como objetivo analisar os efeitos das oncoproteínas virais E6 ou E7 de HPV16 no padrão de expressão gênica global de queratinócitos, visando identificar genes potencialmente envolvidos na resistência ao efeito antiproliferativo do TNF mediada por estas proteínas. Para isto, foram inicialmente analisados os efeitos do TNF na proliferação celular, seguida da análise da expressão gênica por *Microarray*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar o envolvimento das proteínas E6 e E7 de HPV 16 na aquisição de resistência aos efeitos antiproliferativos do TNF utilizando vetores retrovirais que expressam estas oncoproteínas.
- Determinar o envolvimento das proteínas supressoras de tumor p53 e pRb na resposta ao TNF. Para isto foram utilizados vetores retrovirais que codificam proteínas E6 e E7 de HPV 16 normais ou com mutações que impeçam a indução da degradação das proteínas p53 e pRb, respectivamente.
- Estudar o impacto da expressão das proteínas E6 e E7 de HPV-16 (normais e seus mutantes) e do TNF na expressão gênica global de queratinócitos, visando identificar genes potencialmente associados à aquisição de resistência ao efeito antiproliferativo desta citocina, aplicando a tecnologia de *Microarray*.

MATERIAS E MÉTODOS

1. VETORES RETROVIRAIS

Os vetores retrovirais contendo os genes E6 e E7 selvagens e seus mutantes foram gentilmente cedidos pela Dra. Denise A. Galloway (Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, USA) e estão devidamente caracterizados (Halbert *et al.*, 1992; Foster *et al.*, 1994; Demers *et al.*, 1996; Helt e Galloway, 2001). As seqüências de HPV16 estão inseridas no vetor pLXSN (No de acesso GeneBank M28248), sob controle do promotor presente na LTR (Long Terminal Repeat) retroviral (Miller e Rosman, 1989; Chow e Broker, 1997). O gene que confere resistência a neomicina tem sua expressão controlada pelo promotor de SV40 (figura 4).

figura 5: Esquema da proteína E6 de HPV16 (selvagem e mutantes). A proteína E6 é composta por 151 aminoácidos e com 4 domínios Cys-X-X-Cys envolvidos na formação dos 2 dedos de zinco aqui representados. Esta proteína é capaz de unir-se à proteína supressora de tumor p53, alterando sua capacidade funcional e promovendo sua degradação. Os resíduos de aminoácidos alterados em cada um dos mutantes estão mostrados nas cores vermelha e azul, capazes e incapazes de se ligar e induzir a degradação da proteína p53, respectivamente.

1.2.1 Mutante 16E6 Δ 9-13 – apresenta deleção dos resíduos de aminoácidos 9 ao 13 (P-R-K-L-P) da porção amino-terminal da proteína 16E6wt. Esta proteína não é capaz de se ligar ou estimular a degradação de p53 em níveis detectáveis.

1.2.2 Mutante 16E6¹⁵¹ 8S/9A/10T - possui os resíduos de aminoácidos 8, 9 e 10 (R-P-R) da proteína 16E6wt, substituídos pelos aminoácidos correspondentes da proteína E6 de HPV 6 (um tipo de baixo risco oncogênico incapaz de induzir a degradação de p53), não sendo capaz de se ligar ou induzir a degradação de p53.

1.2.3 Mutante 16E6 45Y/47Y/49H - apresenta uma substituição de 3 resíduos de aminoácidos (F por Y nos aminoácidos 45 e 47, e D por H no aminoácido 49) no primeiro dedo de zinco da proteína selvagem. No entanto, mantém a capacidade de se ligar e induzir a degradação de p53.

1.2.4 Mutante 16E6 Δ 78-82 – apresenta deleção de 5 resíduos de aminoácidos (H-Y-C-Y-S) na região central da proteína selvagem, sendo defeituosa para ligação e degradação de p53.

1.2.5 Mutante 16E6 Δ 118-122 – apresenta deleção de 5 resíduos de aminoácidos (H-L-D-K-K) no segundo dedo de zinco da proteína selvagem, o que reduz em 50 vezes sua capacidade de induzir a degradação de p53, quando comparado com 16E6wt.

1.2.6 Mutante 16E6 Δ 123-127 – apresenta deleção de 5 resíduos de aminoácidos (Q-R-F-H-N) no segundo dedo de zinco da proteína selvagem, sendo incapaz de induzir a degradação de p53 e de conferir resistência à parada do ciclo celular imposta pelo tratamento com actinomicina *D in vivo*.

1.3. Proteína E7 de HPV16

A proteína E7 dos diferentes tipos de HPVs é composta por aproximadamente 100 aminoácidos, sendo capaz de se ligar à proteína supressora de tumor pRb (p105) e a outros membros da família (p107 e p130) através de um motivo LxCxE (Mcmurray *et al.*, 2001). Existem três regiões da proteína E7 dos HPVs de alto risco necessárias para a indução de proliferação em células suprabasais e associadas à resistência aos efeitos antiproliferativos do TGF. Duas destas regiões, denominadas regiões conservadas 1 e 2 (CR1 e CR2), apresentam homologia com oncoproteínas de outros vírus (ex. E1A de adenovírus). A terceira região é o dedo de zinco, com duas cópias da seqüência Cys-X-X-Cys, na região C-terminal, importante para dimerização/multimerização de E7 (Munger *et al.*, 2001). A determinação das diferentes funções e atividades da proteína E7 tem sido possível graças ao estudo das propriedades dos mutantes desta proteína. A utilização de mutantes nas regiões CR1, CR2 e na região C-terminal tem permitido determinar o envolvimento das mesmas na transformação celular, ligação às proteínas da família pRb, competição com pRb pela ligação ao fator E2F, na capacidade de aumentar o tempo de vida de queratinócitos em cultura e na resistência aos efeitos regulatórios de fatores de crescimento e citocinas (Zerfass *et al.*, 1995; Demers *et al.*, 1996; Park *et al.*, 2000; Zwerschke e Jansen-Durr, 2000; Helt e Galloway, 2001; Koromilas *et al.*, 2001).

1.4. Mutantes da proteína E7 de HPV 16

Assim como feito para a proteína E6, a figura 6 representada a proteína E7 selvagem de HPV16 (16E7wt), na qual estão indicadas às alterações na seqüência de aminoácidos de cada um dos mutantes utilizados. Estes mutantes incluem alterações nas três regiões funcionalmente mais importantes da proteína E7 e suas características previamente descritas (Demers *et al.*, 1996; Helt e Galloway, 2001) estão resumidas a seguir.

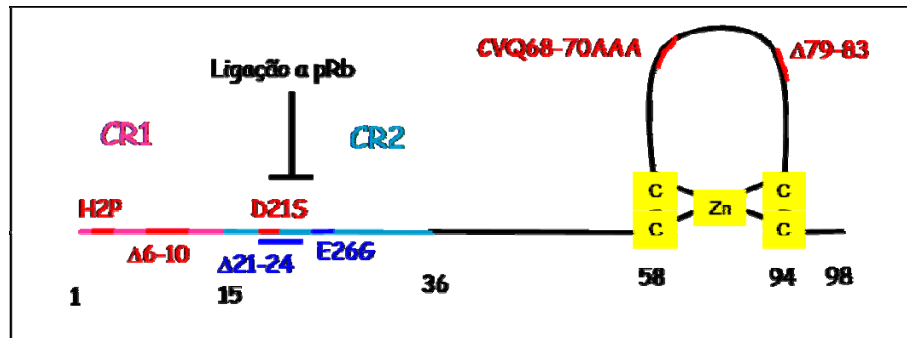


figura 6: Esquema da proteína E7 de HPV16 (selvagem e mutantes). A proteína E7 é composta por aproximadamente 100 aminoácidos com 3 regiões funcionalmente distintas. Duas destas regiões, denominadas regiões conservadas 1 e 2 (CR1 e CR2), apresentam homologia com oncoproteínas de outros vírus. A terceira região é o dedo de zinco, com duas cópias da seqüência Cys-X-X-Cys, na região C-terminal, importante na dimerização/multimerização de E7. Esta proteína é capaz de unir-se à proteína supressora de tumor pRb, alterando sua capacidade funcional e promovendo sua degradação. Os resíduos de aminoácidos alterados em cada um dos mutantes estão mostrados nas cores vermelha e azul, capazes e incapazes de se ligar e induzir a degradação da proteína pRb, respectivamente.

MUTANTES EM CR1

De acordo com os ensaios funcionais realizados, estes mutantes não são capazes de transformar células de roedor, além de não aumentar a proliferação de queratinócitos primários em cultura. Por outro lado, são capazes de se ligar à proteína pRb sem afetar sua meia vida ou diminuir a ligação ao fator E2F.

1.4.1 Mutante 16E7 H2P - possui uma substituição no resíduo de aminoácido 2 (H por P) da proteína selvagem.

1.4.2 Mutante 16E7 Δ6-10 - apresenta deleção dos resíduos de aminoácidos 6 à 10 da proteína selvagem.

MUTANTES EM CR2

1.4.3 Mutante 16E7 D21S – possui uma substituição no resíduo de aminoácido 21 (D por S) na proteína selvagem, sendo capaz de transformar células de roedor, aumentar a proliferação nas

camadas suprabasais de culturas organotípicas de queratinócitos, conferir resistência ao TGF- β e ligar-se às proteínas pRb e p107.

1.4.4 Mutante 16E7 Δ 21-24 - possui deleção nos resíduos de aminoácidos 21 à 24 da proteína selvagem.

1.4.5 Mutante 16E7 E26G - possui uma substituição no resíduo de aminoácido 26 (E por G) na proteína selvagem, mas mantém a capacidade de se ligar à proteína p107.

Estes dois últimos mutantes não são capazes de transformar células de roedor, não aumentam a proliferação de queratinócitos e não se ligam à proteína pRb.

MUTANTES NA REGIÃO C- TERMINAL

1.4.6 Mutante 16E7 CVQ68-70AAA - possui uma substituição nos resíduos de aminoácidos 68-70 da proteína selvagem, por alaninas.

1.4.7 Mutante 16E7 Δ 79-83 - possui deleção dos resíduos de aminoácidos 79 ao 83 da proteína selvagem.

Estes dois mutantes são capazes de se ligar à proteína pRb e diminuir a sua meia vida. Além disso, bloqueiam a união de pRb ao fator E2F e inibem o efeito antiproliferativo de pRb em células Saos-2. Entretanto, estes mutantes são incapazes de superar o bloqueio do ciclo celular imposto por danos ao DNA.

Os vetores pLXSN vazio e contendo os genes E6 ou E7 de HPV 16 (normais ou mutantes), foram utilizados para transformar bactérias *Escherichia coli* DH5 α por choque térmico. Estas bactérias foram plaqueadas em meio LB-agar 1.5% contendo ampicilina (50 μ g/ml) e crescidas a 37°C, por aproximadamente 14 horas. Cinco colônias foram transferidas, cada uma para um

tubo contendo 6 ml de meio de cultura LB (*Luria Bertani*: 1 g triptona, 0,5 g extrato de levedura, 0,5 g NaCl, 1ml Tris pH 7.4, 0,1ml MgSO₄ 1M para 50ml de água destilada e deionizada) acrescido de ampicilina (50ug/ml), e incubado a 37°C por aproximadamente 20 horas, sob agitação vigorosa. Os plasmídios foram purificados utilizando o kit Wisard™ Minipreps DNA Purification System (Promega). A presença dos genes E6 ou E7 foi avaliada através de PCR, utilizando iniciadores específicos. Finalmente, as células foram armazenadas a -70°C em meio LB contendo 15% de glicerol.

2. ISOLAMENTO DO DNA DOS VETORES EM LARGA ESCALA (Maxi-preparação)

O DNA dos vetores retrovirais foi isolado por maxi-preparação de acordo com Sambrook & Russel (2001). Inicialmente foi feito um esfregaço, de cada um dos estoques bacterianos dos vetores além do vetor vazio (pLXSN), em placa de L.B.-agar 1.5% contendo ampicilina a 50µg/ml. As placas permaneceram em estufa a 37°C por 16h para permitir o crescimento de colônias visíveis a olho-nu. Em seguida, uma colônia referente a cada vetor recombinante foi inoculada em 30ml de meio de cultura Terrific Broth (*Terrific Broth*: 12 g de triptona, 24 g de extrato de levedura, 4ml de glicerol 89%, 100ml de solução 0.17M KH₂PO₄ e 0.72 M K₂HPO₄ para 1 litro de solução) acrescido de 100µg/ml ampicilina. Este inóculo permaneceu a 37°C sob agitação constante (240 rpm) até que a D.O.600 atingisse o valor aproximado de 0.6. Nesse momento, o inóculo gerado foi adicionado a 500ml de meio de cultura TB contendo 100 ug/ml de ampicilina. Esta solução foi incubada por 16h a 37°C sob agitação de 240 rpm. Após este período, a cultura resultante foi centrifugada a 3.000 rpm, por 15 minutos a 4°C, sendo, em seguida descartado o sobrenadante. Cada *pellet* foi ressuscitado em 200ml de STE gelado (10mM Tris-HCl (pH 8), 0,1M NaCl, 1mM EDTA), e centrifugado a 8.000 rpm, durante 15 minutos, a 4°C, e novamente o sobrenadante foi descartado. Cada *pellet* foi, então, ressuscitado em 18ml de solução de ressuspensão (50 mM glicose, 25 mM Tris-HCl (pH 8), 10

mM EDTA). Foram então adicionados 2 ml de lisozima (10 mg/ml), e 40 ml de solução de lise (0.2N NaOH, SDS 1%), e após mistura por inversão, foi incubada a temperatura ambiente por 7 minutos. Nesta etapa, foram adicionados 20 ml de solução de neutralização (3M acetato de potássio, ácido acético glacial 11.5%), e após mistura por inversão e incubação em gelo por 10 minutos, centrifugou-se a 5.000 rpm por 40 minutos, a 4°C. Posteriormente, o sobrenadante foi vertido em uma proveta onde se seguiu adição de isopropanol (0.6 vezes do volume obtido). Esta solução foi homogeneizada e incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. Após esta etapa, foi realizada uma centrifugação a 5.000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 70%. Após sua secagem o mesmo foi ressuscitado em 3 ml de tampão T.E. 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA. 1 mM pH 8,0). Todo o procedimento descrito acima foi realizado em uma centrífuga Sorvall® RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge (rotor Sorvall® H1000B).

3. PURIFICAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO POR GRADIENTE DE DENSIDADE (CsCl)

O DNA plasmidial extraído por maxi-preparação foi purificado por gradiente contínuo de cloreto de cério formado a partir de ultracentrifugação, de acordo com Sambrook & Russel (2001). Os *pellets* dissolvidos em tampão T.E. foram pesados e para cada grama de solução foi adicionado 1.01 g de CsCl sólido (Invitrogen). Para agilizar a dissolução do sal, a solução foi incubada a 37°C. Após a dissolução completa do sal na solução tampão-DNA, foram adicionados 100 µl de brometo de etídio (10mg/ml), para cada 5g de solução de DNA original. As amostras foram então centrifugadas em centrífuga *Sorvall® RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge* (rotor *Sorvall® H1000B*), a 3.000 rpm, por 5 minutos, a temperatura ambiente. Com auxílio de uma seringa descartável, a solução foi transferida para um tubo de ultracentrifugação (Ultra Clear™ Tubes, 16 x 76 mm, Beckman), e os tubos foram preenchidos até aproximadamente 3cm da borda com solução de 1.01 g de CsCl por ml de tampão T.E. (pH 8), sendo o resto do tubo

preenchido com óleo mineral (Nujol). Os tubos foram então lacrados e submetidos à ultracentrifugação a 45.000 rpm a 20°C por 48 horas em ultracentrífuga Beckman L8-M (rotor 50Ti). Após 48 horas de centrifugação, em uma sala com pouca luz, a banda referente ao DNA dupla fita circular plasmidial foi removida utilizando-se uma agulha de 19G conectada a uma seringa de 5ml de capacidade. Essa solução contendo o DNA de interesse foi transferida para um tubo de polipropileno e o brometo de etídio removido por sucessivos ciclos de adição de n-butanol saturado em água, homogenização, centrifugação a 3.000 rpm por 3 minutos e retirada da fase orgânica, até que a solução contendo o DNA estivesse completamente transparente (aproximadamente 4 ciclos).

Com o objetivo de retirar o cloreto de cézio das soluções de DNA, estas foram dialisadas em 2 litros de tampão 1X T.E. utilizando-se os tubos para diálise Prepared Dialysis Tubing (Gibco/BRL), por 20 horas. A solução contendo DNA foi então removida do tubo de diálise e precipitada durante 1 hora, a -70°C, utilizando-se 2.5 volumes de etanol 100% e 0.1 volumes de 3M acetato de sódio. Em seguida, os *pellets* de DNA foram secos a vácuo, e ressuspendidos em 2ml de água destilada e deionizada. A concentração do produto gerado foi avaliada através de espectrofotometria em NanoDrop® (ND-1000 Spectrophotometer).

4. TRANSFEÇÃO DA LINHAGEM CELULAR ECOTRÓPICA BOSC 23

Os vetores retrovirais foram transfectados na linhagem celular ecotrópica Bosc 23 (ATCC CRL-11270) por eletroporação. Para cada vetor retroviral foram utilizadas 5×10^6 células diluídas em 250 μ l de meio de cultura DMEM. Na cubeta de eletroporação com espaçamento de 4mm entre os eletrodos (Bio-Rad), foram colocados 15 μ g de cada vetor recombinante, 2.5 μ l de 0.5M BES (ácido N,N-bis[2-Hydroxietil]-2-aminoetanosulfônico - Sigma-Aldrich) (pH 7.2) e 50 μ g de DNA de esperma de salmão (Invitrogen) junto com as células e foi dado um choque elétrico a 960 μ F,

170 volts em um aparelho Gene Pulser II (Bio-Rad). Após o choque as células foram plaqueadas em 7 ml de meio D10 (DMEM + 10% soro fetal bovino (SFB - Cultilab)) em placas de cultura com 10 cm de diâmetro. Depois de 4 horas, o meio foi substituído por 10 ml de meio D10 fresco.

5. INFECÇÃO DA LINHAGEM CELULAR ANFOTRÓPICA AM-12

Aproximadamente 48 horas após a transfecção dos vetores retrovirais na linhagem celular Bosc 23, o sobrenadante dessas células foi aspirado com uma seringa de 5 ml de capacidade. A seringa foi, então, acoplada a um filtro de 0,45 µm e o conteúdo do sobrenadante foi gotejado sobre as células Am-12 (Markowitz *et al.*, 1988) previamente cultivadas em placas com 10 cm de diâmetro, até uma confluência de aproximadamente 10% e com o meio previamente aspirado. Foi então agregado ao meio polibreno (Sigma-Aldrich) em concentração final de 10 µg/ml. Após 6 horas foram adicionados mais 5 ml de meio de cultura D10. Aproximadamente 48 horas após a infecção, iniciou-se a seleção com Geneticina (Gibco/BRL) em uma concentração final de 600 µg/ml, durante uma semana.

6. INFECÇÃO DOS QUERATINÓCITOS PRIMÁRIOS HUMANOS

Para a infecção de PHKs (*Primary Human Keratinocyte*), derivados de prepúcio de recém nascidos (Clonetics), foram utilizadas partículas retrovirais empacotadas pela linhagem Am-12, previamente selecionadas. Os PHKs foram semeados em placas de 60mm de diâmetro numa densidade de 10^5 células/placa. Após 48h de cultivo das células Am-12 em 5 ml de meio, o sobrenadante contendo partículas retrovirais infecciosas foi gotejado sobre os PHKs semeados no dia anterior. Para aumentar a eficiência de infecção foi utilizado polibreno (Sigma-Aldrich) na concentração de 10 µg/ml. Após 45 minutos foi adicionado à cultura 5 ml de meio de cultivo de PHKs (*KSFM-Keratinocytes Serum Free Media*) suplementado com EGF recombinante e extrato de pituitária bovina (Invitrogen). Este passo é importante para minimizar o efeito do soro fetal

bovino sobre estas células uma vez que, o cálcio presente no mesmo, induz a diferenciação e parada de proliferação dos PHKs. Quatro horas após a infecção, o meio contendo as partículas retrovirais foi completamente substituído por KSFM fresco. Dois dias depois o meio foi aspirado e os PHKs selecionados em meio de cultivo contendo 250 µg/ml de geneticina (Invitrogen) por 48 horas. Finalmente, o meio foi substituído por KSFM fresco para expansão das células infectadas.

7. CULTURA DE CÉLULAS

7.1. Cultura em monocamada

Para a cultura de células em monocamada, foram utilizados PHKs normais ou transduzidos com o vetor pLXSN vazio ou contendo os genes E6 ou E7 de HPV 16 (normais ou mutantes), cultivados em meio KSFM suplementado com fator de crescimento epidérmico (5ng/ml) e extrato de pituitária bovina (50ug/ml). As células foram mantidas em uma estufa úmida, a 37°C, com atmosfera de 5% de CO₂. Ao atingirem, 40-50% de confluência, o meio de cultura foi substituído por KSFM nas amostras controle e por KSFM contendo 2 nM de TNF humano recombinante (Boehringer Mannheim), nas amostras tratadas. Em ambos os casos, as células foram mantidas em cultura por 60 horas, seguida de extração de proteína e de RNA, conforme descrito adiante.

7.2. Cultura Organotípica (*raft*) de queratinócitos

O modelo de cultura organotípica de queratinócitos é um sistema que permite a produção de um epitélio escamoso estratificado, com arquitetura muito semelhante àquela observada *in vivo*. Este modelo é considerado uma importante ferramenta de estudo para compreensão dos fenômenos biológicos envolvidos na regulação da homeostase da epiderme, devido a sua capacidade em mimetizar não só as propriedades morfológicas do tecido, mas também suas propriedades bioquímicas (Revisado por Chow e Broker, 1997). Além da geração de tecidos

epiteliais com características semelhantes ao epitélio normal, este sistema permite a produção de um tecido com alterações compatíveis àquelas observadas em neoplasias epiteliais de vários graus histológicos.

Muitos tipos de vírus, incluindo o HPV, utilizam o epitélio humano como sítio primário de infecção e replicação. A estrutura tridimensional dos rafts permite estudar o efeito das infecções virais de maneira temporal e espacial. Mais importante ainda é o fato destas culturas reproduzirem de maneira fidedigna o programa de diferenciação epitelial. Essa característica torna este sistema único e primordial para a compreensão da biologia do HPV no contexto mais próximo ao do epitélio normal.

Para melhor compreensão dos fenômenos envolvidos na patogênese induzida por HPV, a maioria dos rafts elaborados, para o estudo da biologia do vírus e de suas doenças associadas, utiliza queratinócitos derivados da região ano-genital. Inúmeros estudos apontam a importância de se estudar as alterações induzidas pela expressão de genes virais neste modelo de cultura. Estes estudos contribuem, de maneira significativa, para a compreensão dos fenômenos induzidos pela infecção por HPV (Cheng *et al.*, 1995a; Demers *et al.*, 1996; Frattini *et al.*, 1996; Noya *et al.*, 2001; Boccardo *et al.*, 2004).

7.2.1. Preparação do equivalente dérmico

A elaboração de um *raft* de PHKs envolve necessariamente a criação de uma matriz que propicie não só uma base para a adesão das células, mas também uma estrutura que reproduza as condições encontradas na derme. Essa matriz, conhecida como equivalente dérmico, é composta basicamente de colágeno (80% de colágeno tipo I de cauda de rato (BD Bioscience)), células *feeders* (fibroblastos de camundongo derivados de NIH3T3, denominadas células J2

(Revisado por Chow e Broker, 1997)) e suplementos (10% de meio Ham's F12 10x (Invitrogen) e 10% do volume de meio de reconstituição 10x (NaHCO₃ 2,2%, 0.05M NaOH, 200mM HEPES)). Para constituição do equivalente dérmico as células J2 foram previamente cultivadas em meio D10 até atingirem 60%-70% de confluência, quando foram tripsinizadas e contadas. Para cada 1 ml de equivalente dérmico foram utilizadas $1,3 \times 10^5$ células J2 ressuspensas em soro fetal bovino (5% do volume final de equivalente dérmico). Após a mistura por inversão de todos os componentes, com o cuidado de evitar a formação de bolhas, o equivalente dérmico foi distribuído em uma placa de 24 poços na quantidade de 0,75 ml/poço. Após a solidificação, a temperatura ambiente por 40 minutos, foi adicionado à cada poço 1 ml de meio para raft (90% meio 3+1 (3 DMEM + 1 HamF12), 10%SFB; 1 nM Toxina colérica (Sigma-Aldrich), 5µg/ml Insulina (Sigma-Aldrich), 5 µg/ml apo-transferina (Sigma-Aldrich), 0,4 µg/ml Hidrocortisona-21-hemisuccinato (Sigma-Aldrich), 0,5 ng/ml EGF (Gibco/BRL)) e a placa foi mantida a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂, até a adição dos PHKs.

7.2.2. Cultura organotípica de queratinócitos normais (figura 7 e figura 8)

Os PHKs normais ou infectados com vetor retroviral foram cultivados em placa de Petri de 60mm até atingirem uma confluência de 80-90%, quando foram tripsinizados, contados e ressuspensos em meio KSFM (2×10^5 células por ml). Em seguida, estas células foram semeadas sobre o equivalente dérmico em uma densidade de 1×10^5 células/poço, em uma placa de cultura de 24 poços. Logo após, foi adicionado 0.5ml de meio para *raft* em cada um dos poços e a placa foi colocada a 37 °C a uma atmosfera de 5% de CO₂. No dia seguinte, o meio foi substituído por 1 ml de meio para *raft* fresco e a matriz de colágeno de cada poço foi descolada da placa utilizando-se uma espátula. Após oito horas cada matriz de colágeno, com a superfície coberta por PHKs, foi transferida para uma grelha de aço colocada em uma placa de Petri de 60 mm. Posteriormente, foram adicionados 5 ml de meio para *raft* por placa e as mesmas foram mantidas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. A cada 48 horas foi realizada

uma troca de meio e seis dias após a transferência à interface ar-meio, os *rafts* foram tratados com 2 nM TNF por 72 horas sendo que as últimas 12 horas de cultura foram realizadas na presença de 100 µg/ml bromodeoxiuridina (BrdU, Gibco/BRL), a fim de possibilitar uma detecção posterior das células em proliferação. Em todos os casos, utilizamos placas controle não tratadas com TNF.

Os *rafts*, resultantes de três infecções independentes, foram feitos em triplicatas, sendo uma réplica utilizada para extração de proteínas, uma para extração de RNA e a remanescente utilizada para análise histológica.

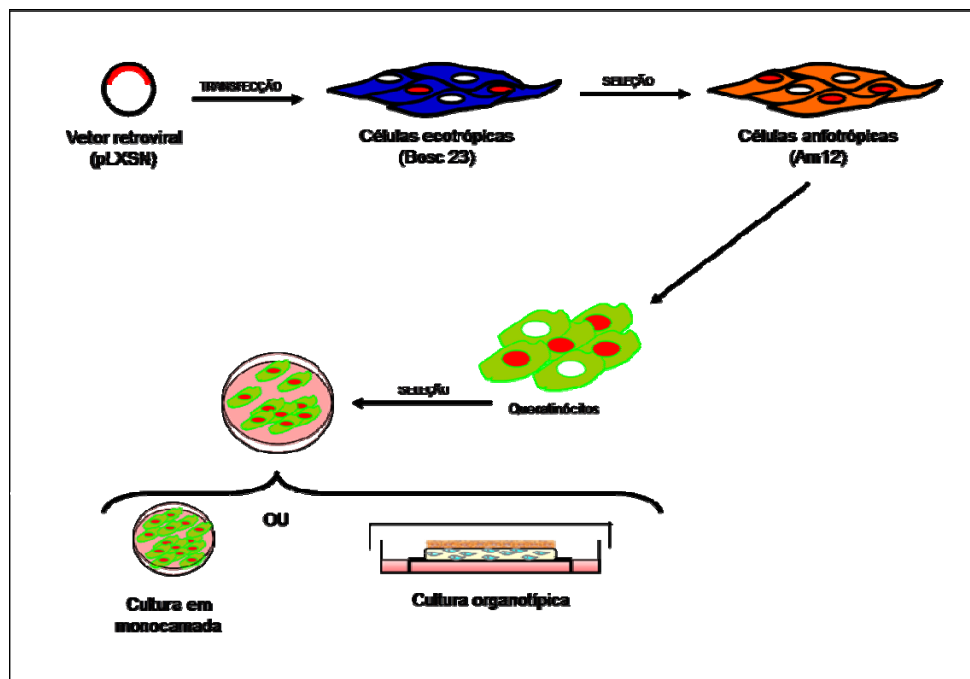


figura 7: Etapas na obtenção de culturas organotípicas de queratinócitos humanos normais ou portadores de genes de HPV.

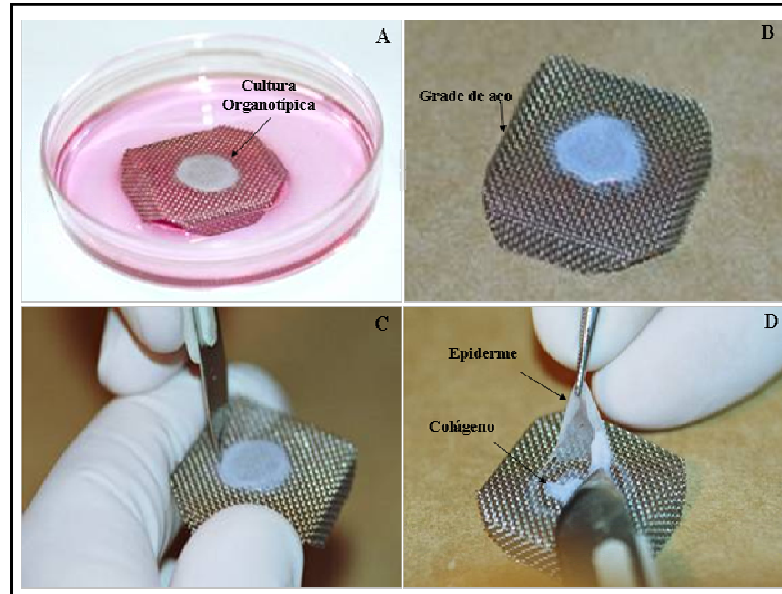


figura 8: Obtenção da cultura organotípica (raft). A: Cultura organotípica após 9-11 na interface-ar-meio. B: Grade de aço onde ocorre a diferenciação do *raft*. C: Corte das bordas do raft com bisturi. D: Separação da epiderme da matriz de colágeno.

8. EXTRAÇÃO DE RNA E TRATAMENTO COM DNase

Para extração de RNA a partir das culturas em monocamada, as células foram previamente tripsinizadas e o *pellet* ressuspendido em 1.2 ml de tampão RLT contendo 10 μ l/ml β -mercaptoetanol, primeiro tampão de extração de RNA do RNeasy Mini Kit (Qiagen). O RNA foi isolado utilizando RNeasy Mini Kit (Qiagen) e tratado concomitantemente com RNase-Free DNase Set (Qiagen), segundo instruções do fabricante.

Para extração de RNA a partir dos *rafts*, o tecido epitelial foi separado da matriz de colágeno utilizando pinça e bisturi, colocado em um tubo *ependorf*, contendo *RNA Later* (Qiagen) e armazenado a -80°C . O RNA foi retirado do RNA Later e colocado imediatamente em Trizol, homogeneizado com auxílio de uma pipeta e extraído segundo instruções do fabricante. O RNA isolado foi tratado com RNase-Free DNase Set (Qiagen), utilizando as colunas do RNeasy Mini Kit (Qiagen), segundo instruções do fabricante.

Em ambos os casos, os RNAs tratados foram quantificados por espectrofotometria em NanoDrop® (ND-1000 Spectrophotometer) e avaliados qualitativamente (1 µg de RNA + 5 µl de tampão de uréia 7.5M + água DEPC em quantidade suficiente para um volume total de 10 µl) em gel de agarose 1% em TAE (0,04 M Tris acetato e 1 mM de EDTA). Todas as amostras foram estocadas a -80°C.

9. NORTHERN BLOT

Os RNAs extraídos conforme descrito anteriormente foram analisados em um gel de agarose 1% na presença de formaldeído. Para um gel de 100 ml foram utilizados 1 g de agarose (Gibco/BRL), 2 ml de borato 50x (1M ácido bórico, ajustado com NaOH até pH 8.3), 50 µl de EDTA (0.5M, pH 8) e 17 ml de formaldeído 37% (Merck).

As amostras foram preparadas colocando-se 10µg de cada RNA em um volume final de 20 µl. Em seguida, foram acrescentados 20 µl de tampão de amostra (20% glicerol, borato 1x, 0.2 mM EDTA, 50% formamida, 16% formaldeído e azul de bromofenol) e estas foram incubadas em banho-maria a 65°C por 10 minutos, sendo imediatamente transferidas ao gelo (5 minutos). Finalmente as amostras foram aplicadas no gel e submetidas a eletroforese a 70 volts em tampão de corrida (borato 1x, 0.5mM EDTA e 5% formaldeído) durante 4 a 5 horas.

O gel foi lavado em 4x SSC (0.6M NaCl, 60mM citrato de sódio, pH 6.45) e 10x SSC (1.5M NaCl, 0.15M citrato de sódio, pH 6.45) por 20 minutos, a fim de eliminar o excesso de formaldeído. As amostras foram transferidas por capilaridade a uma membrana de nylon (Hybond-N) com 10x SSC durante 12 a 16 horas. A eficiência de transferência foi conferida mediante visualização do RNA utilizando uma lâmpada UVG-11 (Mineralight) de baixo

comprimento de onda (254 nm) e os RNA foram fixados na membrana utilizando um UV Crosslinker FB-UVXL-1000 (FisherBiotech).

As sondas para E6 e E7 de HPV16 (correspondente ao produto de amplificação) foram marcadas com $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP pelo método de *random priming* utilizando o *kit Ready to Go* (Amersham Pharmacia Biotech).

A hibridização foi realizada a 65°C durante 16 horas em solução de hibridização (0.25M Na_2HPO_4 , 7% SDS, 1% BSA, 1mM EDTA). Posteriormente, a membrana foi lavada com uma solução de lavagem (0.25M Na_2HPO_4 , 1% SDS e 1mM EDTA) durante 30 minutos a 65°C, a fim de retirar o excesso de sonda. Finalmente, as membranas foram expostas a filmes de raios X a 70°C, por 36 a 48 horas.

10. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS

A extração de proteínas foi realizada mediante lise celular em tampão de lise (50mM HEPES pH 7.0, 1mM DTT, 250mM NaCl, 4mM EDTA, 10 μ M ZnCl_2 , 0.5% NP-40), suplementado com inibidores de protease (Complete Mini kit, Roche Diagnostics) e posterior separação da fração protéica. A concentração protéica foi determinada pelo método de *Bradford* (Bio-Rad).

11. ENSAIOS DE WESTERN BLOT

Para a determinação dos níveis das proteínas de interesse o extrato protéico foi fracionado em *SDS-PAGE*, seguido de transferência para membranas de PVDF (*Hybond-P*, Amersham Pharmacia Biotech). Após a transferência foi realizado o bloqueio da membrana com PBS-T (20mM pH 7.6 Tris, 137mM NaCl, Tween-20 0,05%) contendo 5% de leite em pó, por 1 hora. Seguidamente as membranas foram incubadas com anticorpos específicos descritos na tabela 1.

Após a lavagem do anticorpo primário e incubação com o anticorpo secundário, específico conjugado à peroxidase (Amersham Pharmacia Biotech), as membranas foram lavadas quatro vezes com PBS-T e finalmente reveladas utilizando o kit ECL (Amersham Pharmacia Biotech). Para normalização dos resultados foi utilizado o anticorpo monoclonal anti- α -tubulina (Sigma-Aldrich). Os resultados obtidos foram submetidos a densitometria utilizando o programa Scion Image for Windows para normalização e quantificação .

tabela 1: Lista de Anticorpos utilizados nos ensaios de Western-blot e Imunohistoquímica

Anticorpo	Origem	Diluição	Fabricante:
Anti-tubulina	Camundongo	1:5000	Sigma-Aldrich-Aldrich
Anti-p53	Camundongo	1:200	Novocastra Inc.
Anti-pRb	Camundongo	1:500	Novocastra Inc.
Anti-PCNA	Camundongo	1:1000	Zymed Laboratories Inc.
Anti-BrdU	Camundongo	1:500	Zymed Laboratories Inc.

12. MEDIDA DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

Os efeitos do TNF na proliferação das células em cultura foram avaliados mediante ensaios de incorporação de timidina tritiada, para culturas em monocamada, e por imunohistoquímica (IHQ) com anticorpo anti-BrdU (Zymed Laboratories Inc.), em *raft*.

12.1. Em cultura em monocamada: Incorporação de ^3H -Timidina

Os PHKs foram semeados em placas de 6 poços numa densidade de 5×10^5 células/poço. Após 24 horas os mesmos foram tratados com TNF na concentração final de 2 nM. Estas células permaneceram neste meio por 60h. Nas últimas 12 horas de tratamento, as culturas de PHKs foram mantidas em presença de [metil- ^3H] timidina

(1 μ Ci/ml) (Amersham Pharmacia Biotech). Após a lavagem das placas com PBS 1x (pH 7.4) estas foram fixadas com etanol absoluto, a 4°C durante 15 a 20 minutos. As células foram então solubilizadas em 1 ml de 0.5 N NaOH por 2 a 3 minutos e neutralizadas com 0.962 ml de 0.5N HCl. Em seguida, 300 μ l dessa solução foram acrescentados a 3 ml de líquido de cintilação (Sardi) e a incorporação de radioatividade foi avaliada por cintilação líquida em um cintilador Beckman LS 6800. O resultado foi obtido através de contagens por minuto (CPM). Foram realizados, no mínimo, 3 experimentos independentes para cada tipo celular.

12.2. Em raft: IHQ com anti-BrdU

Após 9-12 dias na interface ar-meio (incluindo 72 horas de tratamento com TNF e as últimas 12 horas na presença de 100 μ g/ml BrdU) os *rafts* foram fixados, incluídos em parafina e cortados em secções de 4 μ m. A detecção por IHQ foi realizada utilizando anticorpo anti-BrdU, segundo o protocolo descrito a seguir.

13. PREPARAÇÃO DOS RAFT PARA IMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)

Para avaliação histológica dos *rafts*, após 9-12 dias na interface ar-meio (incluindo 60 horas de tratamento com TNF e 12 horas na presença de BrdU, no caso do item 12.2) estes foram lavados com PBS pH 7.4, fixados por 45 minutos em formol tamponado ao 10%, e posteriormente incluídos em parafina. Os tecidos foram então seccionados em cortes 4 μ m. Estes cortes foram dispostos em lâminas revestidas com silano (Superfrost Plus, Erviegas Instrumental Cirúrgico Ltda) que promove melhor aderência do tecido. A coloração com hematoxilina-eosina (HE) foi utilizada para avaliação morfológica geral do tecido (Junqueira, 1983).

As secções obtidas a partir dos *rafts* foram incubadas a 65°C por 1h. Após esta etapa, as lâminas passaram pelo processo de desparafinização com banhos de xilol: o primeiro deles a 60°C, por 20 minutos, seguido de outro à temperatura ambiente por mais 20 minutos. Seguiu-se então a etapa de re-hidratação, onde as lâminas foram banhadas por 30 segundos em etanol 100%, 30 segundos em etanol 95% e 30 segundos em etanol 70%. Após esta etapa, as lâminas foram lavadas em água corrente e em água destilada. Para recuperação antigênica as lâminas foram mergulhadas em solução 10mM citrato de sódio (pH6) em ebulição. Esta etapa foi realizada em panela de pressão (Eterna®, Nigro). Após a adição das lâminas à solução de citrato, a panela foi tampada e quando esta atingiu a pressurização total foi iniciada a contagem de 4 minutos para completar a recuperação antigênica. A panela foi então resfriada sob água corrente por 10 minutos. Após a lavagem das lâminas em água corrente e destilada foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena. Nesta etapa foram realizados 4 banhos de 5 minutos cada com H₂O₂ 3%. As lâminas foram lavadas em água corrente e destilada e submetidas a uma lavagem com 10mM PBS (pH 7.4) por 5 minutos. Para identificação antigênica foram utilizados os anticorpos listados na tabela 1. Estes foram incubados solução de PBS (pH 7.4) contendo 1% BSA (Sigma Aldrich) e 0,1% azida sódica (NaN₃) por 18 horas a 4°C em câmara úmida. Após este período, as lâminas foram submetidas a 3 lavagens de 3 minutos cada com PBS. Seguiu-se então a incubação com anticorpo secundário biotilado (reagente C) do Kit StrepABComplex/HRP Duet (mouse/rabbit) (Dako) no título estabelecido 1:200 diluído em PBS (pH 7.4) por 30 minutos a 37°C. Após esta etapa foram realizadas 3 lavagens de 3 minutos cada com PBS (pH 7.4) seguidas de incubação das lâminas com o complexo (reagente A-streptavidina) e (reagente B-peroxidase biotilada) nos títulos pré-estabelecidos de 1:200, diluídos em PBS (pH 7.4) por 30 minutos à 37°C. Para revelação do sinal as lâminas foram incubadas em solução DAB (3,3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride) (Sigma Aldrich) por 5 minutos à 37°C, seguida da adição de corante hematoxilina de Harris (contra-coloração). Após a

desidratação com banhos sucessivos em álcool absoluto e xilol as lâminas foram montadas utilizando a resina sintética Entelan (Merck).

As imagens foram obtidas com uma câmera digital DEI-470 (OPTRONICS Engineering), acoplada a um microscópio (Olympus é IX70) e processadas digitalmente utilizando Photoshop 7.0 (Adobe Systems).

14. ESTUDO DE EXPRESSÃO GÊNICA POR MICROARRAYS DE CDNA

14.1. Amplificação de RNA

A amplificação do mRNA foi realizada a partir dos RNAs totais extraídos, incluindo o RNA utilizado como referência, obtido a partir de cultura em monocamada de PHK normal. A padronização do protocolo de amplificação de mRNA foi baseada em alguns estudos (Wang *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2002; Gomes *et al.*, 2003).

14.1.1. Síntese da primeira fita do cDNA

Para a síntese da primeira fita de cDNA, utilizou-se 3 µg de RNA total ao qual foi adicionado 1 µl de 0.5 µg/ul oligo dT(24)-T7 primer (IDT) e água DEPC (Dietil Pirocarbonato) em quantidade suficiente para 7.7 µl. A amostra foi incubada por 10 minutos em termociclador a 70°C e imediatamente colocada em gelo por 2 minutos. Em seguida, adicionou-se seqüencialmente, 4 µl de 5X IMPROM II *First Strand Buffer* (Promega), 4.8 µl de 25mM MgCl₂, 0.5 µl de RNasin (Promega), 2 µl de 10mM dNTP (Pharmacia) e 1 µl de IMPROM II RT (Promega) e esta foi incubada por 90 minutos a 42°C em termociclador.

14.1.2. Síntese da segunda fita do cDNA

Para a síntese da segunda fita do cDNA, adicionou-se seqüencialmente 16.9µl de água DEPC, 10µl de 5X *Second Strand Buffer* (Promega), 1µl de 10mM dNTP mix (Promega), 0.3 µl de 2

U/μl RNase H (Gibco), 0.5μl de 10U/μl DNA Ligase de *E. coli* (Invitrogen), 1.3 μl de 10 U/μl de Polimerase I de *E. coli* (Promega) e esta mistura foi incubada por 2 horas a 16°C. Por fim, adicionou-se 1 μl de 5 U/μl de T4 DNA Polimerase (Invitrogen), deixando por mais 10 minutos a 16°C.

14.1.3. Purificação do cDNA dupla-fita

A amostra foi transferida para um tubo novo, ao qual foi adicionado 102 μl de água DEPC e 152 μl de Fenol(pH8)/Clorofórmio/Álcool Isoamílico numa proporção de 25:24:1 e homogeneizada por inversão por aproximadamente 20 segundos. Esta foi centrifugada a 20.000g por 5 minutos a temperatura ambiente. A fase aquosa foi transferida a outro tubo contendo 152 μl de Clorofórmio/Álcool Isoamílico 24:1 e homogeneizado por inversão durante aproximadamente 20 segundos. Esta foi novamente centrifugada a 20.000g por 5 minutos a temperatura ambiente e a fase aquosa transferida a um tubo ao qual foi adicionado 1 μl de 5 mg/ml acrilamida (Ambion), 0.5 Volumes de 7.5M Acetato de Amônio e 2.5 Volumes de Etanol Gelado, misturados e mantidos a -80°C over-night. No dia seguinte, a amostra foi centrifugada a 20.000g por 30 minutos a 4°C. A solução foi desprezada por inversão do tubo e o pellet lavado 3 vezes com Etanol 75%. O pellet seco foi ressuscitado em 10 μl de água DEPC.

14.1.4. Transcrição *in vitro* (RiboMAX, Large Scale RNA production – Promega).

Para a transcrição *in vitro*, adicionou-se aos 10 μl de cDNA dupla-fita resultantes da etapa anterior, 7.5 μl de 25mM rNTP mix, 5 μl de 5X Reaction Buffer e 2.5 μl de Enzyme Mix (RNase inhibitor e T7 phage polymerase), e a mistura incubada em termociclador a 37 °C, por 6 horas.

14.1.5. Purificação do RNA amplificado

O RNA amplificado foi isolado utilizando TRIzol® (Invitrogen TM), conforme as instruções do fabricante, quantificado por espectrofotometria em NanoDrop® e avaliado qualitativamente

através de um gel de agarose 1% em TAE 1X. Todas as amostras foram alíquotadas (3 µg de RNA amplificado por alíquota) e estocadas a -80°C.

14.2. cDNA *Microarray*

Os experimentos de cDNA *microarray* consistem basicamente de duas etapas: bioquímica e computacional-estatística. A etapa bioquímica, consiste na fixação de cDNA em lâmina de vidro, extração e amplificação do RNA e hibridização. Esta etapa foi realizada em nosso laboratório, juntamente com o laboratório de Genômica Funcional do Instituto Ludwig de Pesquisas sobre o Câncer/Hospital A. C. Camargo, por Sarah Marques e Chamberlein Mendonça, sob a coordenação do Dr. Luiz Fernando Lima Reis. A etapa computacional-estatística, subsequente à etapa bioquímica, consiste na captação e quantificação das imagens, e normalização e análise dos dados. Esta etapa foi realizada em colaboração com o Laboratório de Biologia Computacional do Hospital A. C. Camargo, por César Torres e Luiz André Barreta sob coordenação da Dra Helena Brentani.

14.2.1. Plataforma de *Microarray* de cDNA do Instituto Ludwig de Pesquisas sobre o Câncer/Hospital A.C.Camargo (Chip 4.8K01)

O *array* utilizado neste estudo contém 4.800 seqüências ORESTES, cada uma representando um gene humano de função conhecida. As seqüências imobilizadas foram selecionadas seguindo os critérios numerados a seguir: (a) tamanho entre 300 e 800 bp; (b) ausência de seqüência repetitiva; (c) homologia com um único gene no genoma humano; (d) não mais do que 85% de homologia com nenhuma seqüência do genoma humano em qualquer seguimento de 100 pb que não seja do gene correspondente; (e) o mais 3' possível, mas sempre 5' em relação ao primeiro sítio de poliadenilação; e (f) 100% de homologia com genes humanos de função conhecida.

14.2.2. Marcação indireta para geração de alvos fluorescentes

Preparo do RNA amplificado

A fim de preparar o RNA amplificado para hibridização em lâmina de *Microarray*, adicionou-se a cada alíquota de RNA (3 µg), incluindo o RNA referência (RNA de PHK proveniente de cultura em monocamada amplificado), 1 µl de uma mistura de RNAs-controle transcritos *in vitro* (4.5 ng/ul Q do fago λ *landmark* na concentração, 3 ng/µl Clone de *B. subtilis* trp gene (ATCC, 87485), 1.5 ng/µl Clone de *B. subtilis* dapB gene (ATCC, 87485), 0.3 ng/µl Clone de *B. subtilis* thrB gene (ATCC, 87485), 0.15 ng/µl Clone de *B. subtilis* pheB gene (ATCC, 87485), 0.03 ng/µl Clone de *B. subtilis* lysA gene (ATCC, 87485)), 2 µl de 5 µg/µl Random Hexamers (Invitrogen) e água DEPC em quantidade suficiente para um volume final de 7.2 µl. Em seguida, esta mistura foi aquecida a 70°C por 10 minutos, deixada em gelo por 1 minuto e a temperatura ambiente por 5 minutos.

Síntese do cDNA marcado com amino allyl dUTP

A reação de síntese do cDNA marcado com amino allyl dUTP foi feita em um volume final de 30 µl, acrescentando-se 6 µl de 5X first Improm II strand buffer (Invitrogen), 7.2 µl de MgCl₂ (concentração final 6mM) (Promega), 2 µl dNTPs mix (Low T dNTP mix) (25 mM de dATP, dCTP, dGTP, 10mM de dTTP e 10mM Aminoallyl dUTP), 0.5 µl 40 U /ul Rnasin (Promega) e 1.5 ul Improm II reverse transcriptase (Promega). A mistura foi incubada a 42°C por duas horas e qualquer RNA restante foi degradado por adição de 15 µl 1M NaOH e 1 µl de 0.5M EDTA com incubação a 70°C por 10 minutos. O pH da amostra foi neutralizado por adição de 15 µl 1M HCl.

Purificação do cDNA e Acoplamento dos fluorocromos

O cDNA marcado foi purificado por precipitação com álcool, sendo à amostra adicionado seqüencialmente, 6 µl de 3M Acetato de Sódio (pH4.5), 1 µl de 20 µg/µl glicogênio e 150 µl de etanol gelado e incubados a -80°C por uma noite. No dia seguinte, os tubos foram centrifugados a 20.000g a 4°C por 30 minutos. O sobrenadante foi removido e o *pellet* lavado 2X com 1.5 ml de etanol 70% gelado. O *pellet* foi seco em *speed-vac* (SAVANT), ressuspenso em 4 µl de água

MiliQ + 1 µl do tampão *coupling buffer* fresco (Tampão Bicarbonato de sódio 0.5M pH 9,0) e incubado em termociclador a 37°C por 10 minutos.

Cada um dos AlexaDye (Invitrogen - Molecular Probes) foi ressuspenso em 5µl de DMSO e este foi adicionado ao cDNA. A amostra foi incubada por 2 horas à temperatura ambiente e em ambiente escuro. A reação foi purificada utilizando-se o kit QIAquick PCR purification (Qiagen).

Após a purificação, as duas populações de cDNAs marcados (amostra e referência) foram reunidas em um só tubo. Vale a pena ressaltar que, para cada amostra, foram hibridizadas duas lâminas. Em uma, a amostra foi marcada com *Alexa 555* e o RNA referência com *Alexa 647* (lâmina controle ou *MAIN*) e na outra a mesma amostra foi marcada com *Alexa647* e o RNA referência com *Alexa555* (lâmina *SWAP*). A utilização de um RNA referência comum possibilita a comparação horizontal entre as diferentes amostras hibridizadas.

14.3. Pré-hibridização das lâminas

Antes do uso, as lâminas de cDNA *microarray* foram incubadas em tampão de pré-hibridização (5X SSC; 0.2% SDS; 1% BSA, 5X solução Denhardt's) por 12Hs a 42°C. A seguir, as lâminas foram lavadas em água MiliQ nova e centrifugadas a 1.000 rpm por 4 minutos para secagem e montadas na estação de hibridização – *GeneTac Hybridization Station* (Genomic Solutions) (Bowtell e Sambrook, 2003).

14.4. Hibridizações em lâminas de *microarrays* de cDNA

As duas amostras purificadas de cDNA marcadas, com *Alexa 555* e *Alexa 647*, foram misturadas e secas em *speed-vac* até atingir um volume aproximado de 18.5 µl. A esta, foi adicionado 2 µl de 2 µg/µl poly A DNA (*Amersham Pharmacia Biotech*), 2 µl de 2 µg/µl Cot1 DNA (*Gibco/BRL*), 25 µl de SSC 20X, 0.5 µl de SDS 20%, 40µl de Formamida Deionizada, 10 µl de solução Denhardt's 50X e 2 µl de 5 µg/µl DNA de Esperma de Salmão (*Amersham*

Pharmacia Biotech). A amostra foi misturada com cuidado e incubada a 42°C, no escuro, até o momento de uso.

14.4.1. Estação de hibridização:

Somente depois de preparada a sonda, a lavagem das lâminas que já estavam pré-hibridizando foi iniciada. As lâminas foram montadas na estação de hibridização e aquecida a 70°C por 2 minutos. A mistura de cDNA foi aquecida a 95°C por 5 minutos e mantida aquecida a 70°C. Esta foi adicionada a câmara de hibridização e incubada a 42°C por 16 horas sob agitação. Após este período, o cassete de hibridização da estação de hibridização foi desmontado e a lâmina retirada foi imediatamente imersa em SSC 2X, 0.1%SDS. Em seguida, as lâminas foram submetidas a uma sessão de lavagens: 5 minutos em 2X SSC – 0.1%SDS, 5 minutos em SSC 0.1X - SDS 0.1% e finalmente, 5 minutos em SSC 0.1X. Estas finalmente foram centrifugadas a 1.000 rpm por 4 minutos para secagem e guardadas em local protegido de luz.

14.5. Captação das imagens

Os sinais de intensidade de fluorescência de cada *spot* foram captados através de um *scanner* a laser confocal *ScanArray Express* (PerkinElmer Life Sciences, laser power 100%, PMT60 (Alexa555) e PMT70 (Alexa647)). Cada lâmina gerou uma tabela de dados para cada canal correspondente aos corantes *Alexa 555* e *Alexa 647*. Para efeito de visualização, os sinais de intensidade foram convertidos em uma escala de cor representados por verde para o canal 1 e vermelho para o canal 2. A sobreposição destas imagens gera um sinal amarelo que representa intensidades semelhantes nos dois canais.

14.6. Quantificação das imagens

A quantificação dos sinais permite, a obtenção de valores numéricos utilizados para estimar a quantidade de RNA mensageiro (mRNA) de cada amostra analisada. Devido à diferença na eficiência de incorporação dos corantes *Alexa 555* e *Alexa 647* na reação de marcação, foram realizadas duas hibridizações independentes para cada amostra de RNA. Na primeira, a amostra

foi marcada com *Alexa 555* e o RNA referência com *Alexa 647* e na segunda ocorreu inversão dos corantes.

Os dados de cada *spot* de *microarray* contêm dois componentes numéricos conhecidos como sinal e *background*. O sinal corresponde aos valores de intensidade associados aos dados reais da hibridização, ou seja, são números que provém da informação quantitativa do cDNA hibridizado. Por sua vez, o *background* corresponde aos valores de intensidade associados a eventos bioquímicos espúrios, como por exemplo, artefatos ou reflexão de luz no comprimento de onda utilizado. Vale a pena ressaltar, que os cDNAs fixados nas lâminas são descritos como *sondas*, uma vez que suas sequências são conhecidas, ao passo que o cDNA marcado é denominado cDNA alvo (Southern *et al.*, 1999). A distinção entre sinal/*background* é um passo essencial para um bom experimento de *microarray*. Neste estudo, os valores de *background* foram calculados individualmente para cada *spot*, através da máscara que define cada *spot* (valor do sinal de cada *spot* subtraindo o valor de *background* correspondente). A seguir, todos os genes utilizados como controle foram removidos das listas, restando um conjunto de 4600 genes a serem analisados.

14.7. Normalização dos dados

A normalização é geralmente a segunda transformação, depois do Log^2 (), realizada nos dados provenientes de um experimento de *Microarray*. Nesta etapa é feito o ajuste das intensidades de cada hibridização individualmente ou não, para que comparações posteriores possam ser feitas.

A escolha de quais métodos de normalização devem ser usados em cada caso particular depende do modelo estatístico adotado. Todas as transformações dos dados têm a finalidade última de gerar melhores estimadores para quantidades de interesse, compensando efeitos

sistemáticos e devem ser justificadas pelo modelo. Naturalmente, também o modelo deve ser validado, na medida do possível, a partir dos dados experimentais.

A normalização pode ser feita de diferentes formas, dependendo das condições próprias de cada experimento. Neste estudo utilizou-se a normalização entre pares de lâmina, pois se empregou a técnica de inversão de corante.

14.8. Análise dos dados

Com o objetivo de identificar genes diferencialmente expressos entre as diferentes classes de amostras, os valores relativos normalizados de cada gene foram submetidos a uma análise de variância, utilizando-se o método de ANOVA (*analysis of variance*). Este método busca significância, verificando se o coeficiente de variância entre populações é maior que o coeficiente de variância dentro da população. Como todo teste paramétrico, a utilização deste pressupõe uma distribuição populacional gaussiana.

Para a identificação de genes diferencialmente expressos entre duas diferentes classes de amostras e a determinação do p-valor para a expressão de cada gene individualmente, em cada um dos diferentes grupos analisados pela ANOVA, os valores relativos normalizados de cada gene foram submetidos ao teste *t de Student* ($p < 0,05$). Para todos os genes diferencialmente expressos na ANOVA, que apresentaram no teste *t de Student* um $p < 0,05$, calculou-se o *FOLD*. Para isso, utilizou-se o valor médio dos valores de intensidade determinados para cada gene em 3 hibridizações independentes, considerando as lâminas *MAIN* e *SWAP* e foi calculada a razão entre elas, em cada uma das comparações 2 a 2.

14.8.1. Análise de enriquecimento de categorias de ontologia gênica (GO)

A busca por categorias enriquecidas de ontologia gênica (GO) entre os genes identificados como diferencialmente expressos nas análises de *Microarray* foi realizada utilizando o programa

disponível no site <http://bioinfo.vanderbilt.edu/gotm/>. As comparações foram sempre feitas em relação a uma lista mestra preestabelecida por nós. Como os resultados obtidos utilizando como lista mestra os genes presentes em nossa lâmina de cDNA *Microarray* e o genoma humano foram praticamente idênticos, optou-se por prosseguir apenas com a lista do genoma humano, por ser esta mais abrangente.

Os grupos que se mostraram enriquecidos por GO, foram submetidos à etapa seguinte da análise. Nesta, genes que apresentaram *FOLD* maior que 2 e menor do que -2 em diferentes comparações 2 a 2, foram identificados e tiveram sua relevância biológica analisada com base em dados descritos na literatura.

15. VALIDAÇÃO DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS

15.1. PCR em Tempo Real

15.1.1. Síntese de cDNA (RT)

A síntese de cDNA foi realizada a partir de 1 µg de cada um dos RNAs totais extraídos e previamente tratados com DNase. Nesta etapa, utilizou-se oligo d(T) e a enzima ImProm-II Reverse Transcriptase (Promega), conforme instruções do fabricante.

A fim de confirmar a eficiência da RT e verificar possíveis contaminações do cDNA sintetizado com DNA genômico, todas as amostras foram submetidos à reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Nesta, utilizou-se um par de iniciadores, que amplifica um gene humano constitutivo (BIRC-2), desenhado em éxons diferentes. Assim, a banda correspondente ao cDNA apresenta 323 pb, enquanto que aquela correspondente ao DNA genômico apresenta 523 pb.

Condição da Reação de PCR:

Para a PCR descrita acima, utilizaram-se reações com volume final igual a 25 µl, estando os reagentes presentes nas seguintes concentrações: Tampão 1X (CENBIOT), 1.5 mM MgCl₂ (CENBIOT), 0.1 mM dNTP, 0.32 µM Primer BIRC-2 forward, 0.32 µM Primer BIRC-2 reverse, 0.25 µl Taq Polimerase (CENBIOT), 50 ng cDNA e água Mili-Q em quantidade suficiente para atingir o volume final de 25 µl.

A ciclagem utilizada está descrita a seguir:

10 minutos à 95°C

(95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto) – 35 ciclos

10 minutos a 72°C

15.1.2. Análise de expressão gênica por PCR em Tempo Real

Inicialmente, as amostras de cDNA provenientes da transcrição reversa foram utilizadas em experimento de PCR em Tempo Real. As diferenças de expressão observadas nas análises por *Microarrays* de cDNA foram confirmadas por esta técnica.

Os pares de iniciadores foram desenhados com o auxílio do programa *Primer Express 3.0*, seguindo os seguintes parâmetros:

- o amplicon deve ter 1 ou mais introns, a fim de evitar amplificação de DNA genômico contaminante;
- o par de iniciadores deve ser específico, a fim de evitar amplificação de pseudogenes ou de genes relacionados;
- os amplicons devem ter entre 50 e 150 pares de bases;
- os iniciadores devem ser selecionados em regiões de 30 a 80% de conteúdo C/G;

- a temperatura de melting (T_m) deve estar entre 58 e 60°C;
- as últimas 5 bases da extremidade 3' não podem conter mais de duas bases C e/ou G;

Precedente às validações, foi necessário otimizar as condições para garantir eficiências comparáveis de amplificação. A concentração ideal dos pares de oligonucleotídeos iniciadores foi determinada realizando reações idênticas de amplificação, porém com quantidades crescentes desses, de 100nM-800 nM, através da identificação da situação na qual não ocorre a formação de dímeros e onde a amplificação é mais robusta. Outro fator importante atestado foi se as eficiências de amplificação dos transcritos alvos e do transcrito referência, em função da concentração de RNA utilizado, são aproximadamente iguais.

Padronização das Reações de PCR em Tempo Real e Cálculo da Eficiência de Amplificação

A fim de se mensurar a eficiência de amplificação de cada um dos pares de iniciadores, foram feitas reações utilizando diluições seriadas de cDNA (100 nM; 10 nM; 1 nM; 0.1 nM e 0.01 nM), em duplicatas. Para o cálculo da eficiência utilizou-se a fórmula: $\text{eficiência} = 10^{-1/\text{slope}}$, na qual o *slope* representa o grau de inclinação da regressão linear obtida a partir da curva padrão dos *Cycle Threshold* (Cts) destes 5 pontos. Estes valores de eficiência foram utilizados no cálculo da diferença de expressão entre os diferentes grupos de amostras utilizados. As reações foram realizadas no aparelho *ABI Prism® 7300 Sequence Detection System* (Applied Biosystems), em placas transparentes de 96 poços (Applied Biosystems), cobertas com adesivo transparente (Applied Biosystems). O volume final de cada reação foi de 20 μl , sendo 10 μl de *SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 5 μl de cDNA e 5 μl de iniciadores.

Após esta padronização foram feitas reações para cada um dos genes a serem avaliados. Estas foram feitas em triplicata, sendo apenas um controle negativo sem *template*. A concentração de

cDNA utilizada foi de 10 ng e a dos iniciadores igual a 400 nM, em todos os casos. Tanto as concentrações dos iniciadores, quanto a de cDNA a serem utilizados foram padronizadas considerando a utilização da menor concentração possível, que corresponde ao menor CT de amplificação. A ciclagem usada foi de 2 minutos a 50°C (ativação da enzima AmpErase), 10 minutos a 95°C (ativação da AmpliTaq Gold DNA Polymerase), seguidos de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e 1 minuto a 60°C (anelamento e extensão – etapa na qual ocorre a coleta da fluorescência emitida). Foi adicionada, ao final da reação, uma etapa extra de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C e 15 segundos a 95°C, para a análise da curva de dissociação das amostras. Essa análise serviu para confirmar a especificidade da amplificação (a especificidade também foi analisada através de géis de poliacrilamida 8% corados com prata).

Cálculo da Diferença de Expressão Gênica

A quantificação foi baseada na observação da abundância dos produtos no ciclo de PCR onde as reações estão em fase exponencial de amplificação. O acúmulo dos produtos de PCR nessa fase foi detectado em tempo real, através da ligação do *SYBR® Green*, que é uma molécula cuja emissão de fluorescência aumenta várias vezes quando ligada ao DNA dupla-fita. Através da definição arbitrária da região exponencial de amplificação, foram determinados os CTs de cada transcrito. O valor relativo da expressão foi dado pela diferença (ΔCT) entre o CT do gene alvo e o CT do gene de referência, GAPDH (um gene de expressão constitutiva, que normalmente não apresenta variação de expressão entre as amostras estudadas). Os resultados finais foram expressos como *FOLD*, aplicando a fórmula $2^{-\Delta CT}$ (Pfaffl, 2001). A significância estatística das diferenças de expressão observadas (p-values) foi determinada usando Student's t-test, assumindo uma distribuição bicaudal e um modelo de variância heterocedástico.

Para o cálculo da diferença de expressão gênica, foi utilizada a fórmula de (Pfaffl, 2001):

Ratio=(E gene alvo) Δ Ct Ref- Δ Ct amostra

(E gene normalizador) Δ Ct Ref- Δ Ct amostra

Ratio = Diferença de expressão entre a amostra e a referência (*fold*)

E = Valor da Eficiência de amplificação

Gene alvo = cada um dos genes a serem normalizados

Gene normalizador = α -Tubulina

Referência = cDNA proveniente de amostra transfectada com o vetor pLXSN vazio

Δ CT = CT Ref - CT amostra

CT = Média dos CT

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS ONCOGENES E6 E E7 DE HPV 16 EM PHK

Para expressão das oncoproteínas virais E6 e E7 selvagens e mutantes em PHKs, cada um dos genes foi clonado em um vetor retroviral. Esta estratégia permite a transdução eficiente dos mesmos em células que não são facilmente transfectadas, como por exemplo, células primárias. Além disso, através da integração do provírus ao genoma da célula hospedeira é possível que os genes introduzidos sejam expressos de maneira permanente. Entretanto, ao contrário da transfecção, a infecção retroviral é dependente do reconhecimento de receptores na superfície celular. Alguns destes receptores, tais como os ecotrópicos e os anfotrópicos, são expressos em inúmeros tipos celulares, incluindo a maioria das células primárias de camundongos e humanos (Current Protocols in Molecular Biology, 1996). Deste modo, para que os retrovírus sejam capazes de infectar PHKs é necessária à produção de partículas virais capazes de reconhecer os receptores anfotrópicos presentes nestas células.

Os vetores retrovirais que expressam os genes E6 ou E7 de HPV16, selvagem e mutantes, além do vetor pLXSN vazio, foram transfectados na linhagem ecotrópica Bosc-23. As partículas retrovirais produzidas por estas células foram utilizadas para infectar a linhagem anfotrópica Am-12. O sobrenadante das células Am-12 selecionadas foi utilizado para infectar os PHKs cultivados em monocamada e posteriormente utilizados no estabelecimento de culturas organotípicas.

A fim de testar a eficiência da infecção dos PHKs e a expressão dos genes de interesse, foram obtidas amostras de RNA e proteína das diferentes culturas. Inicialmente foram analisadas as amostras derivadas de cultura em monocamada, e só depois de confirmada a eficiência destas infecções, os *rafts* foram estabelecidos. A integridade do RNA extraído foi observada mediante eletroforese em gel de agarose (figura 9) e a expressão dos genes de interesse através de hibridização por *Northern Blot* com sondas específicas para o RNAm de E6 ou E7 selvagem de HPV16. A expressão destes genes correspondeu ao esperado nos dois tipos de cultura, ou seja, foi positiva para E6 apenas nas amostras de PHKs transduzidos com o gene E6 selvagem ou mutantes, para E7 apenas naquelas transduzidas com o gene E7 selvagem ou mutantes, e negativo para E6 e E7 nas amostras correspondentes aos PHKs normais ou transduzidos com vetor pLXSN vazio (figura 10 e figura 11).

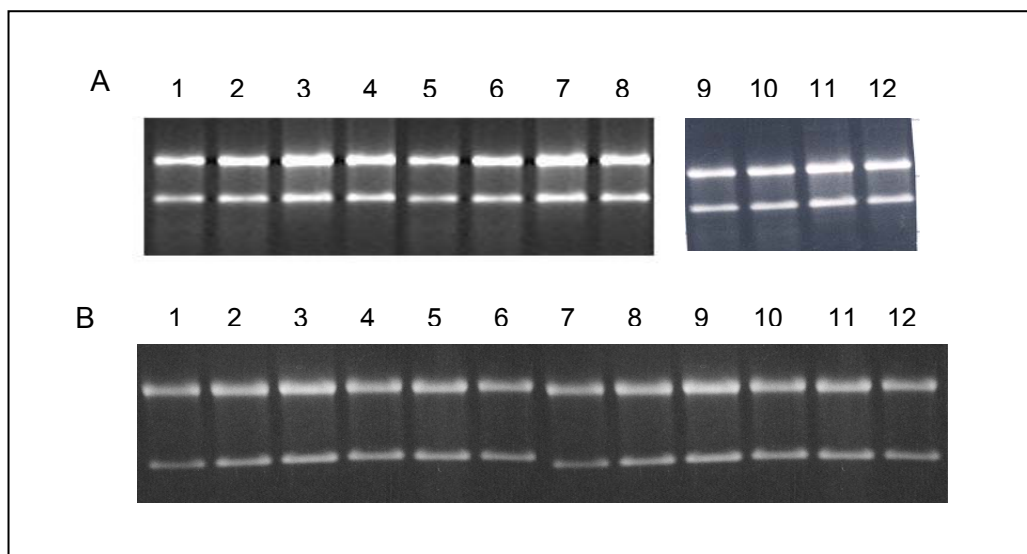


figura 9: Avaliação qualitativa em gel de agarose 1% dos RNAs extraídos de culturas em monocamada (A) e *raft* (B), a partir de amostras de PHK normal (1), transfectado com vetor pLXSN vazio (3), transfectado com o vetor contendo os genes E7 selvagem (5) ou seu mutante E7 E26G (7) e E6 selvagem (9) ou seu mutante Δ 9-13 (11). As colunas 2, 4, 6, 8, 10 e 12 correspondem as amostras 1, 3, 5, 7, 9 e 11 respectivamente, tratadas com 2nM de TNF.

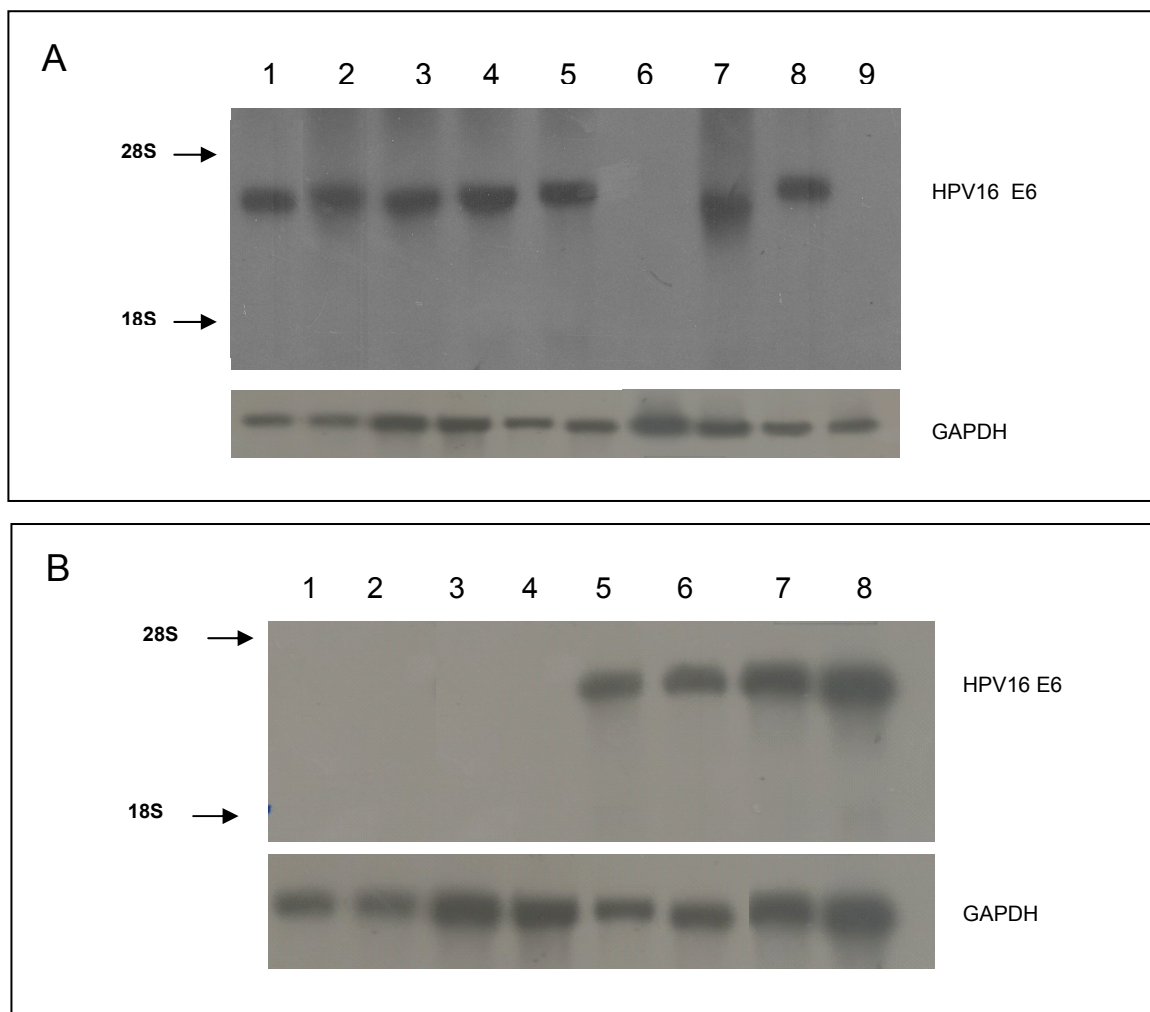


figura 10: Análise por Northern Blot utilizando sonda contra o transcrito do gene E6 de HPV16, para amostras de RNA provenientes de cultura em monocamada (A) e raft (B), a partir de amostras de E6 Δ 9-13 (1), E6 151 8S/9A/10T (2), E6 45Y/47Y/49H (3), E6 Δ 78-82 (4), E6 Δ 118-122 (5), pLXSNI (6), E6 Δ 123-127 (7), E6 wt (8) e PHK normal (9 – apenas em A). A hibridização com sonda de GAPDH foi utilizada como normalizador.

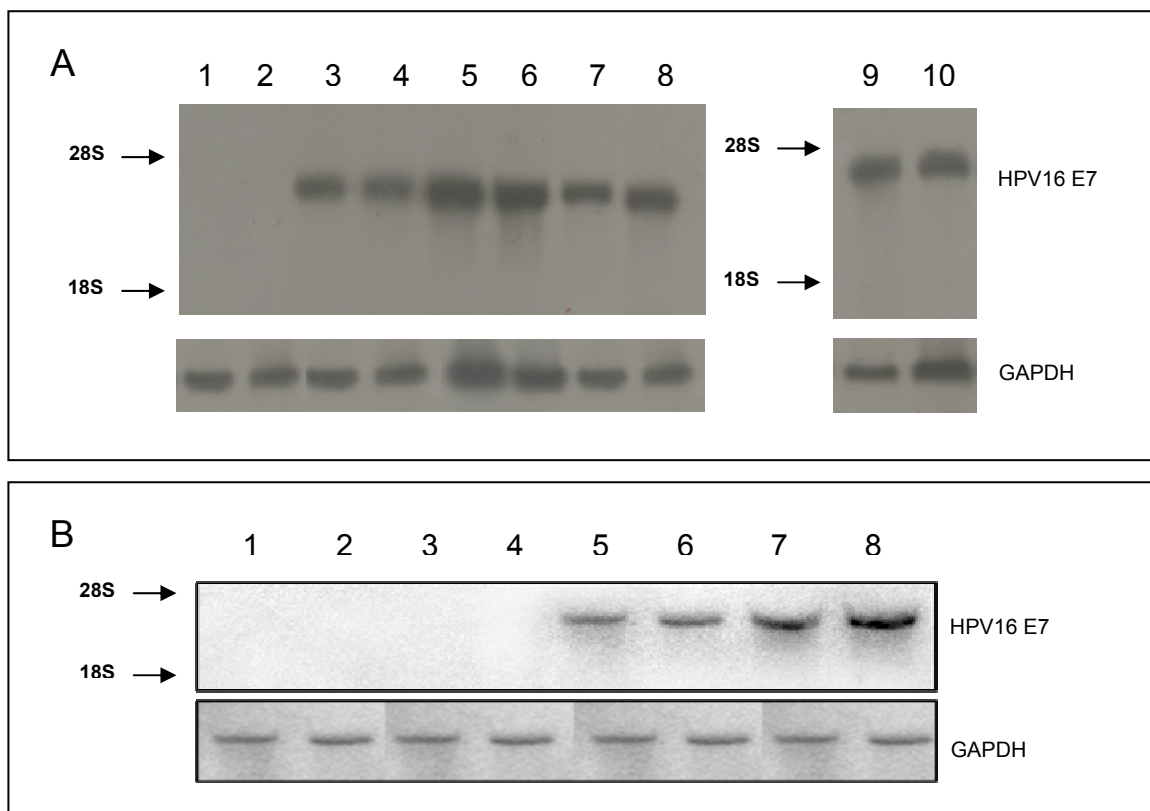


figura 11: Análise por Northern Blot utilizando sonda contra o transcrito do gene E7 de HPV16, para amostras de RNA provenientes de de cultura em monocamada (A), a partir de amostras de pLXSN (1), PHK (2), E7wt (3), E7 H2P (4), E7 Δ 6-10 (5), E7 D21S (6), E7 Δ 21-24 (7), E7 E26G (8), E7 CVQ68-70AAA (9), E7 Δ 79-83 (10) e raft (B), a partir de amostras de pLXSN (1), pLXSN TNF (2); PHK (3), PHK TNF (4); E7wt (5); E7wt TNF (6); E7 E26G (7); E7 E26G TNF (8). A hibridização com sonda de GAPDH foi utilizada como normalizador da quantidade de RNA aplicada no gel.

Outra maneira de verificar a eficiência desta infecção é através da análise de níveis protéicos por *Western Blot*. Por não haver um anticorpo anti-E6 de HPV16 que funcione adequadamente, a presença desta proteína foi determinada indiretamente utilizando um anticorpo anti-p53 em amostras provenientes de *rafts*. A proteína E6 é capaz de unir-se à proteína supressora de tumor p53, alterando sua capacidade funcional e promovendo sua degradação pela via de proteólise dependente de ubiquitina (Scheffner *et al.*, 1990; Crook *et al.*, 1991; Lechner *et al.*, 1992; Kesis *et al.*, 1993), enquanto que alguns mutantes, como por exemplo E6 Δ 9-13, são incapazes de se ligar ou estimular a degradação desta proteína em níveis detectáveis (Foster *et al.*, 1994). No caso de amostras que expressam a proteína selvagem, tratadas ou não com TNF, os níveis detectáveis da proteína p53 foram muito baixos. Por outro lado, amostras de PHKs

normais, e aquelas que expressam a proteína E6 mutante (16E6 Δ 9-13), ou que foram transduzidas com vetor pLXSN vazio, apresentam níveis normais desta proteína (figura 12).

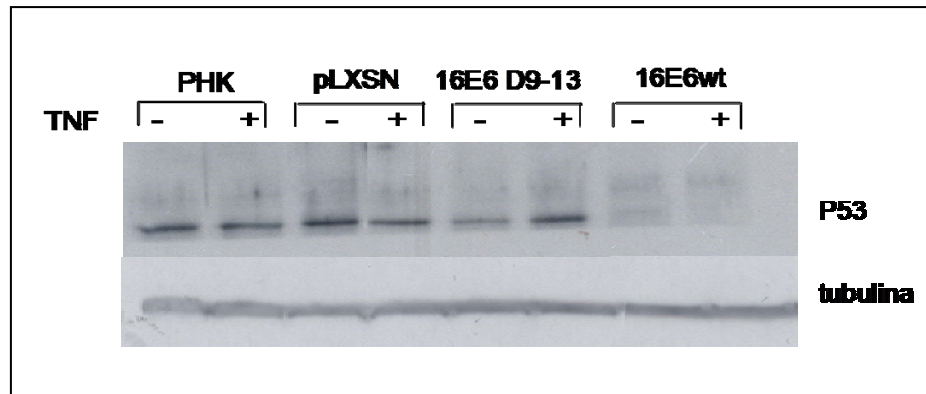


figura 12: Determinação dos níveis da proteína p53 em culturas organotípicas de PHKs normais transduzidos com o vetor retroviral vazio ou portadores do gene E6 de HPV 16 (normal e mutante) antes e após tratamento com TNF. Os níveis desta proteína foram determinados por *western blot* utilizando extratos protéicos totais obtidos a partir das culturas. Visando confirmar a aplicação de quantidades equivalentes de extrato protéico de cada amostra foi utilizado um anticorpo anti-tubulina α .

A expressão da proteína E7 de HPV16 pôde ser observada de forma direta, através da utilização de um anticorpo anti-E7 em ensaio de WB. Tanto a amostra contendo o gene selvagem quanto o mutante E7 E26G apresentaram expressão da proteína E7 em níveis comparáveis, enquanto que em PHKs normais e naqueles transduzidos com o vetor pLXSN vazio, a expressão desta proteína não foi detectada (figura 13). Este resultado está de acordo com o observado por *Northern Blot* (figura 11). Para comprovar a funcionalidade da expressão do gene E7 foram também analisados por *Western Blot*, os níveis da proteína pRb (figura 14). Este tipo de inferência foi baseada no fato da proteína E7 ser capaz de ligar-se e inativar a proteína do retinoblastoma (pRb), induzindo sua degradação (Helt e Galloway, 2003), enquanto que alguns mutantes, como por exemplo E7 E26G, são incapaz de se ligar ou estimular a degradação desta proteína (Demers *et al.*, 1996; Helt e Galloway, 2001). Assim, nas amostras de PHKs transduzidas com o gene E7 selvagem, tratado ou não com TNF, a expressão da proteína pRb foi menor do que o nível de detecção deste ensaio, enquanto que em amostras que

expressam o mutante E7 E26G e nas amostras provenientes de PHKs normais ou transduzidas com o vetor pLXSN vazio, tratados ou não com TNF, observa-se a expressão de pRb, como esperado.

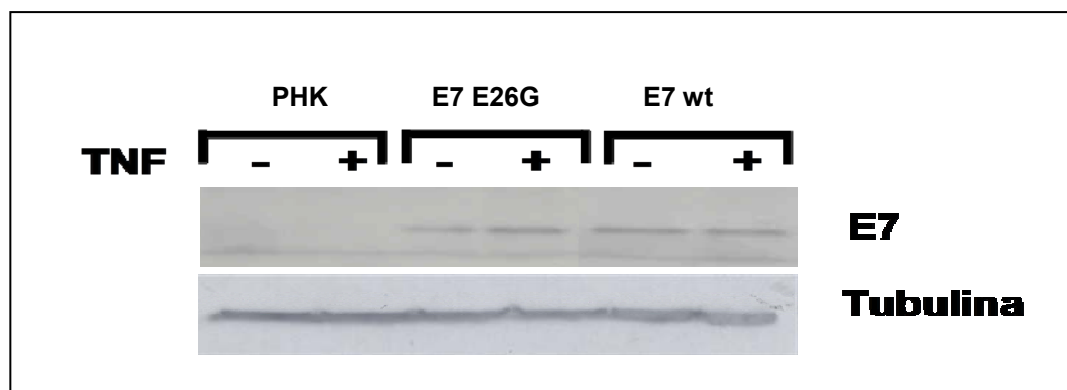


figura 13: Determinação dos níveis da proteína E7 em extratos proteicos totais de culturas organotípicas de queratinócitos transduzidos com o vetor retroviral vazio ou portadores do gene E7 de HPV 16 (normal e mutante) antes e após tratamento com TNF. Os níveis desta proteína foram determinados por *western blot*. Visando confirmar a aplicação de quantidades equivalentes de extrato protéico de cada amostra foi utilizado um anticorpo anti-tubulina α .

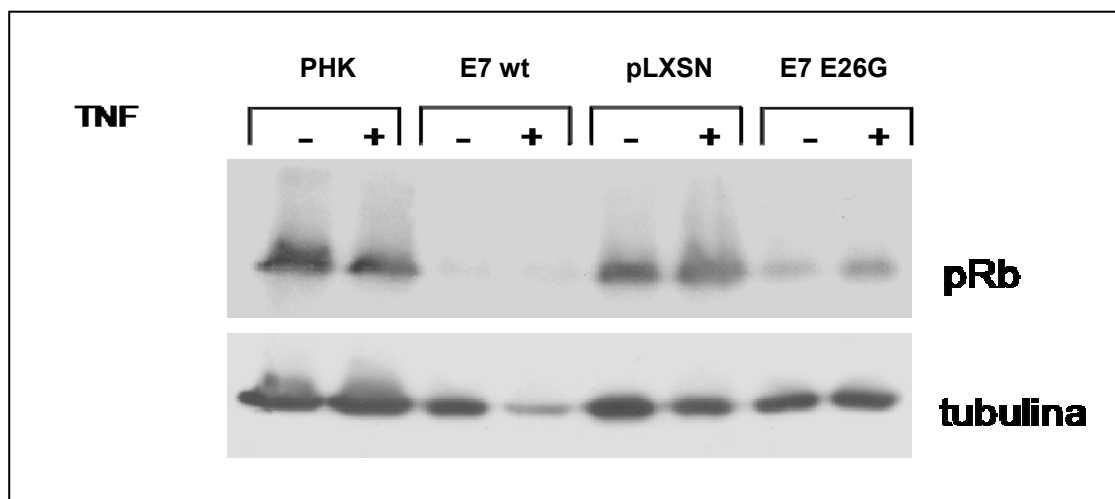


figura 14: Determinação dos níveis da proteína pRb em extratos proteicos totais de culturas organotípicas de PHKs normais transduzidos com o vetor retroviral vazio ou portadores do gene E7 de HPV 16 (normal e mutante) antes e após tratamento com TNF. Os níveis desta proteína foram determinados por *western blot*. Visando confirmar a aplicação de quantidades equivalentes de extrato protéico de cada amostra foi utilizado um anticorpo anti-tubulina α .

Uma outra maneira de avaliar a expressão destas proteínas em *raft* é através de ensaio de imunohistoquímica. Para isso, cortes histológicos destas culturas foram submetidos à reação

utilizando anticorpos anti-p53 (figura 15) e anti-pRb (figura 16), para análise indireta da expressão das proteínas E6 e E7, respectivamente. Conforme esperado, a presença da proteína E6 foi detectada nos núcleos das células presentes em todas as camadas das culturas organotípicas geradas a partir de PHKs normais, nos transduzidos com vetor pLXSN vazio e nos que expressam a proteína E6 mutante. No entanto, nas culturas que expressam a proteína E6 selvagem observamos uma clara diminuição nos níveis da proteína p53.

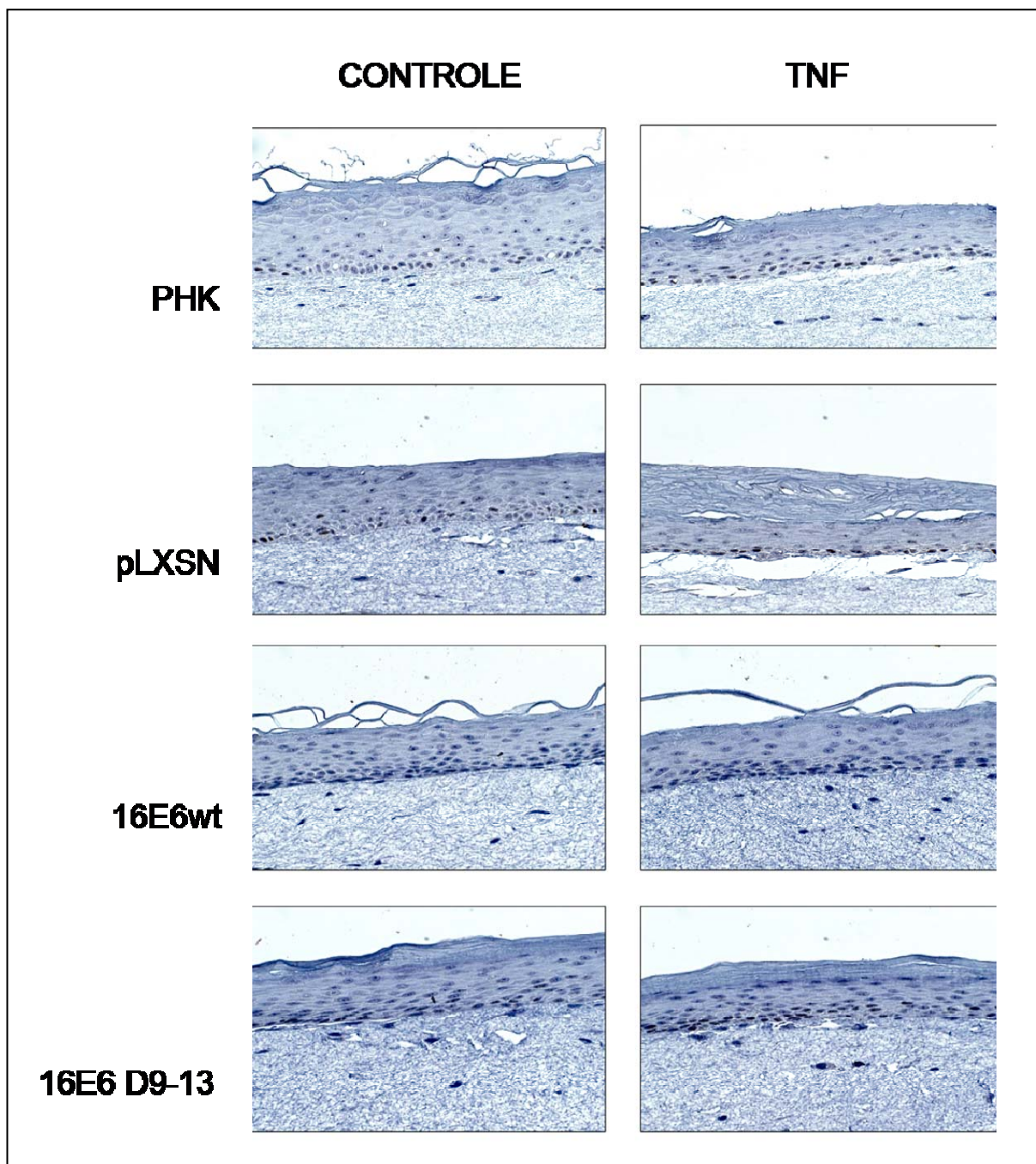


figura 15: Determinação por Imunohistoquímica dos níveis da proteína p53 em culturas organotípicas de PHK normais e transduzidos com vetores retrovirais que expressam o gene E6wt de HPV16 ou com o mutante E6 Δ 9-13 incapaz de ligar p53 e/ou induzir a sua degradação.

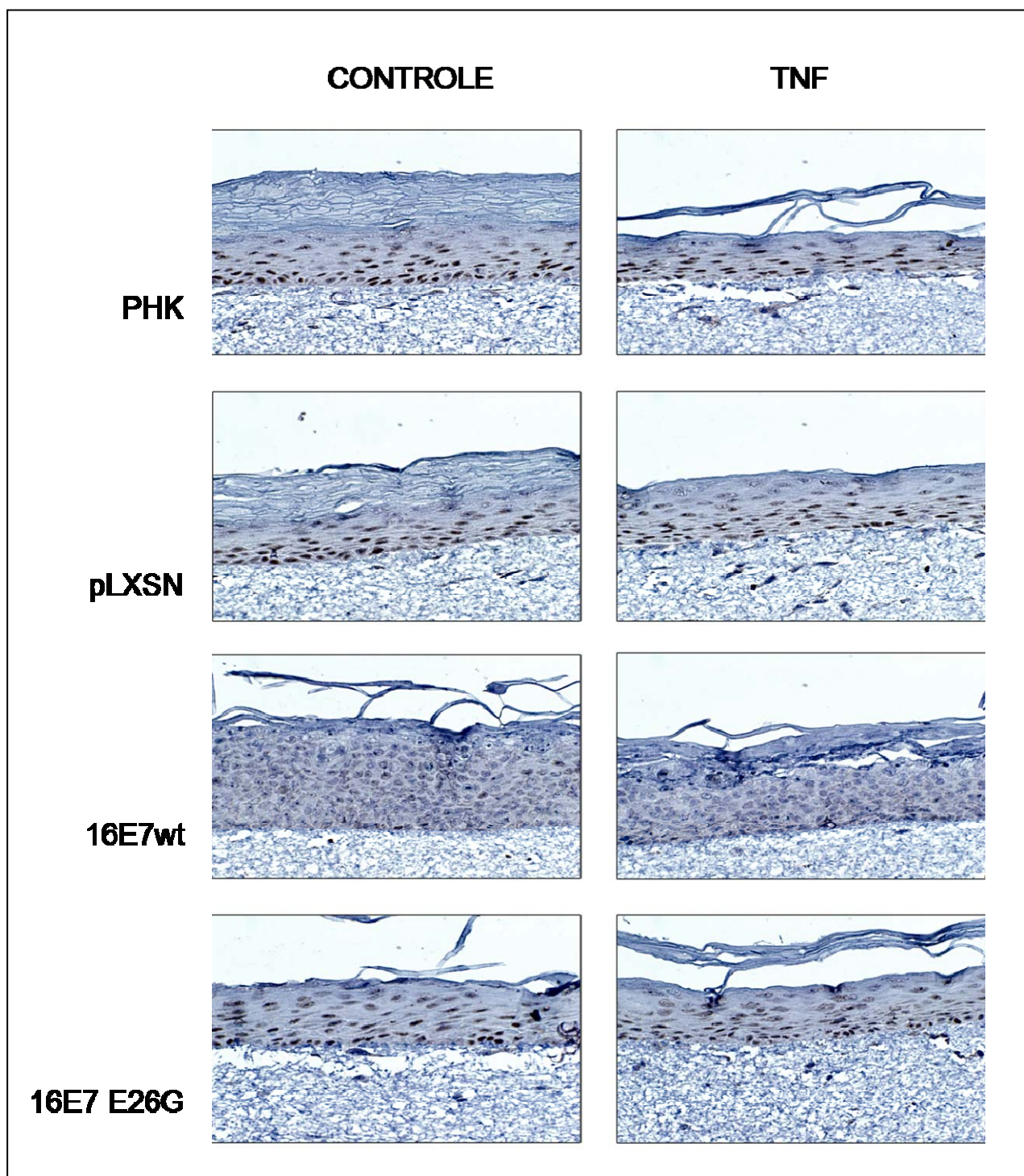


figura 16: Determinação por imunohistoquímica dos níveis da proteína pRb em culturas organotípicas de PHK normais e transduzidos com E7wt de HPV16 ou com o mutante E7 E26G incapaz de ligar pRb e/ou induzir a sua degradação.

Levando em consideração todas estas observações, concluiu-se que a expressão dos genes E6 ou E7, selvagens e mutantes, ocorreu de forma adequada tanto em culturas em monocamada, quanto nos rafts, confirmando a eficiência do processo de infecção dos PHKs.

2. MEDIDA DA PROLIFERAÇÃO CELULAR EM CULTURAS EM MONOCAMADA E RAFTS

O TNF é um dos principais mediadores dos processos inflamatórios e imunes da epiderme humana. Em condições normais, a produção do TNF neste tipo de epitélio é muito baixa, ao passo que, após injúria celular, infecções ou irradiação, os queratinócitos, principais células da epiderme, liberam quantidades significativas desta citocina. Após a ligação do TNF aos seus receptores, ocorre uma série de eventos intracelulares que culminam na ativação de fatores de transcrição, incluindo NF κ B, AP-1, CCAAT *enhancer-binding protein* β , entre outros. A indução destes fatores está associada a diversos processos biológicos, dentre os quais, proliferação e morte celular, resposta imune/inflamatória e oncogênese (Komine *et al.*, 2000; Groner, 2002; Revisado por Sethi *et al.*, 2008). A amplitude destes efeitos na epiderme ainda é desconhecida. Uma série de proteínas que tem sua expressão regulada por NF κ B participa na ativação da resposta imune e inflamatória. Entre estas proteínas podemos destacar as citocinas e quimiocinas, receptores necessários para adesão e migração de neutrófilos, receptores de MHC-I e proteínas envolvidas na apresentação de antígenos. Por esta razão, NF κ B foi inicialmente caracterizado como o regulador central da resposta imune inata e adquirida. Além disso, a ativação deste fator está diretamente associada à parada do ciclo celular e apoptose (através da ativação de caspases, p53, p21, por exemplo), em diversos tipos celulares (Pahl, 1999).

O fator de transcrição NF κ B encontra-se normalmente localizado no citoplasma das células não estimuladas e necessita de sua translocação nuclear para que ocorra a ativação dos genes alvo. A localização celular de NF κ B é controlada por uma família de proteínas inibitórias denominada I κ B, cuja principal função é sua ligação com NF κ B, prevenindo sua translocação para o núcleo. A exposição das células ao TNF implica na rápida fosforilação, ubiquitinação e degradação de I κ B, através do sistema de proteólise dependente de ubiquitina. A subunidade múltipla I κ B-quinase (IKK) é a principal responsável pela fosforilação I κ B, o principal ponto de convergência para a maioria dos estímulos que desencadeiam a ativação de NF κ B (Karin e Ben-Neriah, 2000) (figura 3).

Diversos trabalhos indicam que NF- κ B é uma das principais proteínas ativadas pelo TNF nos queratinócitos da epiderme e que sua principal função está associada à regulação negativa da proliferação destas células, sendo um fator importante para a diferenciação celular e manutenção da homeostase tecidual (Seitz *et al.*, 1998; Chaturvedi *et al.*, 1999; Van Hogerlinden *et al.*, 1999; Komine *et al.*, 2000; Seitz *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2001). O bloqueio da atividade de NF κ B na epiderme produz hiperplasia enquanto que a sua superexpressão resulta em hipoplasia (Seitz *et al.*, 1998). Por outro lado, a ativação constitutiva de NF κ B tem sido discutida exaustivamente na literatura em diversos tipos de neoplasias, como por exemplo, tumores de mama (Sovak, Bellas *et al.* 1997), pâncreas (Wang *et al.*, 1999), fígado, estômago (Sasaki *et al.*, 2001) e cabeça e pescoço (Chang e Van Waes, 2005).

A interferência de diversos vírus humanos na ativação de NF κ B tem sido mostrada por alguns estudos. Dentre os principais exemplos pode-se citar: HIV-1, HTLV-1, vírus influenza, hepatite B e C, herpesvírus, adenovírus e HPV (Santoro *et al.*, 2003). Sabe-se que o TNF é capaz de

regular negativamente a proliferação de PHKs normais e imortalizados por HPV 16 (Villa *et al.*, 1992; Vieira *et al.*, 1996). Por outro lado, PHKs imortalizados por HPV18, ou linhagens derivadas de tumores da cérvix uterina e que apresentam HPV16 ou 18 são resistentes ao efeito antiproliferativo desta citocina (Vieira *et al.*, 1996; Bornstein *et al.*, 1997).

Além disso, o efeito individual das oncoproteínas de HPV de alto risco na resposta ao TNF tem sido abordado em diversos estudos. Dessa maneira, foi observado que E6 de HPV16 é capaz de induzir resistência ao TNF. Esta oncoproteína é capaz de se ligar ao receptor 1 de TNF (TNFR1), além de proteger fibroblastos de camundongo, células de osteosarcoma humano e histiócitos/monócitos humanos da apoptose mediada por TNF (Filippova *et al.*, 2002). Mais ainda, a proteína E7 de HPV 16 é capaz de conferir resistência ao efeito antiproliferativo do TNF em queratinócitos (Basile *et al.*, 2001) e de inibir a apoptose associada à esta citocina em fibroblastos (Thompson *et al.*, 2001). Diversos estudos têm mostrado que a síntese de DNA nas camadas de queratinócitos diferenciados é induzida pelo gene E7 de HPV 16 ou 18 (Cheng *et al.*, 1995a; Jones *et al.*, 1997a; Ruesch e Laimins, 1997; Flores *et al.*, 2000). Além disso, foi descrita a associação da proteína E7 ao complexo quinase IKK, diminuindo desta forma, a ativação de NF κ B, ao passo que a oncoproteína E6 reduz a atividade transcricional de p65 no núcleo. Interessantemente, observou-se que a atividade de NF κ B não foi totalmente abolida pela expressão de E6/E7, evento provavelmente associado à necessidade de proliferação celular nas células infectadas pelo vírus (Spitkovsky *et al.*, 2002). Também foi observado que culturas organotípicas derivadas de queratinócitos transduzidos com retrovírus que expressam E6/E7 ou E7 de HPV 18 também apresentaram síntese de DNA nas camadas suprabasais do tecido epitelial. Nestes casos, a síntese foi parcialmente inibida pelo tratamento com TNF, indicando que E7 de HPV18 é suficiente para conferir resistência à esta citocina, fato não observado em queratinócitos normais (Boccardo *et al.*, 2004).

Em 1998, Li e colaboradores apresentaram indicativos de que a ativação de AP-1 e/ou NF- κ B contribuem para a progressão neoplásica em queratinócitos humanos imortalizados por HPV (Li *et al.*, 1998). A expressão das oncoproteínas E6 e E7 de HPV16 em queratinócitos cervicais induz a expressão de diversos genes responsivos ao fator NF κ B associados à proliferação celular, identificados através de cDNA-*microarray* (Nees *et al.*, 2001). Um aumento da atividade de NF κ B também foi observado em papilomas laríngeos induzidos pela infecção por HPV 6 ou 11 (Vancurova *et al.*, 2002). O aumento dos níveis de estresse oxidativo, resultante da ativação exacerbada de NF κ B, foi observado em cânceres cervicais mais agressivos com baixo nível apoptótico (Hockel *et al.*, 1999). Um outro estudo descreve a ativação constitutiva de NF κ B na progressão de lesões intraepiteliais de alto grau a carcinomas epidermóides da cervice uterina (Nair *et al.*, 2003).

Estudos anteriores do nosso laboratório mostraram que níveis nucleares diferentes do fator NF κ B são observados quando comparados queratinócitos normais, imortalizados ou transformados com HPV (Termini *et al.*, 2008). Após tratamento com TNF, as células normais e as imortalizadas por HPV16, apresentaram níveis altos de NF κ B nuclear. Contrariamente, este efeito não foi observado em células imortalizadas com HPV18 ou derivadas de tumor. Estes dados indicam a presença de uma alteração na via de ativação do NF κ B nas linhagens resistentes ao TNF e sugerem que alterações na via de sinalização desta citocina poderiam ser eventos comuns no mecanismo de carcinogênese mediada por HPV.

2.1. Medida de incorporação de [metil-³H] timidina (cultura em monocamada)

A fim de avaliar o efeito do TNF na proliferação dos PHKs normais e naqueles transduzidos com vetores retrovirais que expressam os genes E6 ou E7 (selvagens ou mutantes) de HPV16, cultivados em monocamada, foram realizados experimentos de incorporação de [metil-³H] timidina. Estas células foram cultivadas até atingirem uma confluência de 45-50% e, então, tratadas com 2 nM de TNF por 60 horas, sendo que as últimas 12 horas foram na presença de 1C μ i/ml do nucleotídeo marcado.

Os resultados obtidos são apresentados na figura 17. Observa-se uma acentuada redução na incorporação de [metil-³H] timidina em culturas de PHKs normais e naqueles que expressam o gene E6 selvagem e mutantes, capazes e incapazes de degradar a proteína p53, quando tratadas com TNF. Estes resultados indicam que PHKs que expressam a proteína E6 são sensíveis aos efeitos antiproliferativos desta citocina, assim como os normais.

Por outro lado observa-se a existência de uma diferença na resposta ao efeito antiproliferativo do TNF entre os PHKs normais e os que expressam o gene E7, sendo os PHKs transduzidos com vetores retrovirais portadores deste gene selvagem ou de mutantes capazes de induzir a degradação da proteína pRb (E7 21S, E7 CVQ68-70, E7 D79-83) são resistentes ao efeito desta citocina (figura 18). Por outro lado, os PHKs normais ou que expressam mutantes incapazes de degradar pRb (E7 2Pro, E7 D6-10, E7 D21-24 e E7 E26G) mostraram-se sensíveis aos efeitos do TNF. Assim, infere-se que a capacidade da proteína E7 de induzir resistência ao TNF está associada à sua capacidade de induzir a degradação de pRb.

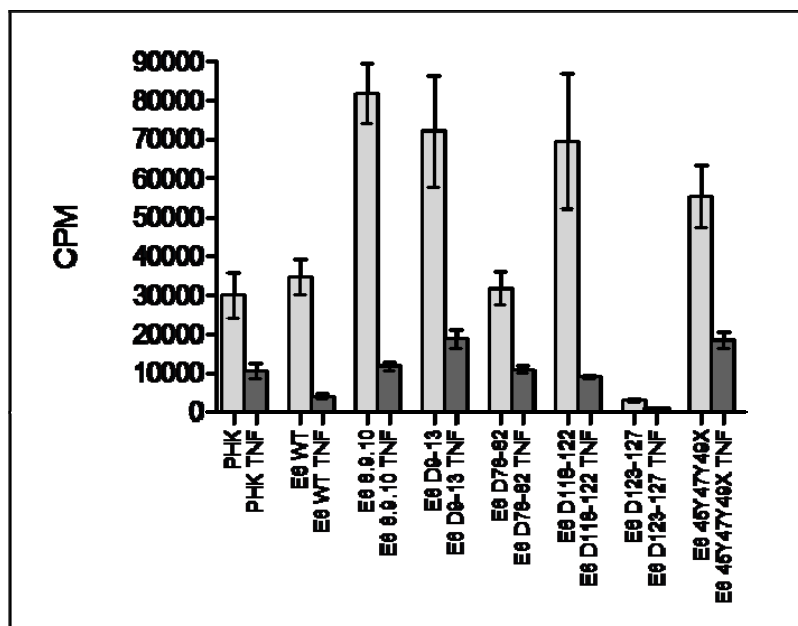


figura 17: Efeito do TNF na proliferação de PHK normais ou transduzidos com vetores retrovirais que codificam o gene E6 de HPV16 selvagem e vários mutantes. A incorporação de [metil-3H] timidina em culturas em monocamada foi avaliada após tratamento com 2 nM de TNF por 60 horas. Os dados apresentados correspondem a dois experimentos independentes feitos em triplicata.

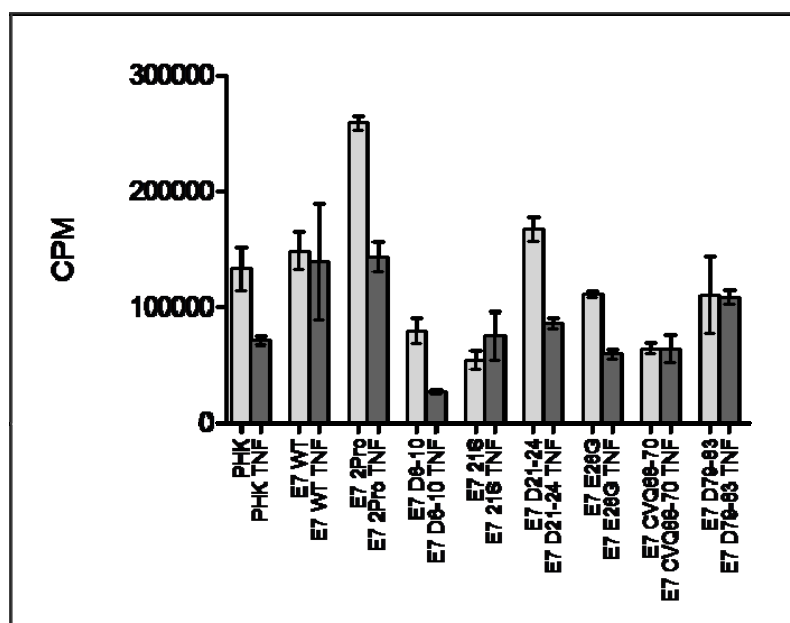


figura 18: Efeito do TNF na proliferação de PHK normais ou transduzidos com vetores retrovirais que codificam o gene E7 de HPV16 selvagem e vários mutantes. A incorporação de [metil-3H] timidina em culturas em monocamada foi avaliada após tratamento com 2 nM de TNF por 60 horas. Os dados apresentados correspondem a dois experimentos independentes feitos em triplicata.

2.2. Medida de incorporação de BrdU (*raft*)

Assim como feito para os PHKs cultivados em monocamada, o efeito do TNF na proliferação celular também foi analisado em *rafts*. Isto foi realizado mediante a análise da incorporação de 5-bromodesoxiuridina (BrdU) nos núcleos de PHKs normais ou transduzidos com o vetor pLXSN vazio ou que expressam os oncogenes virais E6 ou E7 (selvagens e mutantes). Neste caso, utilizou-se apenas um mutante de cada proteína, sendo o mutante da oncoproteína E6 (16E6 Δ 9-13), incapaz de degradar a proteína p53 e o de E7 (16E7 E26G), incapaz de degradar a proteína pRb (figura 19).

A análise quantitativa da proliferação celular foi realizada através da contagem de núcleos marcados sobre núcleos totais. Através desta contagem foi possível estabelecer uma taxa de inibição de proliferação conferida pelo tratamento com TNF. Os resultados representam a contagem dos núcleos de 2 experimentos independentes. Para cada experimento foram contados no mínimo 2.500 núcleos. Através desta avaliação foi possível identificar que PHKs normais, infectados com o vetor vazio ou com os genes E6 e E7 mutantes apresentam uma diminuição no número de núcleos marcados, após o tratamento com TNF, indicando que esta citocina promove uma inibição de proliferação destes *rafts* (figura 20).

A expressão da oncoproteína E7 está relacionada a um aumento dos níveis de proliferação celular. De fato, de acordo com a marcação nuclear observada é possível evidenciar que a proteína viral E7 é capaz de induzir proliferação em todas as camadas do epitélio. O tratamento com TNF não promoveu parada de proliferação nestes *rafts*. No entanto, naqueles provenientes de PHKs transduzidos com o gene E7 mutado, E7 E26G, o perfil de proliferação foi mais parecido com culturas geradas a partir de PHKs normais do que daquelas que expressam a oncoproteína E7 selvagem (figura 20).

Em resumo, observa-se que o tratamento com TNF diminuiu a síntese de DNA em PHKs normais, naqueles transfectados com o vetor pLXSN vazio ou com os genes E6 ou E7 mutantes. No entanto, os PHKs transfectados com os oncogenes E6 ou E7 selvagens, não tiveram a síntese de DNA diminuída após o tratamento com TNF.

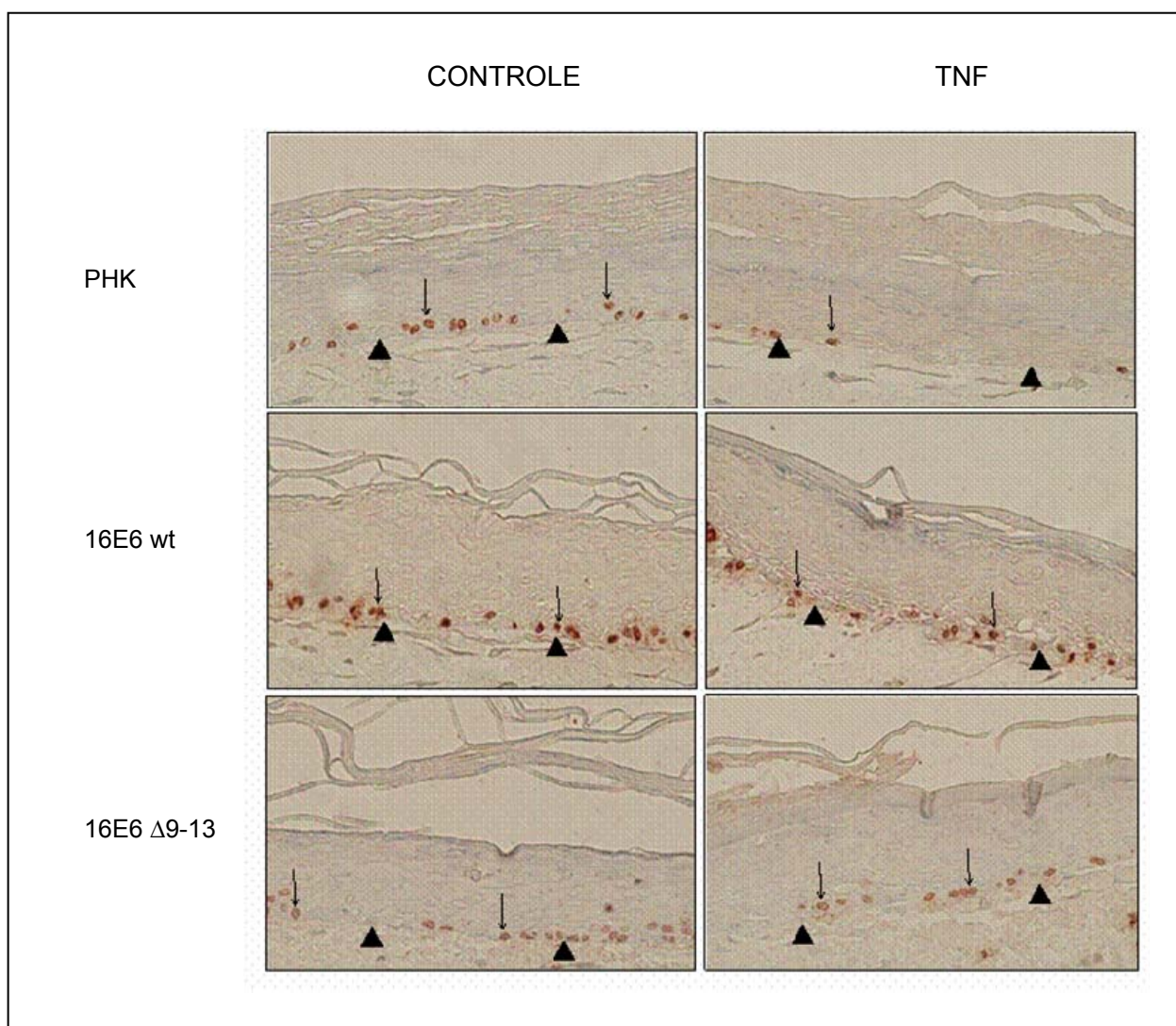


figura 19: Efeitos do TNF na proliferação celular em culturas organotípicas de PHKs normais e transduzidos com vetores retrovirais que expressam o gene E6wt de HPV16 ou o mutante E6 Δ 9-13 incapaz de ligar p53 e/ou induzir a sua degradação. As culturas foram tratadas por 72 horas com 2 nM de TNF sendo que as últimas 12 horas de cultura foram realizadas na presença de BrdU. As setas indicam células que incorporaram BrdU, detectadas por imunohistoquímica. As pontas de setas indicam a membrana basal.

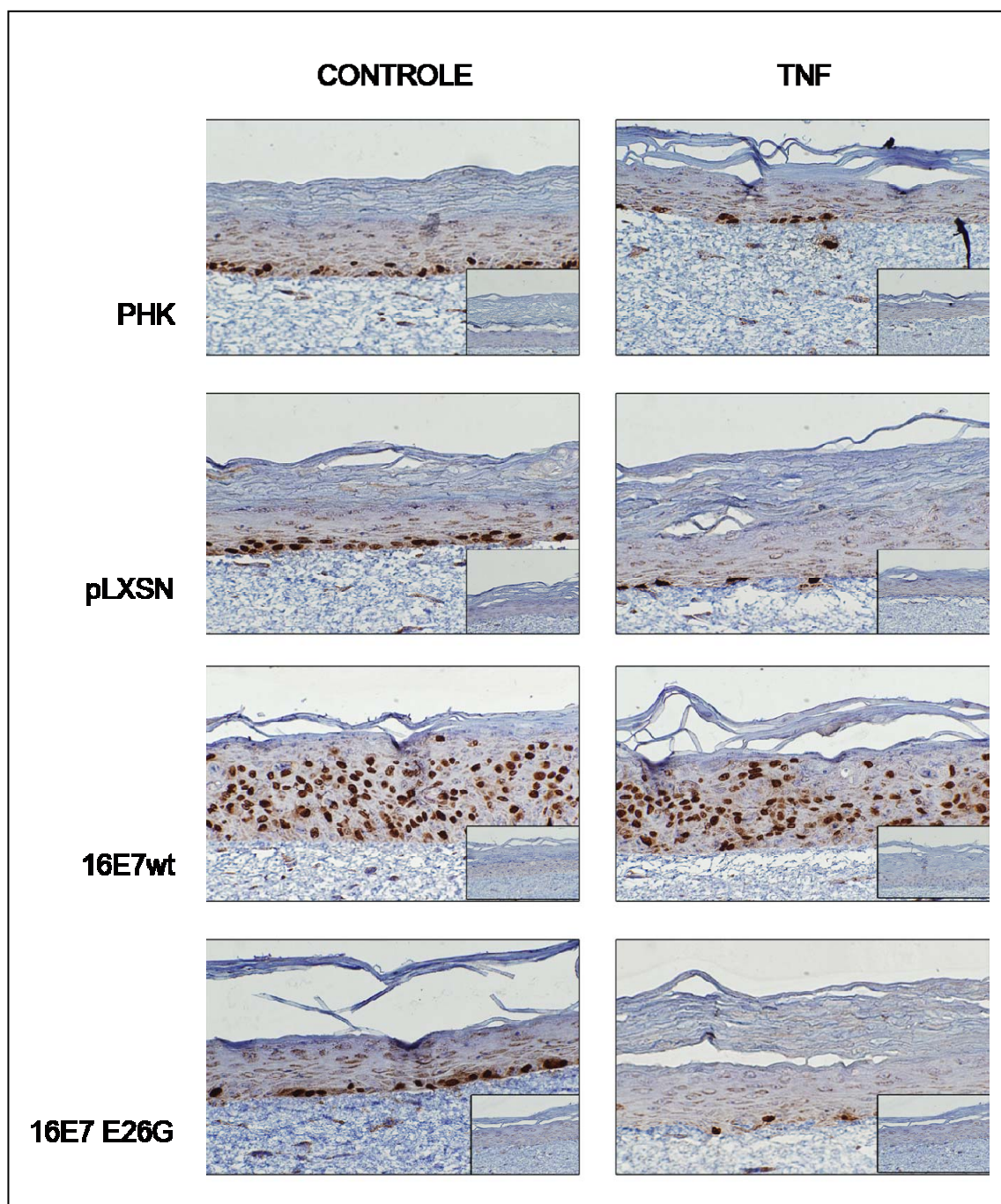


figura 20: Efeitos do TNF na proliferação celular em culturas organotípicas de PHKs normais e transduzidos com vetores retrovirais que expressam o gene E7wt de HPV16 ou o mutante E7E26G incapaz de ligar pRb e/ou induzir a sua degradação. As culturas foram tratadas por 72 horas com 2 nM de TNF sendo que as últimas 12 horas de cultura foram realizadas na presença de BrdU. As setas indicam células que incorporaram BrdU, detectadas por imunohistoquímica. Nos retângulos menores encontram-se os controles negativos da reação.

Alguns autores mostraram que a síntese de DNA nas camadas de células pos-mitóticas e em PHKs diferenciados é induzida pelo gene E7 de HPV 16 ou 18, sendo este oncogene capaz de

a reentrada destas células na fase S do ciclo celular (Cheng *et al.*, 1995a; Jones *et al.*, 1997a; Ruesch e Laimins, 1997; Flores *et al.*, 2000; Banerjee *et al.*, 2006). Além disso, os *rafts* derivados de PHKs transduzidos com retrovírus que expressam os genes E6/E7 de HPV 16, E6/E7 ou E7 de HPV 18 também apresentaram síntese de DNA nas camadas suprabasais do tecido epitelial. Nestes casos, a síntese foi parcialmente inibida pelo tratamento com TNF indicando que estes genes virais conferem aos PHKs resistência a esta citocina, que não é observada em PHKs normais (Boccardo *et al.*, 2004).

Estas observações sugerem que a proteína E7 é capaz de conferir resistência ao efeito antiproliferativo do TNF em *rafts*, e que a mesma depende da capacidade de induzir a degradação da proteína pRb.

3. ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM CULTURAS ORGANOTÍPICAS

O sistema convencional de cultura de PHKs em monocamada seleciona aquelas células capazes de proliferar. Nestas condições estas células apresentam capacidade limitada de diferenciação. Por outro lado, o sistema de *raft* permite a proliferação e a diferenciação celular de maneira semelhante à observada nos epitélios escamosos, permitindo inclusive a identificação das camadas características deste tipo de tecido (Chow e Broker, 1997).

A fim de avaliar as alterações morfológicas decorrentes do tratamento com TNF em *rafts* de PHKs normais e que expressam os oncogenes E6 ou E7, selvagens e mutantes, foi realizada coloração com hematoxilina-eosina (HE) para cada uma das amostras. Na figura 21 são apresentados exemplos das alterações observadas. Pode-se verificar que PHKs transduzidos com vetores retroviral pLXSN vazio não apresentam alterações decorrentes da infecção, quando

comparados com a célula normal. Ambos apresentam uma estrutura epitelial ordenada com um padrão característico de diferenciação nas camadas parabasais e suprabasais do epitélio.

Nos *rafts* transduzidos com o gene E6 observou-se um discreto aumento da espessura do epitélio, mais precisamente um aumento da espessura da camada espinhosa. Esse fenômeno é conhecido como acantose e é normalmente observado em epitélios infectados por HPV. Por outro lado, as culturas que expressam o mutante 16E6 Δ 9-13, incapazes de induzir a degradação de p53, apresentaram uma organização tissular semelhante à observada em *rafts* derivados de PHKs normais (figura 21).

A expressão da oncoproteína E7, por sua vez, promoveu à desorganização arquitetural do epitélio, com presença variável de camada granular e córnea, e com células em proliferação em todas as camadas, ou seja, ocorreu a perda de polarização do tecido, não sendo mais possível a identificação das diferentes camadas do epitélio. Além disso, observou-se um alargamento da camada espinhosa e de transição. Mais ainda, foi observada a retenção de núcleos nas camadas mais superficiais. Os núcleos celulares eram maiores assim como a relação núcleo-citoplasma. Estas alterações são características das displasias cervicais observadas *in vivo*. No entanto, em *rafts* derivados de PHKs transduzidos com o vetor retroviral que expressa o mutante 16E26G da proteína E7, incapaz de transformar células de roedor e de induzir a degradação de pRb, observou-se uma organização tissular semelhante à observada naqueles derivados de PHKs normais.

Estas observações indicam que as alterações morfológicas causadas por E7, e mais atenuadamente por E6, são semelhantes às observadas nas displasias uterinas *in vivo* e dependem, pelo menos em parte, da degradação das proteínas pRb e p53.

Após o tratamento com TNF os rafts apresentaram uma morfologia mais achatada em todas as camadas do epitélio. No entanto, este achatamento não está correlacionado à diminuição no número de camadas celulares no tecido e sim à alteração morfológica das células que compoem cada estrato. Este achatamento foi mais evidente naqueles derivados de PHKs normais, transduzidos com o vetor pLXSN e com vetores que expressam os genes E6 selvagem e os mutantes de E6 e E7. No entanto, este efeito, porém mais atenuado, também foi observado nos rafts elaborados a partir de PHKs que expressam o gene E7. Estas alterações morfológicas induzidas pelo TNF foram consistentemente observadas (com variações entre experimentos) em todos os rafts analisados independentemente dos genes de HPV expressos (Enrique, 2002; Boccardo *et al.*, 2004).

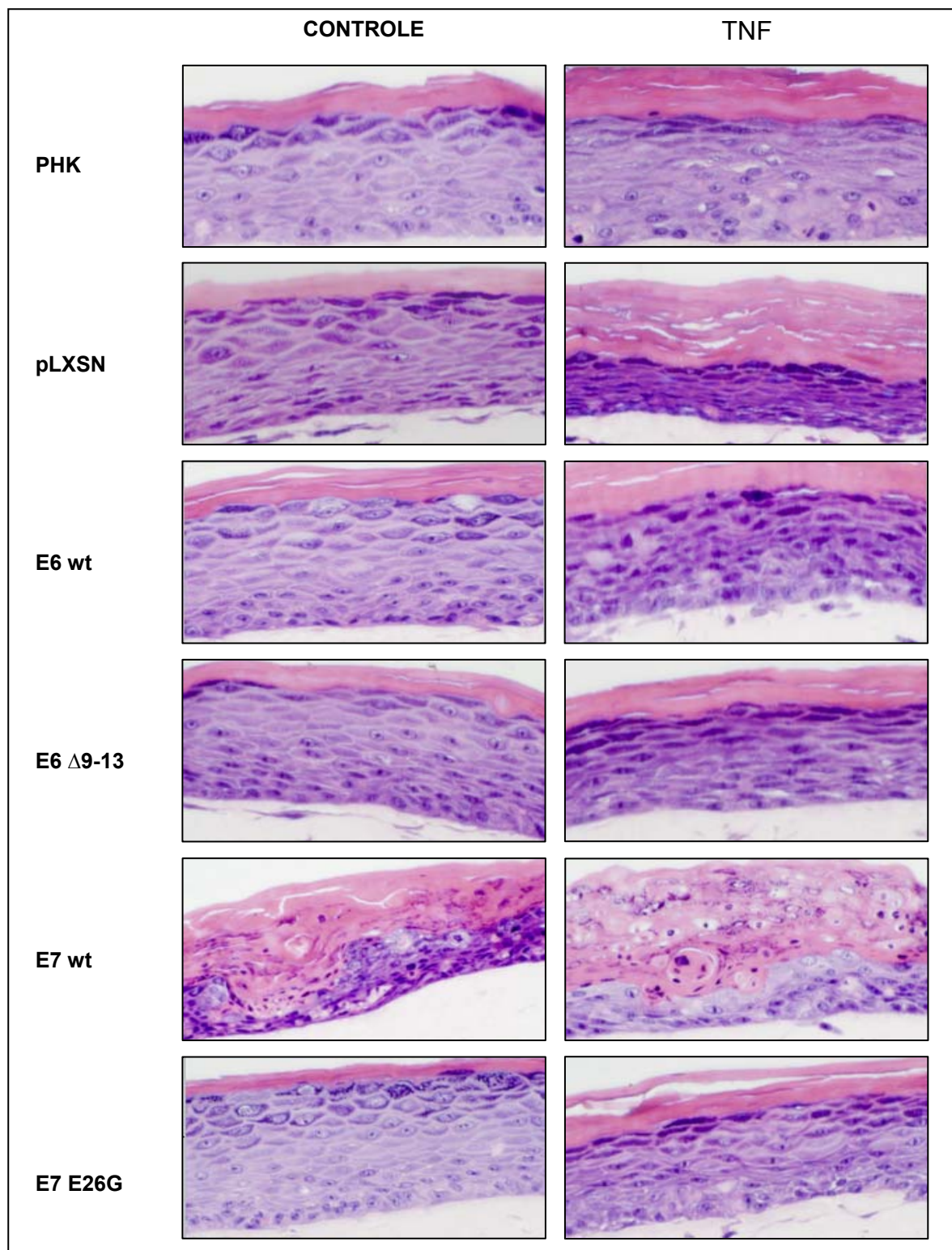


figura 21: Imagens de cortes transversais de rafts de PHK normal e transduzidos com E6wt e E7wt de HPV 16 ou com mutantes incapazes de ligar a p53 e pRb, respectivamente, após coloração com Hematoxilina e Eosina. Notar as alterações morfológicas induzidas pelo gene viral e aquelas resultantes do tratamento com TNF.

Em 1998, McCance e colaboradores mostraram que *rafts* desenvolvidos na presença de HPV16 reproduzem alterações morfológicas semelhante às observadas em lesões intraepiteliais cervicais (McCance, 1998). Em nosso caso, o aparecimento das alterações morfológicas descritas pode ter sido favorecido pelos altos níveis de expressão dos oncogenes virais induzido pelo promotor retroviral.

O genoma do HPV contém dois segmentos principais, sendo cada um constituído por uma série de fases aberta de leitura (ORFs), que são transcritas em RNAs policistrônicos a partir de uma única fita do DNA e codificam para as proteínas virais. A expressão gênica é dividida em precoce (E - early) e tardia (L - late). O segmento E, que representa 45% do genoma, é constituído por oito ORFs e codifica proteínas relacionadas com a replicação e controle do genoma. O segmento L, que representa 40% do genoma, é responsável por codificar as proteínas estruturais do capsídeo do vírus. Entre os segmentos L e E existe um outro segmento que representa 15% do genoma e contém elementos regulatórios. Esta região, chamada de região reguladora upstream (URR –Upstream Regulatory Region) ou região controladora longa (LCR- Long Control Region) concentra seqüências reguladoras importantes na replicação e na transcrição viral (Howley, 2001). A LCR é o sítio de ligação de fatores de transcrição celulares e virais que ativam ou reprimem a atividade do promotor p97, regulando assim a transcrição de vários genes do HPV16, especialmente os oncogenes E6 e E7 (Mistry *et al.*, 2007). A transcrição é finamente regulada pelo estado de diferenciação das células do epitélio infectado, através da atividade do promotor dos HPVs, sendo baixa na camada basal e alta nas camadas suprabasais do mesmo (Chow *et al.*, 1987; Dollard *et al.*, 1992; Meyers *et al.*, 1992; Barksdale e Baker, 1993; Klumpp e Laimins, 1999). De fato, é nas camadas suprabasais onde se observam os maiores níveis de expressão das oncoproteínas virais E6 e E7 (muito pouco expressas nas células da camada basal). Este tipo de regulação fina não ocorre quando se utiliza um vetor de expressão

que transcreve sob controle do promotor constitutivo presente na repetição terminal longa (LTR). A LTR é o centro de controle da expressão gênica retroviral. No caso do vetor retroviral pLXSN, a expressão dos genes nele clonados ocorre a partir do promotor da LTR. Por outro lado, a expressão do gene que confere resistência a neomicina, e permite a seleção das células infectadas, tem sua expressão controlada pelo promotor do SV40 (Miller e Rosman, 1989). No sistema de *raft* utilizado neste estudo, a LTR está fortemente ativa nas células de todas as camadas do epitélio, promovendo a expressão constitutiva das oncoproteínas E6 e E7 do HPV (Chow e Broker, 1997).

A LTR é o centro de controle da expressão gênica retroviral. No caso do vetor retroviral pLXSN, a expressão dos genes nele clonados ocorre a partir do promotor da LTR. Por outro lado, a expressão do gene que confere resistência a neomicina, e permite a seleção das células infectadas, tem sua expressão controlada pelo promotor do SV40 (Miller e Rosman, 1989). No sistema de *raft* utilizado neste estudo, a LTR está fortemente ativa nas células proliferativas da camada basal do epitélio, promovendo inclusive a expressão constitutiva das oncoproteínas E6 e E7 do HPV (Chow e Broker, 1997).

4. CDNA MICROARRAY

Os cDNA-microarrays são arranjos de inúmeros fragmentos de DNA em superfícies de nylon ou vidro que permitem avaliar a expressão de um grande número de genes em um único experimento. Esta tecnologia constitui uma ferramenta fundamental em estudos de expressão gênica como em câncer, por exemplo, (Lakhani e Ashworth, 2001). Este tipo de experimento tem sido amplamente utilizado para identificar genes diferencialmente expressos em tipos celulares distintos e na avaliação do efeito de drogas, citocinas, hormônios, fatores de crescimento, entre outras substâncias, na expressão gênica global. Esta técnica pode ser extremamente eficiente,

por exemplo, na busca de marcadores tumorais ou alvos para drogas (Golub *et al.*, 1999; Beer *et al.*, 2002; Belbin *et al.*, 2002; Pomeroy *et al.*, 2002).

Estudos anteriores mostraram que queratinócitos humanos primários ou imortalizados com HPV 16 são sensíveis ao efeito antiproliferativo do TNF, enquanto queratinócitos imortalizados com HPV 18 ou com SV40 são resistentes aos efeitos inibidores desta citocina (Villa *et al.*, 1992; Vieira *et al.*, 1996). Estas observações sugerem que a aquisição de resistência ao efeito antiproliferativo do TNF é um fator importante no desenvolvimento de neoplasias associadas à infecção por HPV. Em 2004, Rösl e colaboradores observaram que híbridos celulares não tumorigênicos entre células HeLa (que contém DNA de HPV 18) e fibroblastos humanos normais, respondem ao TNF mediante a supressão da transcrição dos genes do HPV 18, juntamente à indução do fator MCP-1.

No entanto, a identificação de genes associados à resposta ao TNF em queratinócitos infectados por HPV tem sido dificultada pela ampla gama de efeitos desencadeados e de vias de sinalização ativadas por este fator. Neste estudo, a técnica de cDNA-*microarray* foi aplicada visando identificar genes diferencialmente expressos entre PHKs normais e queratinócitos que expressam as proteínas E6 ou E7 de HPV 16, antes e após tratamento com TNF. Optamos por tratar as células com TNF durante 60 horas, por ser este o ponto a partir do qual o efeito inibitório do TNF é maior (Villa e Schlegel, 1991; Vieira *et al.*, 1996; Banno *et al.*, 2004). O objetivo desta análise é identificar diferenças na expressão gênica que permitam explicar o efeito diferencial desta citocina em resposta à expressão destes oncogenes virais.

Alguns estudos investigaram diferenças nos perfis de expressão gênica associados à expressão das oncoproteínas virais E6 e E7. A expressão destas oncoproteínas está associada à diminuição da expressão de genes relacionados à resposta imune e inflamatória, como por exemplo, genes induzidos pelo interferon (Chang e Laimins, 2000; Nees *et al.*, 2001). Outro estudo determinou que a proteína E6 de HPV16 diminui a expressão de diversos genes relacionados à diferenciação dos queratinócitos, incluindo genes que codificam transglutaminases, involucrina, elafina e citoqueratinas. Contrariamente, E6 aumenta a expressão da vimentina, uma proteína do citoesqueleto (Duffy *et al.*, 2003). A investigação do perfil gênico de amostras originadas de carcinomas cervicais, em diferentes estádios, mostrou que a carcinogênese cervical apresenta a diminuição quase completa da expressão de genes associados à morte celular, biossíntese protéica e metabolismo dos ácidos nucléicos. Em contrapartida, observou-se o aumento da expressão de genes associados ao desenvolvimento do citoesqueleto, atividade extracelular, resposta imune e proliferação celular (S100A8, símbolo do gene calgranulina A e RARRES3, símbolo do gene que codifica o receptor 3 do ácido retinóico) (Ahn *et al.*, 2004).

4.1. Amplificação de RNA

Diversos estudos têm mostrado que a utilização de RNA amplificado (aRNA), ao invés de RNA total (tRNA), na hibridização em lâmina de cDNA *microarray*, aumenta a intensidade do sinal fluorescente e diminui o *background*, melhorando a detecção sem a inserção de viés (Wang *et al.*, 2000; Feldman *et al.*, 2002; Gomes *et al.*, 2003). Em 2003, Li e colaboradores apresentaram resultados que sugerem que a abundância de toda a população de RNA mensageiro é alterada de forma específica, quando comparada aos demais tipos de RNAs, durante os processos de amplificação e purificação sem afetar suas proporções iniciais na amostra (Li *et al.*, 2003).

Com base nestes dados, decidiu-se testar a qualidade da hibridização utilizando RNA total e RNA amplificado provenientes de nossas amostras, extraídos a partir de cultura em monocamada. Como exemplo, é apresentado o resultado da hibridização da amostra PHK normal. Com aRNA, observa-se uma considerável melhora na intensidade do sinal (figura 22), um aumento no número de *spots* quantificáveis (aRNA- 4277/4600; tRNA- 1096/4600) e conseqüentemente um aumento na qualidade do resultado obtido, o que pode ser visto numa análise prévia pelo coeficiente de correlação de Pearson (r) (r (aRNA) = 0.1389; r (tRNA) = 0.4175) (figura 23).

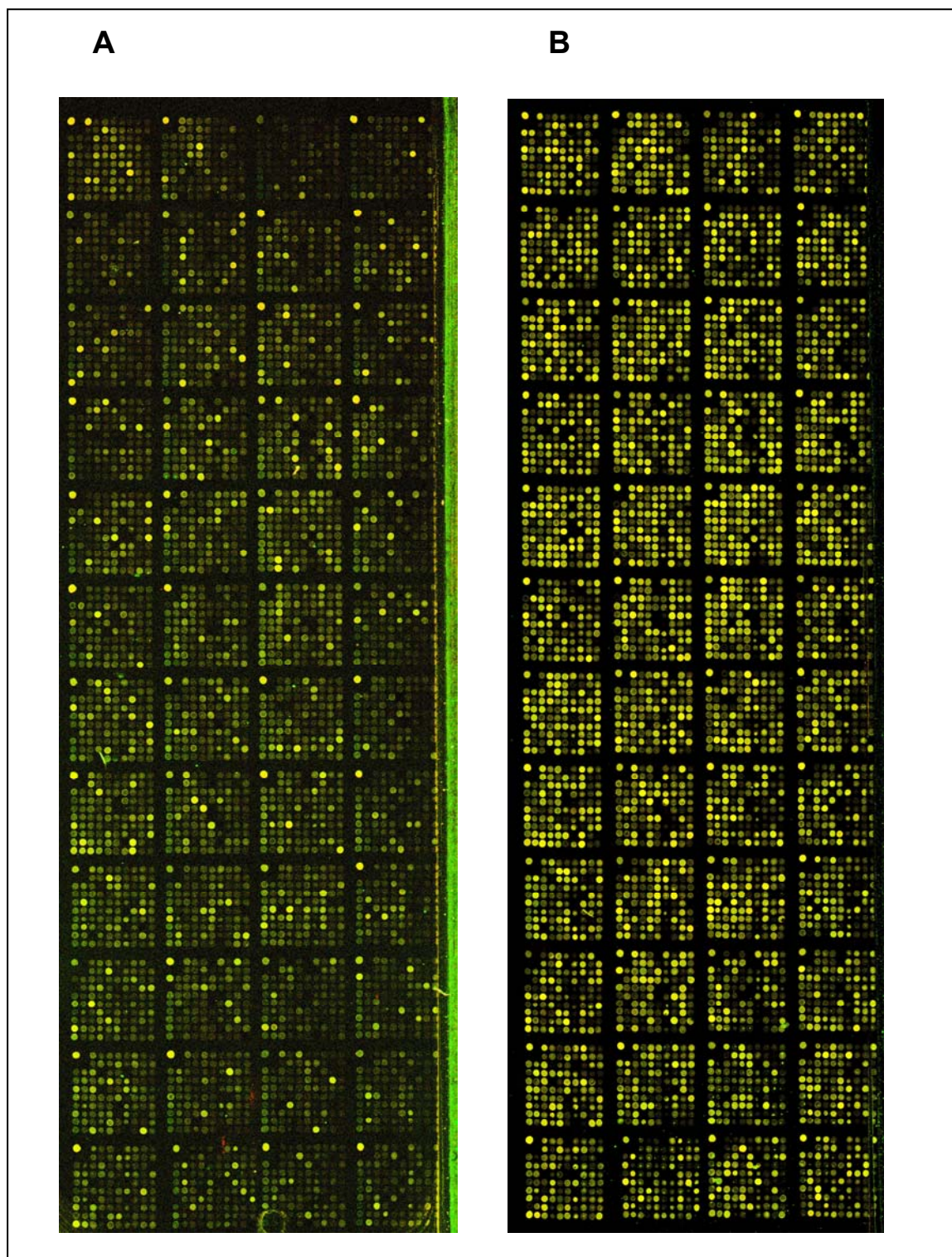


figura 22: Hibridização em lâmina de microarray (Composite) de amostras de RNA provenientes de queratinócitos normais. A) a partir de RNA total; B) a partir de RNA amplificado

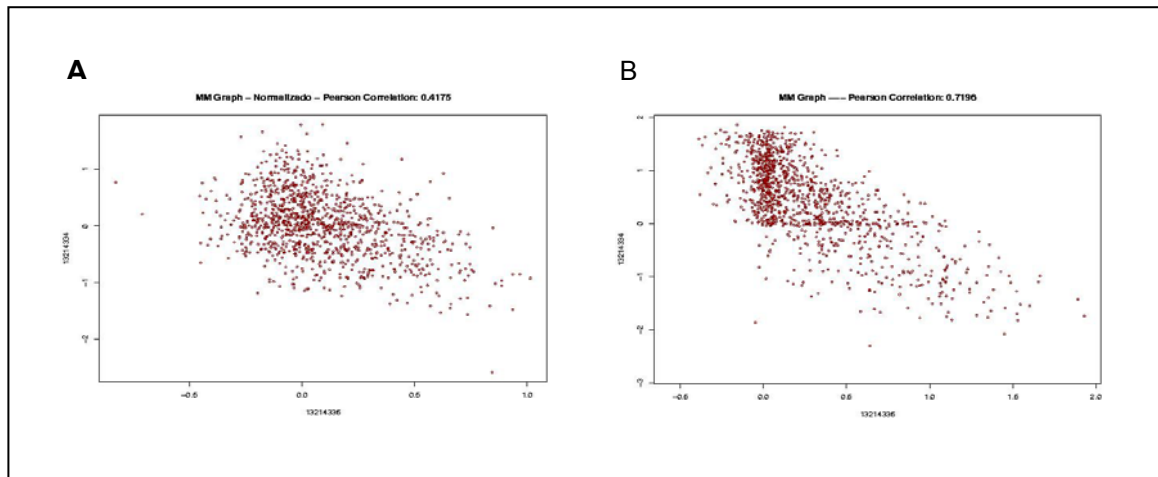


figura 23: Representação gráfica tipo *MM-plot* para a amostra PHK (RNA total) (razão lâmina MAIN X razão lâmina SWAP). A) Índice de correlação das razões não normalizadas; B) Índice de correlação das razões normalizadas. O Índice de Correlação de Pearson indicado acima dos gráficos, representa a similaridade entre os experimentos realizados.

O coeficiente de correlação de Pearson (r) mede o grau da correlação (e a direção dessa correlação - se positiva ou negativa) entre duas variáveis de escala métrica.

Este coeficiente, normalmente representado pela letra " r " assume valores entre -1 e 1.

- $r = 1$ Significa uma correlação perfeita positiva entre as duas variáveis.
- $r = -1$ Significa uma correlação negativa perfeita entre as duas variáveis - Isto é, se uma aumenta, a outra sempre diminui.
- $r = 0$ Significa que as duas variáveis não dependem linearmente uma da outra. No entanto, pode existir uma outra dependência que seja "não linear". Assim, o resultado $r = 0$ deve ser investigado por outros meios.

A tabela 2 representa os resultados obtidos pela análise prévia das lâminas hibridizadas com os aRNAs representados na figura. O número de *spots* quantificáveis dentre os 4600 foi satisfatório em todos os casos. O coeficiente de correlação de Pearson foi adequado com o tipo de amostra

hibridizada. Para a amostra hibridizada PHK/PHK, por exemplo, $r = 0.1389$. Valores próximos a 0 são esperados para hibridizações deste caso, quando a amostra e a referência são iguais. Já para amostras diferentes esperamos valores de r próximos a 1, o que se pode observar nas demais hibridizações provenientes de cultura em monocamada, feitas com aRNA.

tabela 2: Dados gerais de cada par de lâminas (MAIN e SWAP) utilizado no experimento de Microarray

Sample	Control	Swap	Description	Submission Date	Corr	Spots
MA1	13210362 IR DI [LAD]	13210361 IR DI [LAD]	PHK	2006-08-10	0.1389	4277
MA2	13210364 IR DI [LAD]	13210363 IR DI [LAD]	PHKTNE	2006-08-10	0.7717	4133
MA3	13210369 IR DI [LAD]	13210368 IR DI [LAD]	E7wt	2006-08-10	0.761	4382
MA4	13249126 IR DI [LAD]	13210370 IR DI [LAD]	E7wtTNE	2006-08-10	0.7588	4343
MA5	13210373 IR DI [LAD]	13210372 IR DI [LAD]	E7E26G	2006-08-10	0.5327	4284
MA6	13249135 IR DI [LAD]	13210374 IR DI [LAD]	E7E26GTNE	2006-08-10	0.6857	4315
MA7	13249138 IR DI [LAD]	13249137 IR DI [LAD]	PHKpLXSN	2006-08-14	0.5199	4414

Considerando que todas as amostras de aRNA apresentaram uma melhora considerável na intensidade de sinal observado, quando comparado com aquelas na qual foi utilizado tRNA, optou-se por apenas hibridizar amostras de aRNA. Assim, todas as amostras de RNA foram amplificadas, para posterior hibridização em lâmina de *Microarray*. A figura 24 representa uma avaliação qualitativa, em gel de agarose, das amostras de aRNAs obtidas.

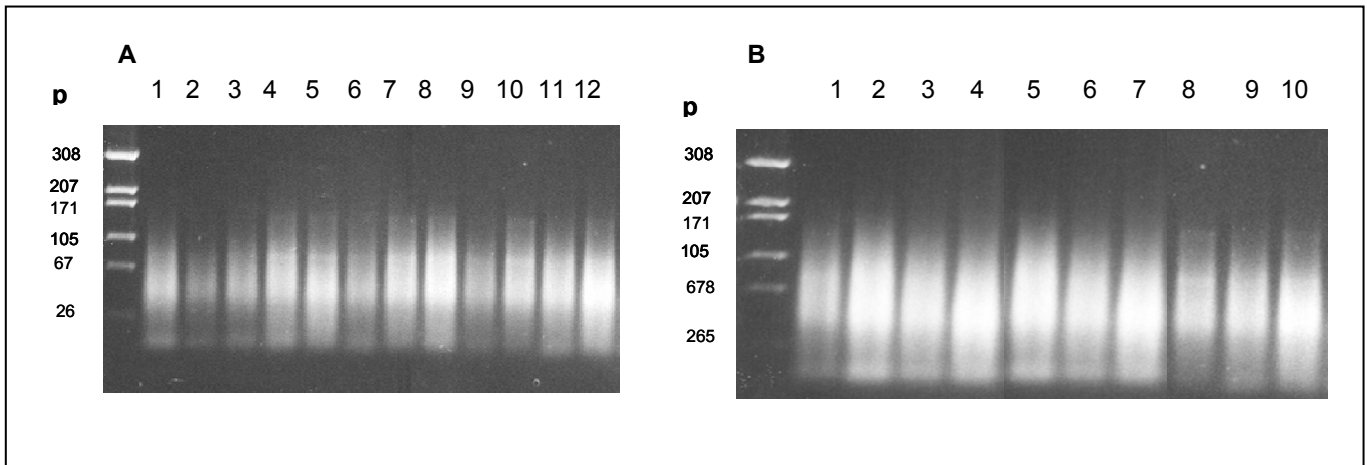


figura 24: Avaliação qualitativa em gel de agarose 1% dos RNAs amplificados a partir de RNA total extraído de: (A) cultura em monocamada de queratinócitos normais (PHK) (1), queratinócitos transfectados com o vetor vazio pLXSN (3), PHK transfectados com o vetor que codifica os genes 16E6wt (5), 16E6 Δ 9-13 (7), 16E7 wt (9) e 16E6 26G (11). As colunas 2, 4, 6, 8, 10 e 12 correspondem às amostras 1, 3, 5, 7, 9 e 11 respectivamente, tratadas com 2nM de TNF. (B) cultura organotípica de queratinócitos transfectados com o vetor vazio pLXSN (1), com o vetor que codifica os genes 16E6wt (3), 16E6 Δ 9-13 (5), 16E7 wt (7) e 16E6 26G (9). As colunas 2, 4, 6, 8 e 10 correspondem às amostras 1, 3, 5, 7 e 9 respectivamente, tratadas com 2nM de TNF.

4.2. Desenho experimental

Diversos cuidados devem ser considerados na elaboração, análise e interpretação dos resultados de experimentos de *microarray*. Dentre eles, a escolha do método para normalização da fluorescência dos dois canais, o número de experimentos e a forma de expressar os resultados (Quackenbush, 2001).

Neste estudo, foi utilizado um desenho experimental que permite: 1) identificar genes diferencialmente expressos entre queratinócitos normais (PHK), e queratinócitos infectados com vetor vazio (pLXSN) ou com vetores que expressam os genes de HPV16 que codificam para as proteínas E6 ou E7 (selvagem e mutante); 2) Identificar genes diferencialmente modulados pelo tratamento com TNF por 60Hs, entre as células normais, e as que expressam as oncoproteínas virais.

4.3. Pré-análise

4.3.1. Normalização dos dados

Para a normalização dos dados, utilizou-se um método de regressão não linear (método de LOWESS). Primeiramente, representações gráficas do tipo *scatter-plot* foram geradas para cada lâmina, individualmente (gráficos *MA-plot*). Este tipo de análise possibilita avaliar a influência da intensidade de sinal sobre as razões de expressão de cada gene (razão X média de intensidade). Entretanto, quando se realizam hibridizações em duplicata, utilizando a inversão de corantes, torna-se imprescindível determinar a reprodutibilidade do experimento. Para isso, calcula-se o coeficiente de correlação de Pearson, que permite averiguar se existe correlação linear entre os dados, como descrito anteriormente. Representações gráficas tipo *MM-plot* foram geradas para cada amostra (razão *MAIN* X razão *SWAP*).

As figura 25 e figura 26 mostram os dados brutos e normalizados de uma amostra representativa (PHK/PHK) cultivada em monocamada. A figura 25 mostra os dados da lâmina *MAIN*, significando que a amostra foi marcada com Alexa 555 e o RNA referência com *Alexa 647*. Os painéis A e B representam respectivamente, um histograma e um gráfico *MA-plot* dos dados não normalizados, ao passo que, os painéis C e D, representam os mesmos dados após normalização. A figura 26 mostra os dados da lâmina *SWAP* em que a mesma amostra foi marcada com o corante Alexa 647 e o RNA referência com o corante *Alexa 555*. Os painéis A e B representam os dados brutos e os painéis C e D, os normalizados. A figura 27 representa a correlação entre as lâminas *MAIN* e *SWAP*, com os dados não normalizados (A) e após a normalização (B).

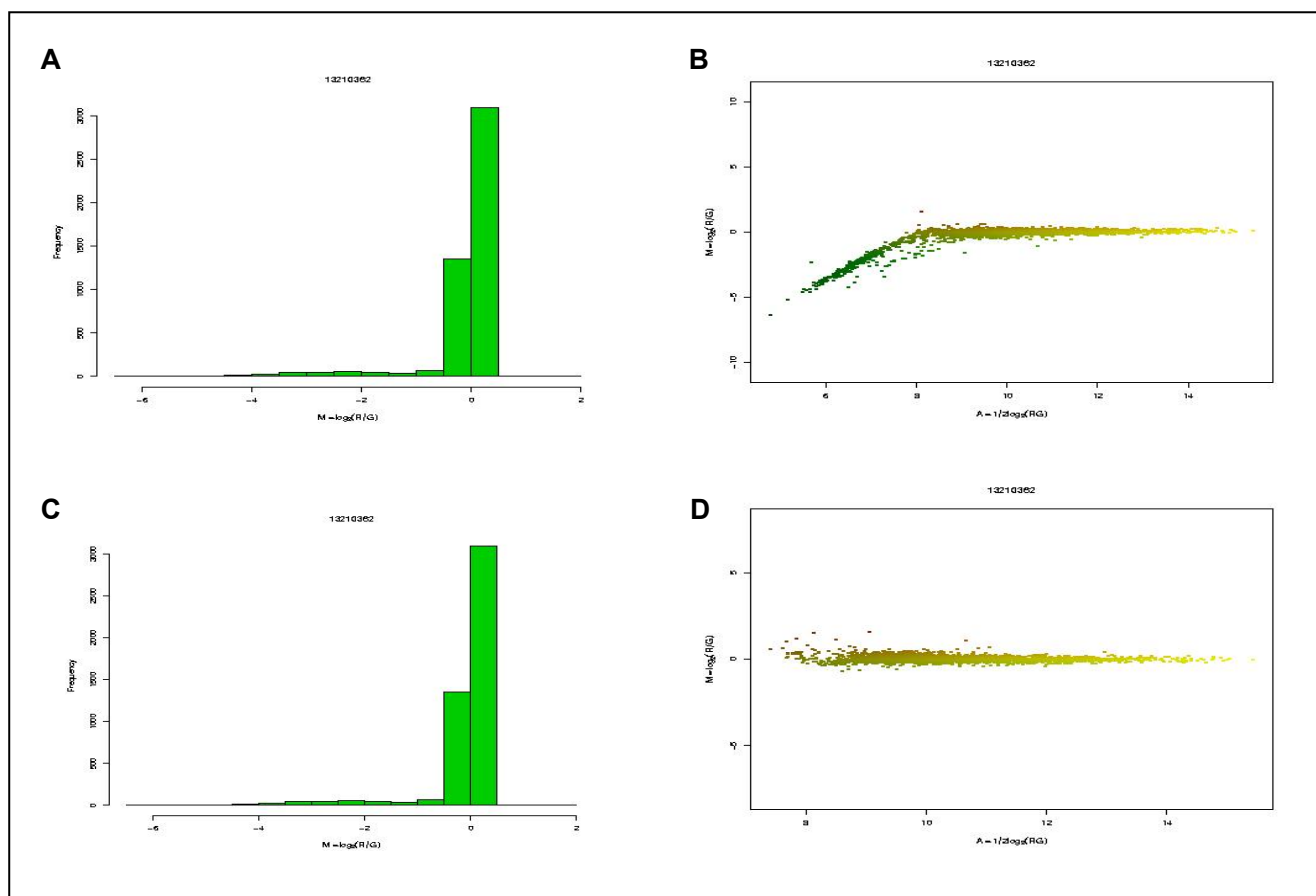


figura 25: Exemplo da normalização dos dados obtidos para as amostras PHK (marcada com *Alexa 555*) e RNA referência (PHK) (marcado com *Alexa 647*) (A). Utilizou-se para a normalização o método de regressão não linear de LOWESS. A) Frequência da razão dos dados não normalizados; B) Gráfico tipo MA-plot que representa as razões e as médias das intensidades de sinal dos dados não normalizados; C) Frequência da razão dos dados após sua normalização; D) Gráfico tipo MA-plot que representa as razões e as médias das intensidades de sinal dos dados normalizados.

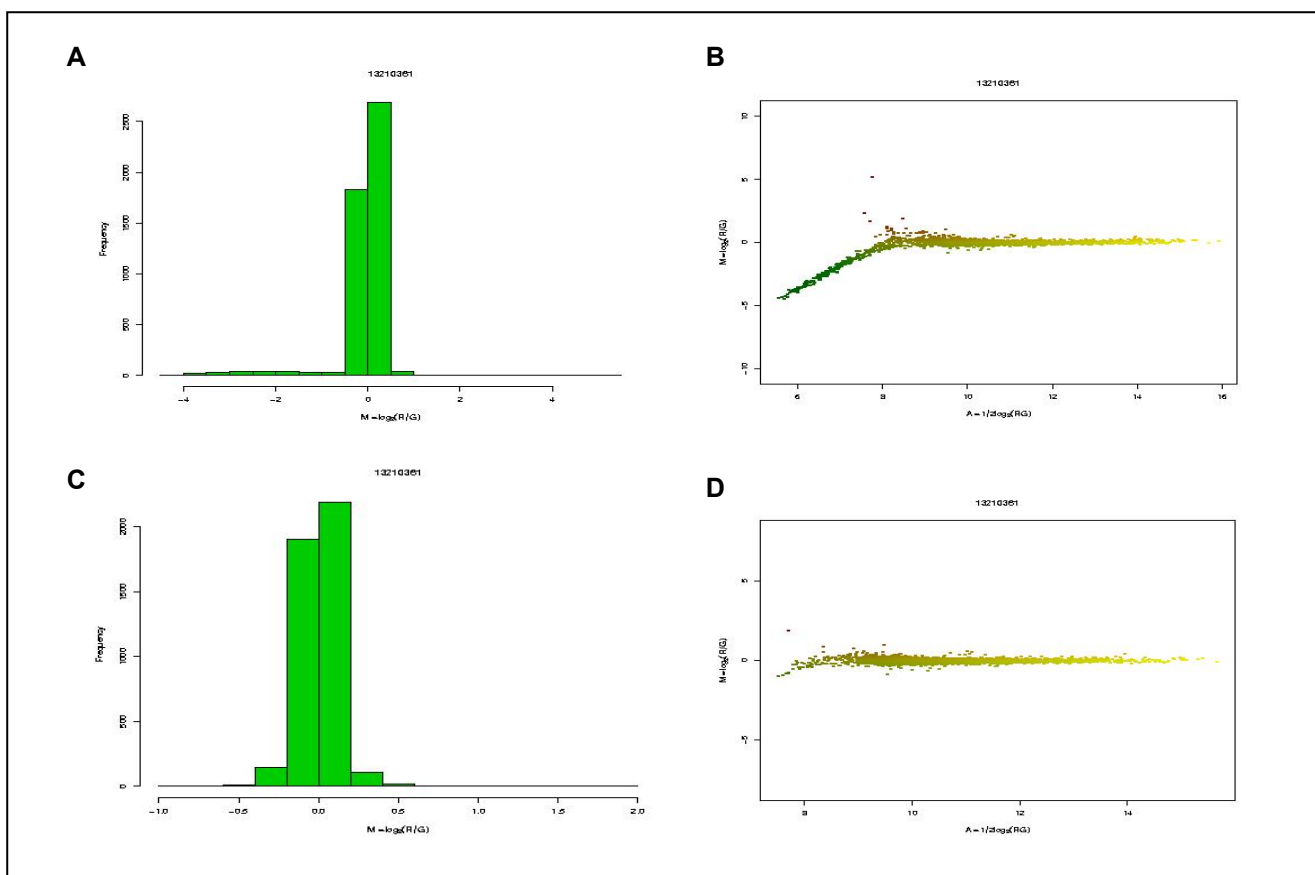


figura 26: Exemplo da normalização dos dados obtidos para as amostras PHK (marcada com Alexa 647) e RNA referência (PHK) (marcado com Alexa 555). Utilizou-se para a normalização o método de regressão não linear de LOWESS. A) Frequência da razão dos dados não normalizados; B) Gráfico tipo MA-plot que representa as razões e as médias das intensidades de sinal dos dados não normalizados; C) Frequência da razão dos dados após sua normalização; D) Gráfico tipo MA-plot que representa as razões e as médias das intensidades de sinal dos dados normalizados.

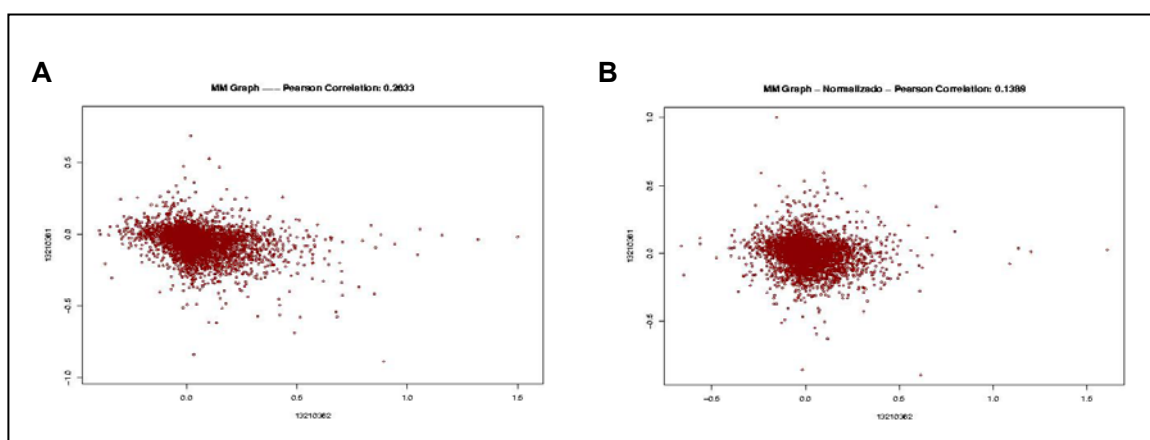


figura 27: Representação gráfica tipo MM-plot para a amostra PHK (RNA amplificado) (razão lâmina MAIN X razão lâmina SWAP). A) Índice de correlação das razões não normalizadas; B) Índice de correlação das razões normalizadas. O Índice de Correlação de Pearson acima dos gráficos, representa a similaridade entre os experimentos realizados.

BOXPLOT é um método alternativo ao histograma para representar os dados. Ele fornece informação sobre as seguintes características do conjunto de dados: locação, dispersão, assimetria e medidas discrepantes sobre o conjunto de dados. É um retângulo alinhado horizontalmente com duas semi-retas, uma em cada um dos lados opostos do retângulo, ligando respectivamente os quartis Q1 e Q3 ao valor mínimo e máximo do conjunto de dados. A largura do retângulo é definida pelos quartis Q1 e Q3. Uma linha secciona o retângulo no valor da mediana. O retângulo contém 50% dos valores do conjunto de dados e, a posição da linha mediana no retângulo informa sobre a assimetria da distribuição.

As observações que estiverem acima de Q3 ou abaixo de Q1 são chamadas pontos exteriores e representadas por asteriscos. Essas observações destoantes das demais podem ser o que chamamos de *outliers* ou valores atípicos.

A fim de exemplificar, a

figura 28 mostra gráficos de *BoxPlot* para todas as hibridações, provenientes de cultura em monocamada, analisadas neste trabalho. Na parte A é possível identificar que algumas hibridações são bastante diferentes entre si, particularmente as lâminas. Essas diferenças nos dados brutos tornam a comparação e a seleção de genes diferencialmente expressos entre as hibridações praticamente impossível, pois qualquer diferença não seria estatisticamente significativa uma vez que o erro é muito grande. Para a confecção da figura 28 foram utilizados os valores de intensidade brutos, antes mesmo da subtração do *background* para que se tenha a real dimensão das diferenças entre as hibridações.

A

figura 28 B mostra as distribuições de intensidades de todas as hibridações já normalizadas por Lowess e reduzidas a uma distribuição comum, permitindo, assim, uma comparação mais correta e não-tendenciosa. Nesse caso, os cálculos para a correção e subtração do *background* foram feitos anteriormente à normalização em si.

A

figura 28 C mostra as distribuições de intensidades de todas as hibridações normalizadas por Lowess e Across, ou seja, normalizado por lâmina individualmente e no experimento como um todo, respectivamente. Este tipo de normalização geralmente é feito quando a normalização apenas por Lowess não é suficiente. No entanto, neste caso a normalização por Lowess mostrou-se satisfatória, estando o centro do BoxPlot de todas as lâminas no ponto 0 no eixo Y.

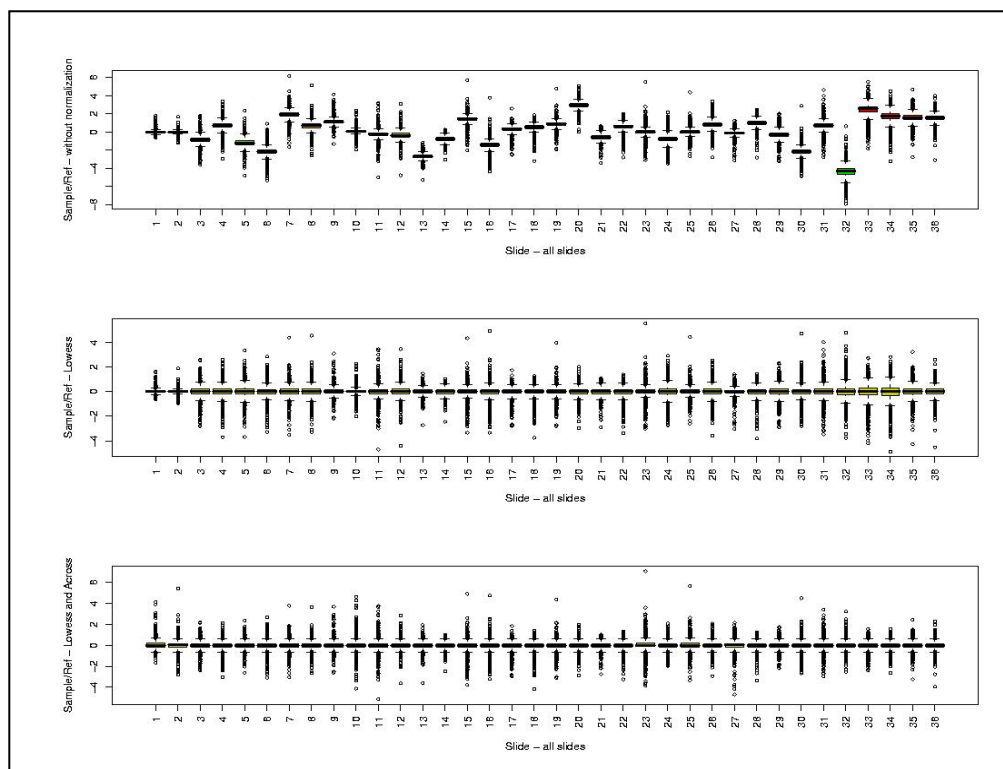


figura 28: BoxPlot de todas as lâminas hibridizadas, com amostras provenientes de cultura em monocamada de PHK normal e tranfectado com o vetor pLXSN vazio e contendo o gene E7 selvagem e mutante.. A) Dados não normalizados; B) Dados normalizados por Lowess; C- Dados normalizados por Lowess e Across.

Esta pré-análise das lâminas hibridizadas, tanto para PHKs cultivados em monocamada quanto em raft, permitiu classificá-las como de boa qualidade. Um número elevado de pontos quantificáveis foi observado em todos os casos, assim como uma intensidade de sinal satisfatória, além de valores de coeficiente de correlação de Pearson coerentes ao tipo de amostra hibridizada. Valores próximos a zero são esperados para hibridizações de amostra muito semelhantes e próximos a um para amostras diferentes. Vale ressaltar, que no caso das amostras provenientes de rafts, os valores de coeficiente de correlação Pearson foi em todos os casos próximos a 1, o que pode ser explicado pela diferença das amostras cultivadas num sistema que reproduz a diferenciação do epitélio em relação aquela cultivada em monocamada e utilizada como referência. Além disso, utilizou-se um modelo matemático de proximidade entre dois objetos, a Distância Euclidiana, a partir da qual uma matriz de distâncias é gerada. Nesta etapa, as lâminas foram agrupadas à semelhança de uma classificação taxonômica, e representadas num gráfico com uma estrutura em árvore, o dendograma. Na grande maioria dos casos a lâmina MAIN agrupou junto com a lâmina SWAP, indicando uma alta qualidade na hibridização e a reprodutibilidade dos pares de lâmina.

4.4. Análise dos dados

Depois de confirmada a boa qualidade das hibridizações e das réplicas, seguiu-se com a análise dos dados propriamente dita. Com o objetivo de identificar genes diferencialmente expressos entre as diferentes classes de amostras, os valores relativos normalizados de cada gene foram submetidos a uma análise de variância, utilizando-se o método de ANOVA (*analysis of variance*).

A fim de facilitar a análise dos dados as amostras foram divididas em 4 grupos. Dentro de cada um deles, além das amostras de PHK que expressam uma das oncoproteínas virais selvagens e mutantes também utilizamos, PHKs normais e infectados com o vetor pLXSN vazio. Metade das amostras foi tratada com 2nM TNF por 60 horas, sendo a outra metade utilizada como controle do tratamento. A tabela 3 descreve as peculiaridades de cada um destes 4 grupos.

tabela 3: Descrição dos 4 grupos de genes analisados por ANOVA

Hibridização de RNAs provenientes de PHKs que expressam a proteína E6 de HPV16	
GRUPO 1	Cultura em monocamada
GRUPO 2	Cultura Organotípica (Raft)
Hibridização de RNAs provenientes de PHKs que expressam a proteína E7 de HPV16	
GRUPO 3	Cultura em monocamada
GRUPO 4	Cultura Organotípica (Raft)

Cada um destes grupos foi submetido a uma ANOVA 3x2 (p valor ≤ 0.05), que levou em conta as 3 linhagens celulares utilizadas em cada caso (PHK transfectados com o vetor pLXSN vazio; PHK transfectados com o vetor que expressa a proteína E6 ou E7 selvagem; e PHK que expressam as proteínas mutantes E6 Δ 9-13 ou E7 E26G) e a presença ou ausência de tratamento com TNF (figura 29). Em todas as análises aqui descritas optou-se por utilizar como tecido normal o PHK transfectado com o vetor pLXSN vazio ao invés do PHK normal, visto que a transfecção de um vetor retroviral pode efeitos não previstos na expressão gênica global destas células. Como resultado desta etapa, foram obtidas 4 ANOVAS independentes. Como o mesmo RNA referência (PHK em monocamada) foi utilizado em todas as hibridizações, é possível realizar comparações entre cada um destes grupos.

(2)	(3)	PHK pLXSN	PHK E6 ou E7 selvagem	PHK E6 ou E7 mutante
TNF +	ANOVA			
TNF -				

figura 29: Representação esquemática da ANOVA 3x2.

Com o objetivo de identificar genes diferencialmente expressos entre duas classes de amostras diferentes e determinar o p-valor para a expressão de cada gene individualmente, em cada um dos diferentes grupos analisados pela ANOVA, os valores relativos normalizados de cada gene foram submetidos ao teste *t de student* ($p < 0.05$). Para todos os genes diferencialmente expressos, que apresentaram no teste *t de student* um p-valor < 0.05 , calculamos o *FOLD*. Uma lista com número de genes diferencialmente expressos em cada uma destas comparações e a relativa variação de *FOLD* dentro de cada grupo está representado na tabela 4. Nesta, o termo *null* é utilizado para amostras não tratadas com TNF, *wt* para amostras selvagens e *mut* para os mutantes utilizados.

tabela 4: Genes diferencialmente expressos entre as classes de amostras analisadas. Os valores de *FOLD* positivos correspondem a genes mais expressos no numerador, enquanto que os valores negativos correspondem a genes mais expressos no denominador.

		E6 mono – P_valor	E6 mono – Fold	E6 raft – P_valor	E6 raft – Fold	E7 mono – P_valor	E7 mono – Fold	E7 raft – P_valor	E7raft – Fold
EnWT_Null_X_EnWT_TNF	Min	71	-29.5	60	-5.67	80	-2.76	43	-1.66
	1Qt		-1.57		-1.6		-1.32		-1.26
	Med		-1.24		-1.21		1.32		1.18
	3Qt		1.3		-1.08		1.72		1.42
	Max		2.7		1.91		28.69		10.05
EnWT_Null_X_Mut_Null	Min	20	-1.68	72	-2.75	119	-4.27	95	-6.47
	1Qt		-1.42		-1.38		-1.36		-2.1
	Med		-1.25		1.25		1.19		-1.44
	3Qt		1.22		1.53		1.64		1.21
	Max		1.4		5.59		3.88		7.75
EnWT_Null_X_Mut_TNF	Min	71	-25.66	219	-6.72	141	-4.27	47	-2.5
	1Qt		-1.73		-1.6		-1.44		-1.36
	Med		1.11		-1.22		1.22		-1.13
	3Qt		1.41		1.63		1.77		1.22
	Max		3.35		9.35		4.86		1.93
EnWT_Null_X_Vazio_Null	Min	4	-1.13	90	-8.24	69	-3.53	149	-8.67
	1Qt		0.56		-1.5		-1.51		-2.03
	Med		1.13		-1.27		-1.25		-1.34
	3Qt		1.15		1.2		1.48		1.5
	Max		1.19		1.57		2.61		10.09
EnWT_Null_X_Vazio_TNF	Min	82	-33.7	183	-7.47	274	-3.71	222	-9.32
	1Qt		-1.85		-1.62		-1.55		-1.74
	Med		-1.49		-1.2		1.34		-1.27
	3Qt		1.39		1.43		1.91		1.62
	Max		2.93		4.99		76.31		13.79
EnWT_TNF_X_Mut_Null	Min	161	-16.8	76	-6.26	78	-30.22	177	-5.93
	1Qt		-1.67		-1.42		-1.34		-1.85
	Med		-1.26		-1.12		-0.01		-1.41
	3Qt		1.38		1.38		1.31		1.41
	Max		3.01		3.41		5.87		8.33
EnWT_TNF_X_Mut_TNF	Min	19	-1.66	85	-4.5	62	-3.71	73	-2.47
	1Qt		-1.25		-1.65		-1.35		-1.61
	Med		-1.15		1.17		-1.1		-1.23
	3Qt		1.21		1.57		1.33		1.3
	Max		1.42		2.67		3.19		3.2
EnWT_TNF_X_Vazio_Null	Min	82	-30.09	151	-8.08	74	-12.92	261	-7.95
	1Qt		-1.56		-1.44		-1.45		-1.88
	Med		1.07		1.27		-1.15		-1.34
	3Qt		1.36		1.6		1.28		1.63
	Max		2.6		5.03		2.42		9.19
EnWT_TNF_X_Vazio_TNF	Min	26	-1.95	44	-4.56	247	-3.64	262	-8.54
	1Qt		-1.29		-1.45		-1.49		-1.84
	Med		-1.2		-1.17		1.26		-1.39
	3Qt		1.25		1.24		1.7		1.43
	Max		1.45		2.19		3.74		12.56
	Min	98	-14.61	69	-3.62	18	-1.2	15	-1.6
	1Qt		-1.74		-1.48		-1.15		-1.15

Mut_Null_X_Mut_TNF	Med		-1.19		-1.2		-1.09		1.09
	3Qt		1.35		1.33		1.16		1.24
	Max		2.57		2.84		1.34		1.33
Mut_Null_X_Vazio_Null	Min	34	-2.18	59	-2.02	71	-6.06	36	-2.23
	1Qt		-1.37		-1.49		-1.33		-1.28
	Med		0.02		-1.28		1.16		-1.19
	3Qt		1.32		1.13		1.35		1.21
	Max		2		1.76		4.66		1.66
Mut_Null_X_Vazio_TNF	Min	160	-19.19	75	-4.95	280	-12.69	79	-2.85
	1Qt		-1.91		-1.5		-1.5		-1.33
	Med		-1.44		-1.33		1.33		1.2
	3Qt		1.38		1.29		1.79		1.56
	Max		7.76		2.46		80.4		6.02
Mut_TNF_X_Vazio_Null	Min	80	-26.17	207	-5.75	68	-3.02	41	-2.05
	1Qt		-1.8		-1.56		-1.29		-1.23
	Med		-1.42		1.4		1.14		1.33
	3Qt		1.35		2.02		1.34		1.56
	Max		2.46		14.42		5.22		3.29
Mut_TNF_X_Vazio_TNF	Min	21	-2.13	51	-3.82	209	-3.74	54	-2.08
	1Qt		-1.29		-1.35		-1.55		-1.4
	Med		1.18		1.16		1.31		1.22
	3Qt		1.28		1.4		1.68		1.44
	Max		1.42		2.06		5.25		3.58
Vazio_Null_X_Vazio_TNF	Min	103	-34.37	231	-8.16	107	-4.33	142	-3.82
	1Qt		-1.84		-1.49		-1.26		-1.62
	Med		-1.52		1.27		1.33		1.12
	3Qt		1.22		1.84		1.72		1.45
	Max		4.33		4.74		34.37		8.16

Dentre todas as comparações descritas na tabela 4, nos concentramos naquelas que apresentaram maior número de genes diferencialmente expressos com p-valor menor do que 0.05, identificados por *teste t de student* e com grande variação de *FOLD*. A seguir estão descritas algumas destas comparações, para PHKs cultivados em monocamada (M) e raft (R).

4.4.1. Comparação entre os sistemas de cultura em monocamada e raft (tabela 4)

A fim de comparar as listas de genes diferencialmente expressos, identificados por *teste t de student*, utilizou-se o programa PowerTools desenvolvido pelo laboratório de bioinformática do Hospital do Câncer, sob a coordenação da Dra. Helena Brentani e disponível na rede no endereço: http://www.lbhc.hcancer.org.br/power_array/power_tools/Compara_listas/

A primeira observação feita comparando-se os dados provenientes da tabela foi um aumento significativo no número de genes diferencialmente expressos identificados em amostras

provenientes de *raft* (R) quando comparados à cultura em monocamada (M), em todas as comparações descritas abaixo.

- E6wt *null versus vazio-null* (M= 4 e R= 90 genes)
- E7wt *null versus vazio-null* (M= 69 e R= 149 genes)
- E6wt TNF *versus vazio-TNF* (M= 26 e R= 44 genes)
- E7wt TNF *versus vazio-TNF* (M= 247 e R= 262 genes)

No caso das amostras de PHK transfectadas com o vetor *vazio-null*, deve-se considerar as ANOVAs provenientes dos grupos 1, 2 e 3, 4 separadamente. Isso porque, embora as amostras utilizadas sejam as mesmas, o fato de terem sido feitas ANOVAs independentes para E6 (1 e 2) e E7 (3 e 4), resulta em valores diferentes, intrínsecos a análise, que devem ser considerados. Assim, tem-se:

- Para as ANOVAs dos grupos 1 e 2
vazio TNF versus vazio-null (M= 103 e R=231 genes)
- Para as ANOVAs dos grupos 3 e 4
vazio TNF versus vazio-null (M= 107 e R= 142 genes)

Acreditamos que este aumento no número de genes diferencialmente expressos observado nos *rafts* seja devido ao aumento no número de genes expressos neste sistema, quando comparado ao sistema de cultura em monocamada. Neste caso, é esperado que genes relacionados à diferenciação do epitélio, como por exemplo, os genes que codificam para as queratinas entre outros, estejam expressos em queratinócitos cultivados em *raft*, independente da presença dos oncogenes virais.

4.4.2. Comparação entre amostras tratadas e não com TNF no sistema de cultura em monocamada e raft (tabela 4)

Em seguida, comparou-se a expressão gênica global das amostras cultivadas em monocamada e *raft* antes e após o tratamento com TNF.

- em monocamada (figura 30)

A seguir, estão enumerados os valores obtidos para genes diferencialmente expressos determinados a partir da análise de dados provenientes de cultura em monocamada (grupos 1 e 3) para cada uma das amostras utilizadas, tratadas e não com TNF, em relação ao vetor vazio tratado (vazio TNF) e não tratado (vazio-*null*), respectivamente.

E6wt *null versus* vazio-*null* = 4 genes

E7wt *null versus* vazio-*null* = 69 genes

A intersecção entre estas listas não identificou nenhum gene comum.

E6wt TNF *versus* vazio-TNF = 26 genes

E7wt TNF *versus* vazio-TNF = 247 genes

A intersecção destas listas identificou 11 genes comuns, o que nos dá indícios de que o grupo de genes regulado pelo TNF nestas células varia em função da expressão dos genes E6 ou E7.

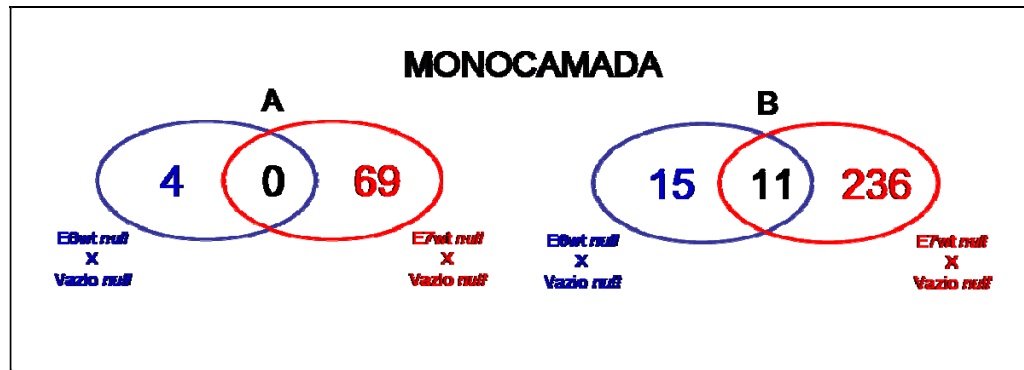


figura 30: Comparação entre E6wt null e E7wt null, não tratado (A) e tratado com TNF (B), em monocamada.

- em raft (figura 31)

Assim como feito para dados provenientes de amostras cultivadas em monocamada, enumeraram-se os valores obtidos para genes diferencialmente expressos identificados a partir da análise de dados provenientes de *raft* (grupos 2 e 4) para cada uma das amostras utilizadas, tratadas e não com TNF, em relação ao vetor vazio tratado (vazio TNF) e não tratado (vazio-*null*), respectivamente. Estes estão descritos a seguir:

E6wt *null* versus vazio- *null* = 90 genes

E7wt *null* versus vazio- *null* = 149 genes

A intersecção entre estas listas identificou 10 genes comuns.

E6wt TNF versus vazio-TNF = 44 genes

E7wt TNF versus vazio-TNF = 262 genes

A intersecção entre estas listas identificou 8 genes comuns.

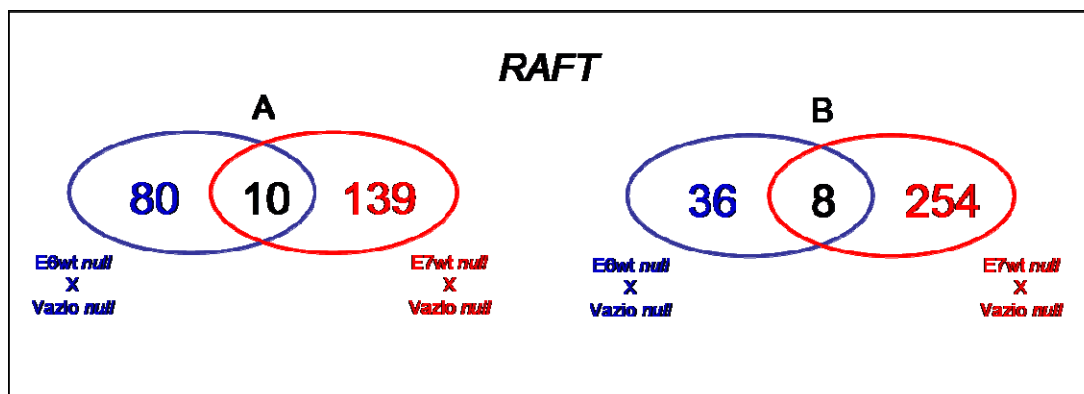


figura 31: Comparação entre E6wt null e E7wt null, não tratado (A) e tratado com TNF (B), em raft.

Embora a intersecção das listas em monocamada apresente um número de genes diferencialmente expressos semelhante aos identificados em *raft*, não existe nenhum gene que esteja representado nestas duas listas. Além disso, observa-se que amostras de PHKs transduzidas com o gene E7 apresentam um número maior de genes diferencialmente expressos, quando comparadas com aquelas que expressam o gene E6. Vale ressaltar, que esta diferença na expressão gênica global é mais intensa quando se leva em conta o tratamento com TNF. Estas observações sugerem uma diferença na resposta ao tratamento com esta citocina nos sistemas de cultura de células utilizados e entre amostras de PHK que expressam os genes E6 ou E7 de HPV16. Conforme descrito anteriormente, PHKs transfectados com o gene E6 selvagem e com o vetor pLXSN vazio são células responsivas ao efeito antiproliferativo do TNF, enquanto que aqueles transfectados com o gene E7 selvagem são resistentes ao efeito antiproliferativo desta citocina.

O TNF promove a inibição reversível da proliferação de queratinócitos normais *in vitro*, efeito este observado através da diferenciação e conseqüente produção de envelope corneificado por estas células (Pillai *et al.*, 1989). Além disso, o TNF é capaz de regular a proliferação de PHKs normais e imortalizados por HPV 16 (Villa *et al.*, 1992; Malejczyk *et al.*, 1994; Vieira *et al.*, 1996).

Esta citocina também foi capaz de inibir a expressão de genes virais em uma linhagem de queratinócitos humanos imortalizada com HPV 16 (Kyo *et al.*, 1994). No entanto, estudos mostram que a proteína E7 de HPV 16 é capaz de conferir resistência ao efeito antiproliferativo do TNF em queratinócitos (Basile *et al.*, 2001). Em 2005, Filippova e colaboradores mostraram que a expressão de baixos níveis de da proteína E6 de HPV16 protege as células do efeito antiproliferativo do TNF, enquanto que altos níveis de expressão desta proteína as sensibilizam (Filippova *et al.*, 2005). Uma possível explicação para a sensibilidade ao TNF observada em nossas amostras transfectadas com E6 de HPV16 está no fato destas expressarem a proteína E6 em altos níveis, por esta estar sob controle de um promotor mais forte do que a LCR de HPV, como já discutido anteriormente.

4.5. ESCOLHA DE GENES:

Para a seleção de genes a serem validados, optou-se por trabalhar apenas com aqueles identificados como diferencialmente expressos pela ANOVA dos grupos 2 e 4, ou seja, as análises provenientes de *rafts* elaborados a partir de PHKs transduzidos com os genes E6 ou E7, selvagens e mutantes. Isso porque, como já discutido anteriormente, o sistema de *raft* é um modelo que mimetiza o programa de diferenciação dos queratinócitos, estando mais próximo do que é observado *in vivo* (Revisado por Chow e Broker, 1997).

Embora tenham sido consideradas as ANOVAs dos grupos 2 e 4 (descritos na tabela 3), aquela proveniente de amostras de PHKs que expressam o gene E7 (grupo 4) apresentou um número muito maior de genes diferencialmente expressos com *FOLD* acima do valor de *cut-off* estabelecido (menor do que -2 ou maior do que 2) e portanto predominam nesta análise. Além disso, nas amostras provenientes do grupo 2, os genes diferencialmente expressos dentro dos padrões pré-estabelecidos, estavam em sua grande maioria relacionadas ao TNF e no geral, também apresentaram expressão diferenciada nas amostras normais. A importância de estes

genes permanecerem na análise está relacionada ao fato do TNF ter um efeito antiproliferativo tanto nas amostras normais como nas que expressam o gene E6, o que não ocorre nas amostras que expressam o gene E7.

O teste *t de student* feito entre amostras que expressam o gene E6 selvagem e o vetor vazio apresentou pouquíssimos genes com *FOLD* acima do *cutoff*. Uma possível explicação para esta expressão global diferenciada mais robusta apresentada por amostras que expressam o gene E7, quando comparadas ao gene E6, está relacionada à capacidade de cada uma destas oncoproteínas em alterar o funcionamento normal do queratinócito.

Diversos estudos demonstraram a capacidade da proteína E6 em interagir com e subsequentemente inativar inúmeras proteínas celulares fundamentais na mediação do processo de apoptose (Bak, p53, C-myc, Procaspase 8, FADD, TNF R1), transcrição de genes supressores de tumor (CBP/p300, E6TP1, hADA3, Gps2, Tuberina), manutenção da organização do epitélio (E6-BP/ERC-55, Fibulina-1, Paxillina, Zyxina), e controle da proliferação celular (hDlg, hScrib, MAGI-1, 2 e 3, PATJ, PTPN3) (Revisado por Tungteakkhun e Duerksen-Hughes, 2008). No entanto, até o momento são conhecidos poucos genes que tem sua expressão alterada pela proteína E6. Entre eles, pode-se citar a indução da atividade do promotor hTERT, que promove um aumento na atividade de telomerase, contribuindo para a imortalização das células epiteliais (Klingelhutz *et al.*, 1996; Gewin e Galloway, 2001; Oh *et al.*, 2001; Veldman *et al.*, 2001; Veldman *et al.*, 2003). Por outro lado, os efeitos de E7 sobre a expressão gênica global de uma célula são muito mais notáveis. Isso porque, esta proteína é capaz alterar a expressão de genes extremamente importantes para o funcionamento normal da célula. Um bom exemplo a ser citado, é a capacidade de E7 inativar a proteína pRb e conseqüentemente modular a transcrição de genes envolvidos na regulação do ciclo celular, tal

como o promotor de E2F, um importante fator de transcrição (Cheng *et al.*, 1995b; Hwang *et al.*, 2002).

A atividade biológica das oncoproteínas E6 e E7 é dependente do tipo de célula onde são expressas. Estas proteínas são suficientes para transformar fibroblastos de roedores (Vousden *et al.*, 1988; Bedell *et al.*, 1989). No entanto, a expressão da proteína E7 leva a imortalização de queratinócitos humanos normais, enquanto que E6 necessita de eventos adicionais para induzir o mesmo efeito (Halbert *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1999). Além disso, a oncoproteína E7 evita que as células em processo de diferenciação parem de proliferar, através da ativação da expressão de fatores celulares necessários à replicação viral. A presença de E7 leva a retenção do núcleo nas camadas superiores, situação incomum ao epitélio normal (Revisado por Longworth e Laimins, 2004). Vale ressaltar, que a expressão destas proteínas, principalmente a sua cooperação, é fundamental para a progressão e manutenção do fenótipo imortalizado ou maligno, visto que a inibição da expressão *in vitro* destas proteínas, promove a inibição da proliferação celular e em alguns casos a reversão do fenótipo maligno ou imortalizado (Barbosa e Schlegel, 1989; Howley *et al.*, 1989; Zur Hausen, 2000).

Na tabela 5 e tabela 6 estão representados os genes diferencialmente expressos com *FOLD* menor do que -2 ou maior do que 2 e $p\text{-valor} < 0.05$, identificados na comparação entre amostras de culturas organotípicas de queratinócitos normais e amostras de culturas de queratinócitos transduzidos com o gene E7 selvagem, quando tratados e não com TNF, respectivamente.

tabela 5: genes diferencialmente expressos com *FOLD* menor do que -2 ou maior do que 2 e p valor menor do que 0.05, identificados na comparação entre amostras de culturas organotípicas de queratinócitos normais e amostras de culturas de queratinócitos transduzidos com o gene E7 selvagem

gene	description	PHKvsE7	
		p-value	fold
ASAH1	N-acylsphingosine amidohydrolase (acid ceramidase) 1	0,049	2,21
ATPBD1C	ATP binding domain 1 family, member C	0,002	-2,17
BST2	bone marrow stromal cell antigen 2	0,016	2,88
C11orf57	chromosome 11 open reading frame 57	0,001	2,38
C14orf130	chromosome 14 open reading frame 130	0,001	-2,43
CAMP	cathelicidin antimicrobial peptide	0,012	4,16
CAT	catalase	0,025	4,65
CCDC14	coiled-coil domain containing 14	0,028	-2,37
CCHCR1	coiled-coil alpha-helical rod protein 1	0,001	-2,72
CCNA2	cyclin A2	0,010	-2,64
CCNB2	cyclin B2	0,034	-2,14
CDKN1B	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)	0,031	-2,87
CYP2J2	cytochrome P450, family 2, subfamily J, polypeptide 2	0,030	3,33
DDX39	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 39	0,025	-2,32
DEK	DEK oncogene (DNA binding)	0,005	-4,35
ENOSF1	enolase superfamily member 1	0,047	-2,52
EPHB6	EPH receptor B6	0,026	2,14
FAM129A	family with sequence similarity 129, member A	0,019	-4,33
FAM50A	family with sequence similarity 50, member A	0,040	-2,32
FUS	fusion (involved in t(12;16) in malignant liposarcoma)	0,013	-2,72
HADH	hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase	0,017	-2,15
HAT1	histone acetyltransferase 1	0,006	-2,08
HMGB2	high-mobility group box 2	0,017	-8,67
IFI44	interferon-induced protein 44	0,000	5,68
IFI44L	interferon-induced protein 44-like	0,000	4,09

tabela 6: genes diferencialmente expressos com FOLD menor do que -2 ou maior do que 2 e p valor menor do que 0.05, identificados na comparação entre amostras de culturas organotípicas de queratinócitos normais e amostras de culturas de queratinócitos transduzidos com o gene E7 selvagem, tratados com TNF.

gene	descrição	PHK_TNFvsE7_TNF	
		p-valor	fold
ASAH1	N-acylsphingosine amidohydrolase (acid ceramidase) 1	0,01	2,86
BRI3BP	BRI3 binding protein	0,00	-2,38
BTBD6	BTB (POZ) domain containing 6	0,00	-2,22
C14orf130	chromosome 14 open reading frame 130	0,02	-2,17
CAST	calpastatin	0,00	2,66
CCHCR1	coiled-coil alpha-helical rod protein 1	0,00	-3,25
CCL20	chemokine (C-C motif) ligand 20	0,03	3,39
CCNA2	cyclin A2	0,03	-2,32
CCNB2	cyclin B2	0,04	-2,16
CDCA4	cell division cycle associated 4	0,04	-2,50
CDKN1B	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)	0,04	-2,11
CENPF	centromere protein F, 350/400ka (mitosin)	0,00	-2,51
CLCA4	chloride channel, calcium activated, family member 4	0,00	12,40
COASY	Coenzyme A synthase	0,00	-2,43
CXXC1	CXXC finger 1 (PHD domain)	0,01	-2,24
DDX21	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 21	0,03	2,04
DDX39	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 39	0,01	-3,10
DEK	DEK oncogene (DNA binding)	0,00	-4,47
ENOSF1	enolase superfamily member 1	0,00	-2,69
ETS2	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2 (avian)	0,03	-2,78
FAM129A	family with sequence similarity 129, member A	0,01	-4,21
FAM38A	family with sequence similarity 38, member A	0,01	-2,79
FAM50A	family with sequence similarity 50, member A	0,00	-2,30
FANCI	Fanconi anemia, complementation group I	0,02	-2,26
FUS	fusion (involved in t(12;16) in malignant liposarcoma)	0,01	-5,31

A fim de elucidar a relevância biológica dos genes diferencialmente expressos identificados e diminuir a taxa de falsos positivos na escolha dos genes a serem validados, foi feita uma análise baseada em ontologia gênica (GO) (p-valor < 0.05, teste hipergeométrico e genoma humano como lista de referência), após a análise do FOLD (maior que 2 e menor do que -2) e p-valor < 0.05. Foram identificados genes associados a diversos processos biológicos relevantes, tais como regulação da proliferação celular (INHBA, PCNA, MCM2, RASSF5, MYC, CYR61, SERPINF1, IL6, CYLD), diferenciação celular (PTGS1, LPIN1, INHBA, KLK6, KRT5, IL6, ELF3, KLK2, NDRG1, SPATA2), transdução de sinais (CSNK1D, TRIB3, RASSF5, GNAZ, RND3, ADORA2B), regulação da resposta inflamatória e da transcrição (S100A8, IL1B, JMJD1C, TRIB3, MCM2, SLC43A3) e metabolismo de ácidos nucléicos (CSNK1D, NT5E, ELN, TK1, ATP1F1, CSNK1D, PCNA) entre outros. Em seguida, foi feita uma busca literária de cada um dos genes escolhidos, a fim de estabelecer uma relação biológica com as amostras analisadas.

A seguir, estão listados os genes escolhidos para validação, com suas respectivas funções, além dos *FOLDS* obtidos através da comparação dois a dois (*teste t de student*), em cada uma das amostras (tabela 7).

tabela 7: genes diferencialmente expressos com FOLD menor do que -2 ou maior do que 2 e p valor menor do que 0.05, identificados na comparação entre amostras de culturas organotípicas e escolhidos para validação por PCR em Tempo Real

Símbolo	Nome do gene	Função
INHBA	<i>Inhibin β A</i>	Inibidor da secreção de FSH pituitária. Regula negativamente a proliferação das células do estroma das gônadas e tem atividade supressora de tumor
DEK	<i>DEK oncogene (DNA binding)</i>	Oncogene DEK
CXCL2	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 2</i>	Atividades mitogênicas, quimiotáticas e inflamatórias
MCM2	<i>Minichromosome Maintenance Complex 2</i>	Regulação da replicação do DNA em eucariotos
MCM5	<i>Minichromosome Maintenance Complex 5</i>	
TCN1	<i>Transcobalamin I (vitamin B12 binding protein)</i>	Proteína que se liga a vitamina B12
CCL20	<i>chemokine (C-C motif) ligand 20</i>	Atividades mitogênicas, quimiotáticas e inflamatórias
IFI44	<i>interferon-induced protein 44.</i>	Atividades pró-inflamatórias
HMG2	<i>High-Mobility Group Box 2</i>	Apresenta um papel crucial em diversos eventos nucleares importantes, incluindo transcrição, replicação do DNA e recombinação
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>	Gene de expressão constitutiva, utilizado como controle positivo

- SÍNTESE DE cDNA (RT) E PCR EM TEMPO REAL

Depois de definido o grupo de genes de interesse, o passo seguinte é a validação experimental dos mesmos que foi feita utilizando a técnica de PCR em Tempo Real. Para isso, foi necessário o desenho de pares de iniciadores para cada um dos genes escolhidos, além da síntese de cDNA, a partir dos RNAs totais provenientes das amostras analisadas. A tabela 8 representa os pares de iniciadores desenhados e as características intrínsecas a cada um deles.

tabela 8: Descrição das características intrínsecas aos pares de iniciadores desenhados para experimento de PCR em tempo real

Gene	<i>Forward Sequence</i>	<i>Forward Length</i>	<i>Forward TM</i>	<i>Forward % GC</i>
INHBA	GGAGCAGACCTCGGAGATCA	20	59	60
DEK	CCC GCGTCCGAGAAAGA	17	59	65
CXCL2	GAATTCACCTCAAGAACATCCAAA	24	58	38
MCM2	GGCCACAACGTCTTCAAGGA	20	60	55
MCM5	CGTGTGGCAATCCACGAA	18	59	56
TCN1	TTCAGGGCCTATGTGCCAA	19	59	53
CCL20	GCTCTGGCTGCTTTGATGT	20	59	55
IF44	TACCAGTTTAATCCCATGGAATCA	24	58	38
HMGB2	ACGTTCTCCCAAAGGTGATAA	22	58	45
GAPDH	GTCCACTGGCGTCTTCACCA	20	60	60

Gene	<i>Reverse Sequence</i>	<i>Reverse Length</i>	<i>Reverse TM</i>	<i>Reverse % GC</i>
INHBA	CAGCGTCTTCCTGGCTGTTC	20	60	60
DEK	TTGCCTTCCACGATGAGACTC	20	69	70
CXCL2	AGCTTTCTGCCCATTTGAGT	25	69	56
MCM2	ATAGTTCACCACCAGGCTCTCAC	23	58	52
MCM5	AGCGGCCGAACACTGAGTT	19	59	58
TCN1	TTGCGGACAACGTAACCAG	22	59	50
CCL20	GAATACGGTCTGTGTATCCAAGACA	25	58	44
IF44	CAAATACAAATGCCACACAATGAA	24	58	33
HMGB2	AGGCAGATGGTGGCCTTTT	19	58	53
GAPGH	GTGGCAGTGATGGCATGGAC	20	60	60

Gene	<i>Amplicon TM</i>	<i>Amplicon %GC</i>	<i>Amplicon TA</i>	<i>Amplicon Length</i>
INHBA	84	59	61	58
DEK	83	58	61	122
CXCL2	81	52	59	101
MCM2	82	54	60	72
MCM5	85	62	62	121
TCN1	80	51	59	100
CCL20	81	52	59	101
IF44	74	36	55	100
HMGB2	80	50	59	72
GAPDH	83	55	60	261

A eficiência da transcrição reversa foi confirmada por PCR não quantitativo (figura 32). A fim de identificar uma possível contaminação do cDNA sintetizado com DNA genômico, esta PCR foi feita para todas as amostras, utilizando um par de iniciadores, que amplifica um gene humano

de expressão constitutiva (BIRC-2 (Baculoviral IAP repeat-containing protein 2)), desenhado em éxons diferentes. Assim, a banda correspondente ao cDNA apresenta 323pb, enquanto que aquela correspondente ao DNA genômico apresenta 523pb, pois neste último ocorre também a amplificação de íntrons.

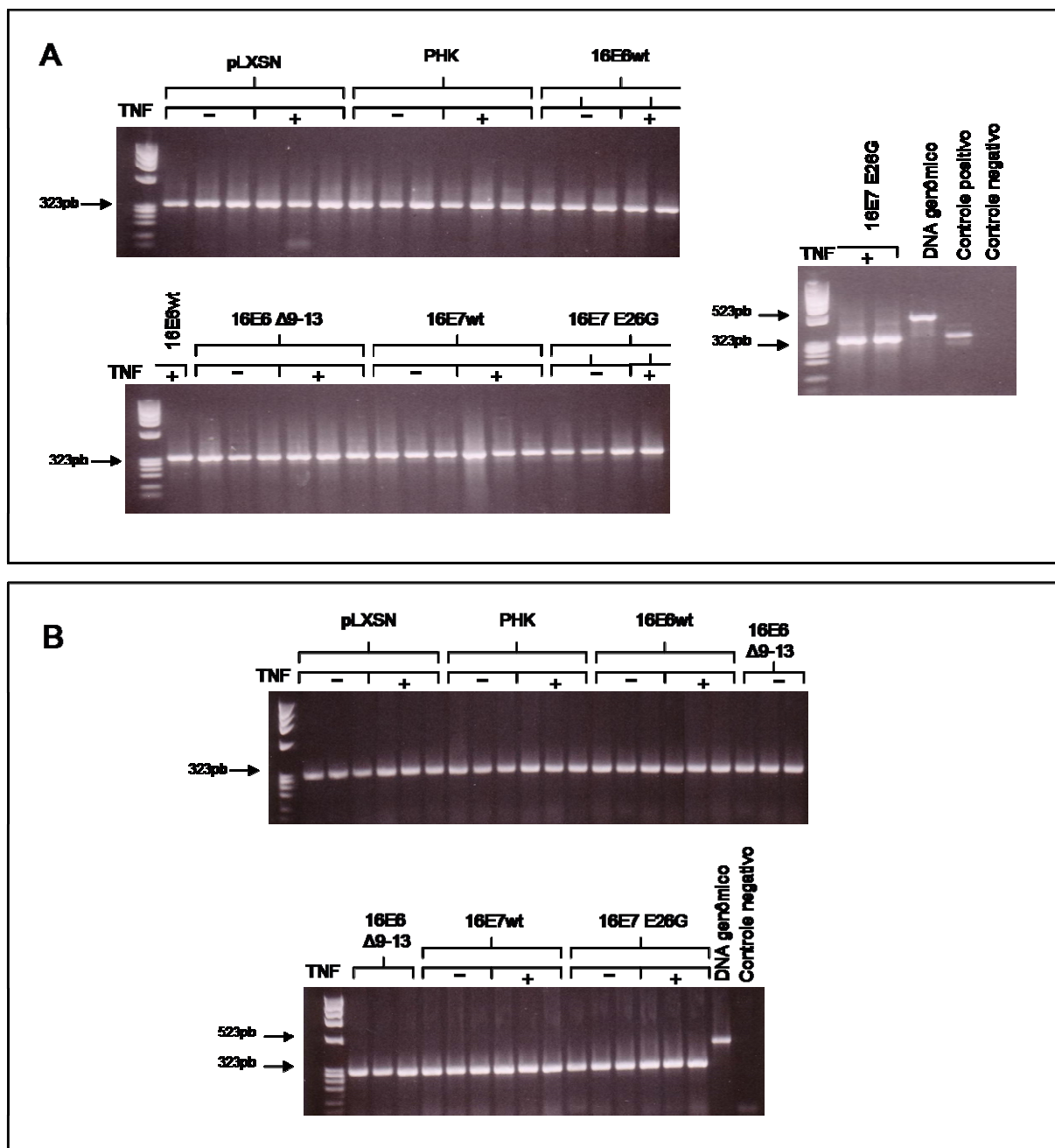


figura 32: Análise em gel de agarose 1% da PCR, utilizando iniciador do gene de expressão constitutiva (BIRC-2), a fim de confirmar a presença de cDNA sintetizado por RT. A- amostras provenientes de cultura em monocamada; B- amostras provenientes de cultura em *raft*.

A figura 32 mostra que a síntese de cDNA foi eficiente, pois todas as amostras amplificaram e nenhuma apresentou contaminação com DNA genômico. Deste modo, foi possível prosseguir para a etapa de padronização do PCR em Tempo Real, que consiste na padronização da quantidade de amostra e da concentração de iniciadores a serem utilizados.

A concentração ideal dos pares de oligonucleotídeos iniciadores foi determinada através de reações idênticas de amplificação, utilizando 10nM de cDNA, porém com quantidades crescentes do iniciador, variando de 100 a 800nM. Esta concentração ideal foi identificada com base na situação onde não ocorre a formação de dímeros e onde a amplificação é mais robusta, ou seja, considerando a utilização da menor concentração possível de iniciadores, que corresponde ao menor *Cycle Threshold* (CT) de amplificação. Em todos os casos, a concentração de iniciador ideal para amplificação foi igual a 400nM.

A eficiência de amplificação de cada um dos pares de iniciadores foi mensurada através de reações feitas com a concentração ideal de cada um deles, utilizando diluições seriadas de cDNA (100nM; 10nM; 1nM; 0.1nM e 0.01nM), em duplicatas. Para o cálculo da eficiência utilizou-se a fórmula: $\text{eficiência} = 10^{-1/\text{slope}}$, na qual o *slope* representa o grau de inclinação da regressão linear obtida a partir da curva padrão dos Cts destes 5 pontos (Pfaffl, 2001).

Após esta padronização foram feitas reações para cada um dos genes a serem avaliados. Estas foram feitas em triplicatas, e para cada gene utilizou-se um controle negativo, sem DNA. A concentração de cDNA utilizada foi de 10ng em todos os casos, e as concentrações de iniciadores 400nM. Os valores de eficiência obtidos foram utilizados no cálculo da diferença de expressão entre cada um dos diferentes grupos de amostras utilizados, como descrito em detalhes nos itens 15.1.2.1 e 15.1.2.2 do Material e Métodos. O cálculo do *FOLD* foi feito por

expressão relativa às amostras provenientes de PHK normal transfectadas com o vetor pLXSN vazio, conforme método descrito por Pfaffl em 2001 (Pfaffl, 2001). A seguir, estão descritos os genes analisados por PCR em tempo real, no grupo de amostras determinado.

- TCN1 (Transcobalamin I (vitamin B12 binding protein, R binder family))

Membro da família das proteínas que se ligam a vitamina B12, denominada ligante de R (Grasbeck, 1969), a proteína TCN1 é encontrada em grânulos secundários de neutrófilos maduros.

Todas as células vivas necessitam de vitamina B12 (cobalamina) para sobreviver. Antes de ser utilizada pelas células, as cobalaminas devem ser metabolizadas em compostos biologicamente ativos, denominados metilcobalaminas ou adenosilcobalaminas. Em humanos, estes cofatores são usados em dois sistemas enzimáticos: (1) Metionina sintetase: utiliza metilcobalamina para produzir metionina a partir de homocisteína; (2) Metilmalonil-CoA mutase: utiliza adenosilcobalamina, como coenzima para entrar no ciclo do ácido tricarbóxico (Revisado por Volkov, 2008).

Assim, células em proliferação necessitam de um aumento na demanda de cobalaminas, como precursores de metionina e timidina. Os mamíferos suprem a necessidade de cobalaminas através da alimentação, no entanto, esta é uma fonte que disponibiliza quantidades extremamente pequenas deste composto. Por este motivo, sua reabsorção é extremamente importante e está intimamente relacionada à associação de cobalaminas com proteínas transportadoras solúveis presentes na circulação, chamadas transcobalaminas I (TCN1), Fator intrínseco (IF) e transcobalaminas II (TCN2) e seus receptores celulares correspondentes. A

homeostase de cobalaminas envolve um transporte adequado através do estômago das mesmas ligadas a TCN1, com subsequente liberação das cobalaminas no intestino, onde são imediatamente ligadas ao IF e transportadas pelo epitélio intestinal até o sangue, sob a forma de um complexo IF-Cbl (Banerjee, 1999).

Sabe-se que cofatores, como, por exemplo, estado nutricional podem ter influência sobre a progressão da infecção inicial por HPV a uma displasia cervical. Em 2000, Alberg e colaboradores apresentaram evidências da existência de uma relação entre a ingestão de vitaminas B e o câncer cervical (Alberg *et al.*, 2000). Um estudo realizado por Sedjo e colaboradores indica que altos níveis de vitamina B12 circulante reduzem o risco de persistência do HPV, sugerindo um papel desta vitamina na prevenção dos eventos precursores da carcinogênese cervical (Sedjo *et al.*, 2002). Um estudo caso-controle com mulheres havaianas, realizado em 2003 por Hernandez e colaboradores, também mostra um papel protetor desta vitamina no desenvolvimento do câncer cervical. Neste trabalho, os autores apresentam uma possível redução das lesões cervicais pré-malignas como consequência da ingestão de grandes quantidades deste nutriente (Hernandez *et al.*, 2003). Mais recentemente, Kwanbunjan e colaboradores analisaram os níveis de vitamina B12 no soro de mulheres tailandesas com esfregaço citologicamente normal e com displasia cervical de grau baixo e alto. Este estudo indicou uma relação entre baixos níveis de vitamina B12 e o aumento no risco de desenvolvimento de câncer de colo de útero (Kwanbunjan *et al.*, 2006).

Ao analisarmos os dados de diferença de expressão gênica proveniente dos experimentos de *Microarray*, observamos uma regulação negativa do gene TCN1 nas amostras de PHKs transduzidas com o gene E7 selvagem de HPV16, independente do tratamento com TNF (figura 33).

Os dados obtidos por PCR em Tempo Real, não só confirmaram esta regulação negativa nestas amostras, como também naquelas amostras que expressam o gene E6 (figura 34). Vale ressaltar, que esta diminuição na expressão do gene TCN1 é mais significativa nas amostras transduzidas com E7 do que com E6. Esta regulação negativa pode ter um papel importante na regulação dos níveis de vitamina B12 circulante. A diminuição nos níveis da proteína TCN1, uma das responsáveis pela reabsorção da vitamina B12, através do transporte desta para a circulação, pode influenciar na entrada desta nas células e consequentemente alterar sua atuação como agente anti-tumoral.

RAFT			
symbol	description	p valor	FOLD
	E7wt/pLXSN		
TCN1	transcobalamin I (vitamin B12 binding protein, R binder family)	0.03	-10.09
	E7wt TNF/pLXSN		
TCN1	transcobalamin I (vitamin B12 binding protein, R binder family)	0.04	-9.19
	E7wt TNF/pLXSN TNF		
TCN1	transcobalamin I (vitamin B12 binding protein, R binder family)	0.04	-12.56

figura 33: Valores de FOLD e p valor, obtidos a partir dos testes *t de student* para o gene TCN1, feitos com base nos dados provenientes da ANOVA do grupo 4, em cada uma das diferentes comparações 2 a 2.

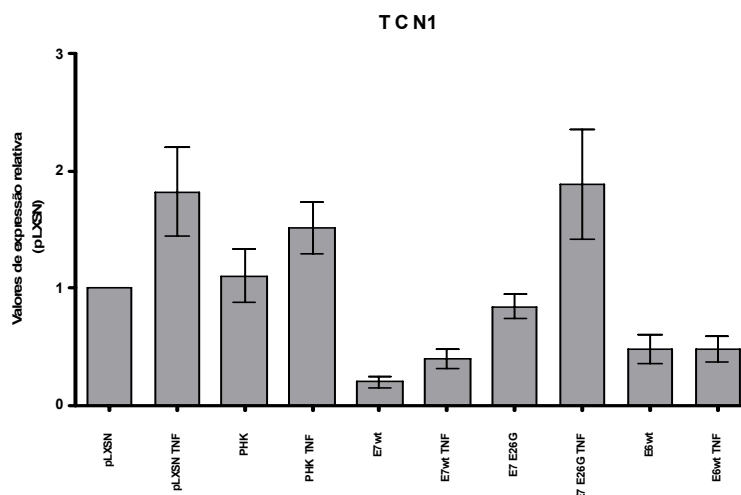


figura 34: Dados de expressão gênica e TCN1 obtidos a partir de PCR em Tempo Real

QUIMIOCINAS

As quimiocinas são proteínas solúveis, de peso molecular pequeno (6-14kDa) que se ligam a receptores específicos, acoplados a proteína G (GPCRs), desencadeando uma resposta celular, geralmente migração direcional ou quimiotaxia (Rot e Von Andrian, 2004).

Existem aproximadamente 50 quimiocinas e apenas 20 receptores de quimiocinas, existindo, portanto uma redundância neste sistema de interação ligante/receptor. Uma grande variedade de patógenos (como vírus e protozoários) de mamíferos exploram as vias de ligante/receptor para quimiocinas como meio de infectar o hospedeiro e/ou evitar seu reconhecimento pelo sistema imune.

Baseado na posição de dois resíduos de cisteína conservados na região N-terminal deste grupo de proteínas, elas são classificadas em quatro grupos: CXC, CC, CX3C e C (Baggiolini *et al.*, 1997; Luster, 1998; Rossi e Zlotnik, 2000; Zlotnik e Yoshie, 2000). A porção N-terminal é importante para a interação das quimiocinas com os leucócitos, enquanto a porção C-terminal

tem alta afinidade por glicosaminoglicanas e outras moléculas negativamente carregadas; assim, as quimiocinas se ligam fortemente à superfície das células endoteliais e às glicoproteínas da matriz extracelular, estabelecendo um gradiente que direciona os leucócitos para os locais inflamados. Além de mediar os processos de inflamação e maturação de linfócitos T, alguns trabalhos descreveram certas quimiocinas ligadas à angiogênese (IL-8, ENA-78 e GRO α , β e γ), enquanto outras parecem ser angiostáticas (PF4, IP-10 e MIG) (Opdenakker e Van Damme, 2004). Como a angiogênese é importante para o processo de crescimento tumoral, o papel das quimiocinas angiogênicas e angiostáticas têm sido estudado em vários modelos de neoplasias; alguns mostraram que antagonistas das quimiocinas da subfamília CXC podem ser usadas para o tratamento de câncer, enquanto os agonistas poderiam promover a cicatrização (Rottman, 1999).

Analisando as listas de genes identificados como diferencialmente expressos pela ANOVA, observamos uma superexpressão dos genes CCL20 e CXCL2, nas amostras tratadas com TNF (figura 35).

RAFT			
símbolo	descrição	p valor	FOLD
	E6wt TNF/pLXSN		
CCL20	chemokine (C-C motif) ligand 20	0.00	8.08
CXCL2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	0.02	7.65
	pLXSN TNF/pLXSN		
CCL20	chemokine (C-C motif) ligand 20	0.00	8.16
CXCL2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	0.03	5.99
	E7wt TNF/pLXSN		
CCL20	chemokine (C-C motif) ligand 20	0.02	2.41
	E7wt TNF/pLXSN TNF		
CCL20	chemokine (C-C motif) ligand 20	0.03	-3.39
	pLXSN TNF/pLXSN		
CCL20	chemokine (C-C motif) ligand 20	0.00	8.16
CXCL2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	0.03	5.99

figura 35: Valores de FOLD e p valor, obtidos a partir dos testes *t de student* para o gene CCL20, feitos com base nos dados provenientes da ANOVA do grupo 4, em cada uma das diferentes comparações 2 a 2.

- CCL20 (chemokine (C-C motif) ligand 20)

A proteína CCL20 é uma quimiocina do tipo-CC expressa constitutivamente em pulmão e fígado (Hieshima *et al.*, 1997), em queratinócitos da pele (Charbonnier *et al.*, 1999), e na mucosa intestinal (Tanaka *et al.*, 1999; Cook *et al.*, 2000; Iwasaki e Kelsall, 2000). Esta proteína é a única quimiocina ligante do receptor CCR6 e não mostra a inespecificidade de ligação característica de outras quimiocinas (Liao *et al.*, 1997; Power *et al.*, 1997). Esta proteína não só desencadeia a resposta imune inata através da atração de células NK (Al Aoukaty *et al.*, 1998), mas também está envolvida na resposta imune adaptativa, primeiramente por atração de células dendríticas imaturas, permitindo que elas utilizem antígenos exógenos e amadureçam (Campbell *et al.*, 1998; Dieu *et al.*, 1998), e atraindo células T e B de memória para o sítio de inflamação (Hieshima *et al.*, 1997; Liao *et al.*, 1999; Liao *et al.*, 2002).

Além disso, a proteína CCL20 tem atividade antibiótica similar às defensinas, as quais também interagem com CCR6 e, portanto, podem contribuir diretamente com as defesas contra microorganismos. A expressão de CCL20 também tem sido descrita em muitas linhagens de células de leucemia/linfoma, e em uma variedade de neoplasias, como o adenocarcinoma coloretal, carcinoma pulmonar, e glioma maligno (Rossi *et al.*, 1997; Kimura *et al.*, 2002).

Diferentes estudos têm observado a secreção de quimiocinas em muitos cânceres, promovendo a infiltração do tumor por células dendríticas. A proteína CCL20 produzida por células neoplásicas em carcinoma pancreático, câncer renal, carcinoma de mama e carcinoma de tireóide papilar atrai células dendríticas que expressam CCR6 (Allavena *et al.*, 2000). Além disso, foi observado que a superexpressão da proteína CCL20 atrai um número massivo de células dendríticas que ativam células T citotóxicas tumor específicas (Fushimi *et al.*, 2000).

Como consequência de uma infecção microbiana, quimiocinas são secretadas pela epiderme, dando início à resposta imune adaptativa, principalmente através do recrutamento de células dendríticas. Estas são células apresentadoras de antígeno que têm um papel crucial na captura de antígenos e estimulação de linfócitos T. Dentre as quimiocinas secretadas pela epiderme, CCL20, é a mais potente para atrair precursores das células de Langerhans (células dendríticas que residem na epiderme) e para células dendríticas da derme, tendo uma forte ação quimiotática por células dendríticas imaturas na epiderme (que expressam o receptor CCR-6) e geralmente é detectada nas camadas mais diferenciadas do epitélio (camada espinosa) (Tohyama *et al.*, 2001; Schutyser *et al.*, 2003).

A proteína CCL20 é reconhecidamente induzida por TNF, IL-1 alfa ou beta em células de carcinomas escamosos orais (Abiko *et al.*, 2003), epitélio intestinal (Dieu-Nosjean *et al.*, 2000; Izadpanah *et al.*, 2001) e queratinócitos (Nakayama *et al.*, 2001; Tohyama *et al.*, 2001).

Em lesões de baixo e alto grau da cérvix uterina, além dos carcinomas originados destas, encontra-se um número significativamente reduzido de células de Langerhans (Connor *et al.*, 1999; Hubert *et al.*, 2005), sugerindo uma diminuição da vigilância do sistema imune neste tipo de lesão. Em 2005, Guess e McCance mostraram uma diminuição na secreção de CCL20 em queratinócitos que expressam E6 e E7 de HPV16, após seu tratamento com TNF ou IL-1, quando comparados com o queratinócito normal. Estes dados sugerem que a diminuição desta quimiocina pode estar associada à progressão das lesões de cérvix uterina (Guess e McCance, 2005). Em nossas amostras a expressão do gene CCL20 está aumentada na presença do TNF, tanto em PHKs que expressam os oncogenes virais, quanto em PHKs normais. No entanto, as amostras provenientes de PHKs tranfectados com os genes E6 ou E7 de HPV16 apresentam níveis de expressão de CCL20 após o tratamento, significativamente menor do que o apresentado pelas células normais (figura 35 e figura 36). Estes dados corroboram com aqueles descritos por Guess e McCance, em 2005.

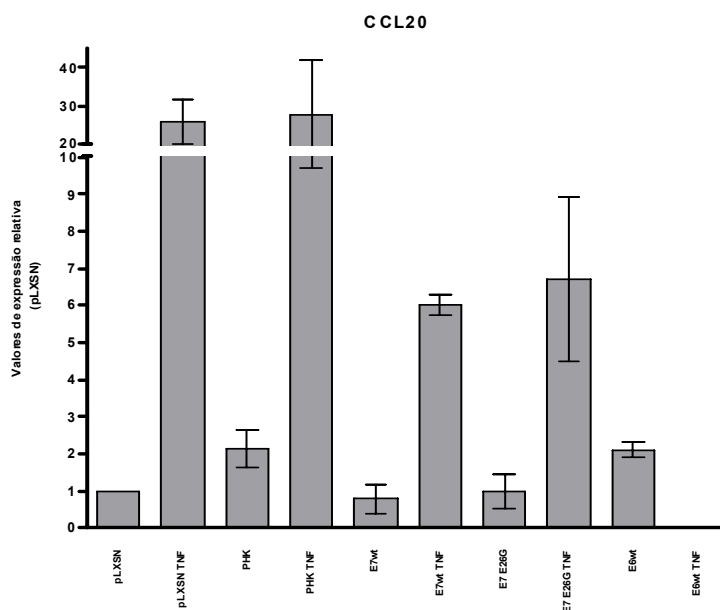


figura 36: Dados de expressão gênica de CCL20 obtidos a partir de PCR em Tempo Real

- CXCL2 (chemokine (C-X-C motif) ligand 2) – 6 kDa

As quimiocinas do grupo CXC podem ser sub-classificadas em quimiocinas ELR+ ou ELR-, baseado na presença ou ausência do motivo ELR (glu-leu-arg) precedendo a seqüência CXC. CXCL2 é uma quimiocina CXC ELR+ (Strieter, Polverini, Kunkel, Arenberg, Burdick, Kasper, Dzuiba, Van Damme, Walz e Marriott, 1995). Evidências recentes sugerem que quimiocinas do grupo das CXC com motivo ELR estimulam a migração de células endoteliais, proliferação, e angiogênese *in vivo*, ao contrário daquelas que não apresentam este motivo e inibem estes eventos biológicos (Strieter, Polverini, Kunkel, Arenberg, Burdick, Kasper, Dzuiba, Van Damme, Walz e Marriott, 1995; Moore *et al.*, 1998; Revisado por Vandercappellen *et al.*, 2008). Este motivo ELR parece ser importante para a interação ligante/receptor em neutrófilos (Hebert *et al.*, 1991; Clark-Lewis *et al.*, 1993; Strieter, Polverini, Arenberg *et al.*, 1995; Revisado por Vandercappellen *et al.*, 2008).

A proteína CXCL2, também chamada MIP-2 (macrophage inflammatory protein-2), foi inicialmente identificada como uma proteína pequena, secretada por uma linhagem celular de macrófago de camundongo quando estimulada por LPS (Wolpe *et al.*, 1989).

Quimiocinas CXC se ligam e ativam seus receptores em neutrófilos, linfócitos, células endoteliais e epiteliais. A ligação de uma quimiocina ao seu receptor resulta na migração transendotelial dos leucócitos por interação com selectinas e integrinas. Subsequentemente, os leucócitos infiltram o tecido em resposta ao gradiente de quimiocinas produzido no sítio de inflamação (Revisado por Vandercappellen *et al.*, 2008). A quimiocina CXCL2 se liga especificamente ao receptor CXCR2, que em conjunto com os receptores CXCR4, CCR2 e CCR7 têm um papel importante na tumorigênese e metástase (Zlotnik, 2004). Além disso, o receptor CXCR2 apresenta um papel importante na angiogênese (Revisado por Raman *et al.*, 2007).

Dentre as quimiocinas ELR+ envolvidas na angiogênese, estão CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7 e CXCL8. Estas quimiocinas podem agir diretamente nas células endoteliais por via dos seus receptores cognitivos promovendo migração, invasão e proliferação, mediando o aparecimento de novos vasos (Strieter, Polverini, Kunkel, Arenberg, Burdick, Kasper, Dzuiba, Van Damme, Walz, Marriott *et al.*, 1995). No ano passado, Bièche e colaboradores mostraram que a superexpressão das quimiocinas CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, e CXCL8 em células tumorais de mama não é resultado de amplificação gênica, mas sim do aumento da transcrição gênica. Além disso, estes autores observam que as quimiocinas CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6 e CXCL8 estão presentes em altos níveis em metastases quando comparado com biopsias de tumores de mama de grau I e II (Bièche *et al.*, 2007).

Em nossas amostras a expressão do gene CXCL2 está aumentada na presença do TNF, tanto em PHKs que expressam os oncogenes virais, quanto em PHKs normais (figura 35 e figura 37). Estes dados corroboram com os descritos em 1997 por Tessier e colaboradores, que mostraram que o tratamento com TNF aumenta a expressão da quimiocina CXCL2 *in vivo* (Tessier *et al.*, 1997). No entanto, assim como observado para o gene CCL20, as amostras provenientes de PHKs tranfectados com os genes E6 ou E7 de HPV16 apresentam níveis de expressão de CXCL2 após o tratamento, significativamente menor do que o apresentado pelas células normais, sendo aquela promovida por E6 mais intensa do que a por E7.

O gene CXCL2 é sabidamente um alvo transcricional do fator NFκB (Revisado por Jenner e Young, 2005). Em 2002, Spitkovsky e colaboradores, mostraram que a atividade de NFκB, induzida por TNF é prejudicada pela expressão do oncogenes de HPV (E6 ou E7), sendo este efeito inibitório mais pronunciado em amostras que expressam o gene E7. A proteína E6 não interfere na ligação de NFκB ao DNA, apenas prejudica a transativação dependente deste fator, enquanto que E7 reduz fortemente esta ligação (Spitkovsky *et al.*, 2002). Este autores sugerem que, a supressão da atividade do fator de transcrição NFκB mediada pelos oncogenes virais, contribui para o mecanismo de escape do HPV ao sistema imune.

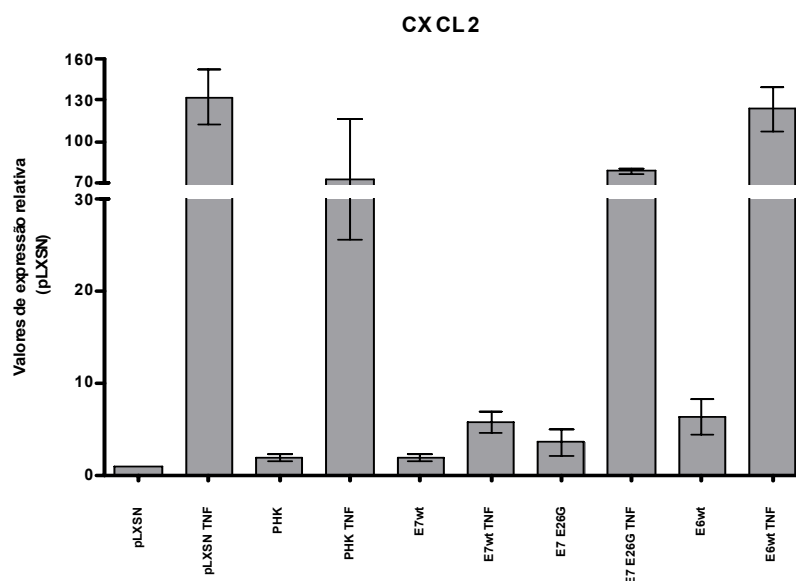


figura 37: Dados de expressão gênica de CXCL2 obtidos a partir de PCR em Tempo Real

-DEK (DEK oncogene (DNA binding))

A proteína DEK humana é uma proteína nuclear, altamente expressa na maioria das células de mamífero (Kappes *et al.*, 2001; Sitwala *et al.*, 2003; Waldmann *et al.*, 2004), originalmente identificada como uma proteína de fusão com a nucleosporina CAN, em um grupo de pacientes com leucemia mielóide aguda (Von Lindern *et al.*, 1990; Von Lindern *et al.*, 1992; Fornerod *et al.*, 1995). A expressão do gene que codifica para a proteína DEK é controlada pelos fatores de transcrição E2F e YY1 (Sitwala *et al.*, 2002; Carro *et al.*, 2006).

Um estudo de homologia mostrou que DEK não apresenta relação com nenhuma família de proteínas conhecida (Waldmann *et al.*, 2004). Muito pouco ainda se sabe sobre a função desta proteína, entretanto estudos têm mostrado que no núcleo, DEK está envolvido com muitos processos dependentes de DNA e RNA, tais como replicação (Alexiadis *et al.*, 2000), reconhecimento do sítio de *splicing* (Soares *et al.*, 2006), e transcrição gênica, podendo funcionar como ativador (Campillos *et al.*, 2003) ou repressor (Faulkner *et al.*, 2001; Hollenbach

et al., 2002; Sammons *et al.*, 2006). Além disso, têm se observado um papel destas proteínas no remodelamento da cromatina (Alexiadis *et al.*, 2000), carcinogênese e doenças autoimunes (Sitwala *et al.*, 2003; Waldmann *et al.*, 2004).

Esta proteína, composta por 375 aminoácidos é atualmente classificada como um proto-oncogene (Devany *et al.*, 2005). Diferentes estudos mostram um aumento da expressão do gene DEK em diversos tipos de tumores, incluindo (Carro *et al.*, 2006), carcinoma hepato-celular (Kondoh *et al.*, 1999), glioblastoma (Kroes *et al.*, 2000), melanoma (Grottke *et al.*, 2000) e várias formas de leucemia (Sitwala *et al.*, 2003), entre outros.

Em nossas amostras a expressão do gene DEK está aumentada nas amostras de PHK transfectadas com o gene E7 selvagem de HPV16, independente do tratamento com TNF (figura 38 e figura 39). Vale ressaltar que também utilizamos um mutante desta proteína (16E7 E26G), incapaz de transformar células de roedor, aumentar a proliferação de PHKs e se ligar à proteína pRb induzindo sua degradação. Não observamos em nossa análise nenhuma alteração na expressão do mRNA para DEK, induzido por este mutante. O que reforça a idéia de que a regulação positiva da expressão de DEK está não só relacionada à presença do gene E7, mas também a sua capacidade de degradar a proteína pRb, liberando o fator de transcrição E2F.

RAFT			
símbolo	descrição	p valor	FOLD
	E7wt/pLXSN		
DEK	DEK oncogene (DNA binding)	0.01	4.35
	E7wt TNF/pLXSN		
DEK	DEK oncogene (DNA binding)	0.00	4.73
	E7wt TNF/pLXSN TNF		
DEK	DEK oncogene (DNA binding)	0.00	4.47

figura 38: Valores de FOLD e p valor, obtidos a partir dos testes *t de student* para o gene DEK, feitos com base nos dados provenientes da ANOVA do grupo 4, em cada uma das diferentes comparações 2 a 2.

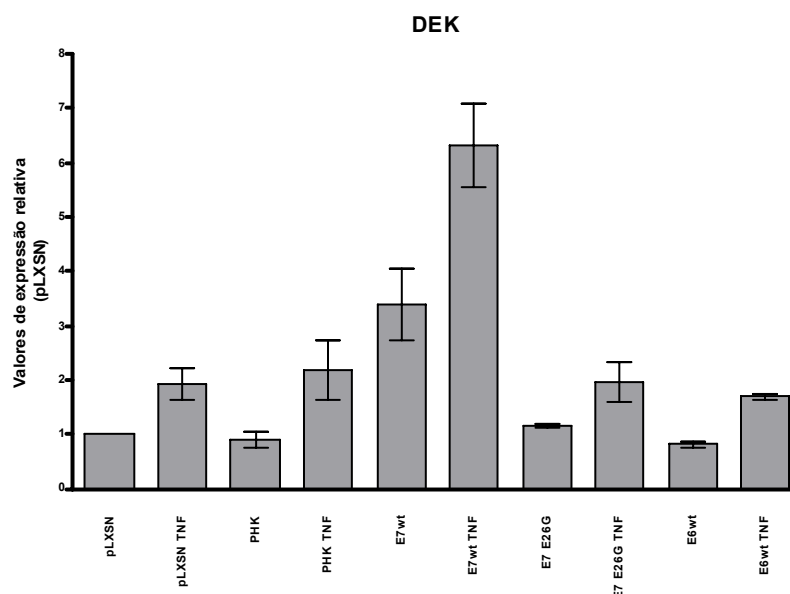


figura 39: Dados de expressão gênica de DEK obtidos a partir de PCR em Tempo Real

Em 2005, Wise-Draper e colaboradores identificaram o proto-oncogene humano DEK como sendo uma molécula envolvida na inibição do processo de senescência e um alvo transcricional da proteína E7 de HPV de alto risco. Interessantemente, o gene DEK foi regulado positivamente pela proteína E7 de HPVs de alto risco, mas não pela proteína E7 de HPVs de baixo risco. Experimentos utilizando fibroblasto de embriões de camundongo (MEFs) deficientes para a proteína pRb demonstraram um papel crítico das proteínas da família Rb no controle da

expressão de DEK basal, assim como na expressão induzida pela proteína E7 de HPV. Considerando que a via de Rb está inativa na grande maioria dos cânceres humanos, estes autores propõem que DEK pode ser útil na clínica como marcador de diagnóstico ou como um potencial alvo de drogas (Wise-Draper *et al.*, 2005).

Além disso, foi observado que níveis elevados de DEK colaboram com a imortalização celular (Sitwala *et al.*, 2002), inibem senescência (Wise-Draper *et al.*, 2005; Wise-Draper *et al.*, 2006) e apoptose (Wise-Draper *et al.*, 2005; Orlic *et al.*, 2006).

Também em 2006, Carro e colaboradores demonstram que o promotor de DEK está sob controle do fator de transcrição E2F e através de análise de Tissue Microarray detectou a superexpressão do RNAm de DEK em vários tumores sólidos, mais notavelmente nos cânceres de bexiga, cólon, laringe e melanoma (Carro *et al.*, 2006).

- HMGB2 - High-Mobility Group Box 2 (23kDa)

A proteína HMGB2 é um dos integrantes do grupo de proteínas de alta mobilidade (HMGB), que contém 2 domínios de ligação ao DNA, denominados HMG-box A e B, e um longo domínio C-terminal ácido (Reeck *et al.*, 1982). Estas proteínas não se ligam a uma seqüência específica do DNA, mas são capazes de distorcê-lo. Estas proteínas, associadas à cromatina ativa, apresentam um papel crucial em diversos eventos nucleares importantes, incluindo transcrição, replicação do DNA e recombinação (Bustin e Reeves, 1996; Costello *et al.*, 1997).

Vários estudos mostram que as proteínas HGMB1 e 2 funcionam como um fator de transcrição (Singh e Dixon, 1990) e estimulam a transcrição *in vitro* (Tremethick e Molloy, 1986; 1988;

Waga, Mizuno *et al.*, 1990; Waga, Shirakawa *et al.*, 1990). Também foi visto que a os níveis endógenos de HMGB2 estão aumentados em células em crescimento exponencial e em células transformadas por vários genes virais e oncogenes (Shirakawa e Yoshida, 1995; Yamazaki *et al.*, 1995). Em 1995, Yamazaki e colaboradores mostraram a repressão da progressão do ciclo celular pela expressão do RNA antisense contra o mRNA de HMGB2 (Yamazaki *et al.*, 1995). Estes resultados sugerem um papel da expressão de HMGB2 na regulação da proliferação celular, fato este, que pode estar intimamente relacionada à superexpressão deste gene nas nossas amostras de PHKs que expressam o gene E7 selvagem de HPV16, independente do tratamento com TNF (figura 40 e figura 41).

RAFT			
símbolo	descrição	p valor	FOLD
	E7wt x pLXSN		
HMGB2	high-mobility group box 2	0.02	8.67
	E7wt TNF x pLXSN		
HMGB2	high-mobility group box 2	0.01	7.95
	E7wt TNF x pLXSN TNF		
HMGB2	high-mobility group box 2	0.01	8.54

figura 40: Valores de FOLD e p valor, obtidos a partir dos testes *t de student* para o gene HMGB2, feitos com base nos dados provenientes da ANOVA do grupo 4, em cada uma das diferentes comparações 2 a 2.

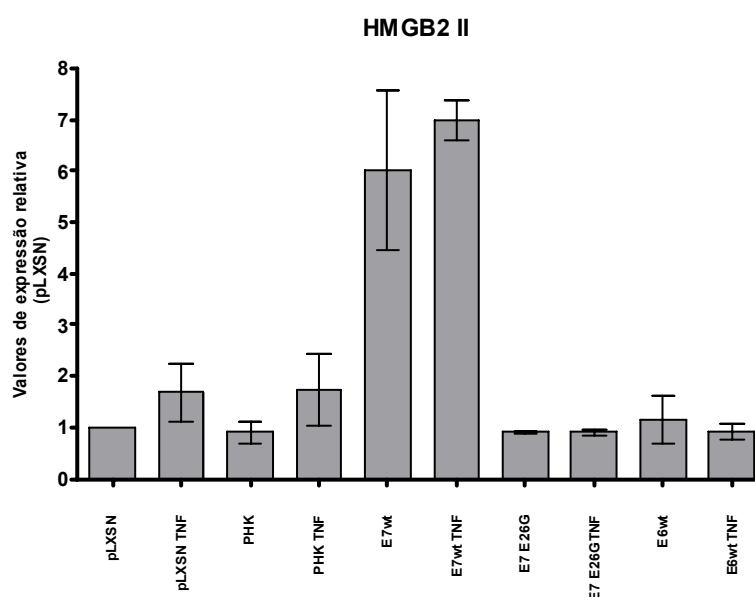


figura 41: Dados de expressão gênica de HMGB2 obtidos a partir de PCR em Tempo Real

- INHBA (*Inhibin β A* ou *activina A*)

Inibinas e activinas, atualmente consideradas membros da superfamília de TGF β (*Transforming Growth Factor β Family*), compartilham as subunidades denominadas β A e β B. As activinas são homo e heterodímeros das subunidades β , enquanto que as inibinas são heterodímeros de uma subunidade denominada α , associada às subunidades β A ou β B. A subunidade α é produzida principalmente por células de Sertoli e a subunidade β por diversos tipos celulares (Tong *et al.*, 2003; Robertson *et al.*, 2004). A activina A (INHBA) é um homodímero de subunidades β A que possui efeito pleiotrópico no organismo (Woodruff, 1998).

Diversos trabalhos têm sugerido um papel da INHBA na indução da resposta inflamatória. A expressão desta foi fortemente induzida na pele após injúria (Hubner e Werner, 1996), no intestino de pacientes com inflamação intestinal (Hubner *et al.*, 1997), e no tecido sinovial de pacientes com artropatias inflamatórias (Yu *et al.*, 1998). Em 1996 Hübner e colaboradores

observaram, em camundongo, a indução da expressão do RNAm de activina, mas não de inibina no primeiro dia após a injúria da pele (Hubner *et al.*, 1996).

Além disso, activinas induzem a diferenciação de células hematopoiéticas (Eto *et al.*, 1987; Nishimura *et al.*, 1991), osteoblastos (Ogawa *et al.*, 1992), e células endócrinas (Sugino *et al.*, 1988; Katayama *et al.*, 1990), e inibem a proliferação de linhagens celulares de gônada (Gonzalez-Manchon e Vale, 1989), hepatócitos (Yasuda *et al.*, 1993), células endoteliais (Mccarthy e Bicknell, 1993), e do epitélio pulmonar (Carcamo *et al.*, 1994). As activinas também modulam a proliferação celular em fibroblastos (Kojima e Ogata, 1989) e células vasculares da musculatura lisa (Kojima *et al.*, 1993).

Em células do estroma, a expressão de INHBA ocorre de forma constitutiva (Yu *et al.*, 1994), e sua expressão basal é aumentada na presença de citocinas próinflamatórias e mitógenos, tais como, interleucina-1 α (IL-1 α) (Shao *et al.*, 1992; Shao *et al.*, 1998), IL-1 β (Takahashi *et al.*, 1992; Yamashita *et al.*, 1992), LPS (Shao *et al.*, 1992; Shao *et al.*, 1998), TNF (Shao *et al.*, 1992; Takahashi *et al.*, 1992; Yamashita *et al.*, 1992; Hubner e Werner, 1996; Shao *et al.*, 1998), entre outros. Experimentos utilizando TNF mostraram que o mecanismo de estimulação de INHBA por esta citocina ocorre através do aumento direto da transcrição do RNAm desta (Shao *et al.*, 1998).

Em câncer, foi visto que a INHBA inibe a proliferação de muitos tipos celulares tumorais humanos, bloqueando a progressão da fase G1 para S (Chen *et al.*, 2002). Além disso, a INHBA parece funcionar como um supressor tumoral nos estágios precoces da tumorigênese (Wakefield e Roberts, 2002). Em 2005, Schramm e colaboradores observaram um papel benéfico importante no aumento da expressão de INHBA em neuroblastoma humano (Schramm

et al., 2005). A expressão desta proteína pode variar consideravelmente dependendo dos tecidos analisados, como por exemplo, tecido gonadal quando comparados à outros tecidos extra-gonadais. Por este motivo, propõe-se na literatura que esta proteína atue como hormônio e como fator de crescimento e diferenciação (Lopez *et al.*, 1999; Bilezikjian *et al.*, 2006).

Em nossas amostras a expressão do gene INHBA está diminuída nas amostras de PHK transfectadas com o gene E7 selvagem de HPV16 e aumentada em todas as amostras quando tratadas com TNF (figura 42 e figura 43), corroborando os dados obtidos por outro trabalho de nosso grupo, no qual observou-se uma diminuição na expressão da INHBA em linhagens celulares de queratinócitos imortalizados por HPV16 ou 18, quando comparados aos queratinócitos normais (PHK). Além disso, foi visto que este gene foi induzido pelo tratamento com TNF por 60 horas nas três linhagens celulares analisadas (Termini *et al.*, 2008).

RAFT			
símbolo	descrição	p valor	FOLD
	E6wt TNF/pLXSN TNF		
INHBA	inhibin, beta A (activin A, activin AB alpha polypeptide)	0.03	-1.85
	pLXSN/pLXSN TNF		
INHBA	inhibin, beta A (activin A, activin AB alpha polypeptide)	0.05	-2.32

figura 42: Valores de FOLD e p valor, obtidos a partir dos testes *t de student* para o gene INHBA, feitos com base nos dados provenientes da ANOVA do grupo 4, em cada uma das diferentes comparações 2 a 2.

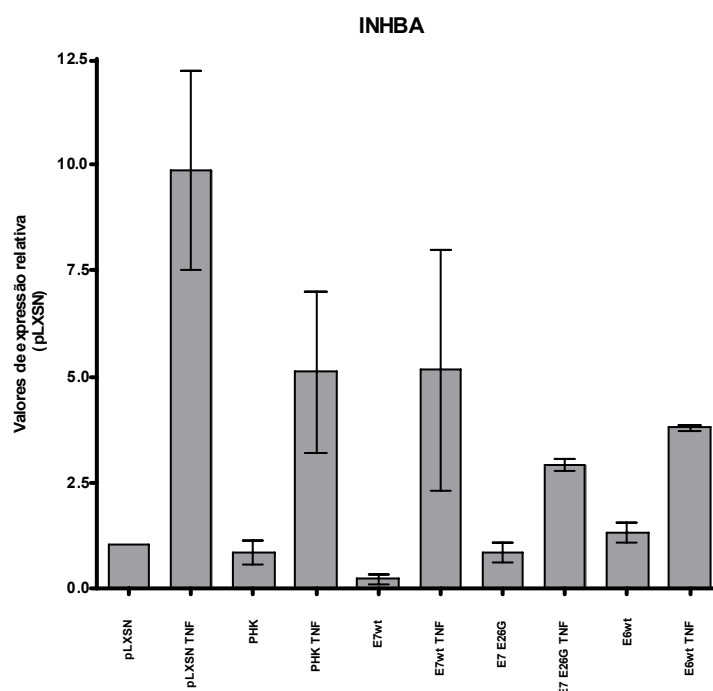


figura 43: Dados de expressão gênica de INHBA obtidos a partir de PCR em Tempo Real

- MCM (Minichromosome Maintenance Complex)

A replicação do DNA em eucariotos é altamente regulada por processos que envolvem um grande número de fatores, estando no centro deste processo proteínas da família MCM que se localizam nas origens de replicação. Apesar de sua importância na replicação e no desenvolvimento do câncer, o seu mecanismo de ação ainda é pouco conhecido. Todas as células eucarióticas possuem 6 proteínas homólogas (MCM2-MCM7) que formam um heterohexâmero. Todas elas, pertencem à família das ATPases associadas com várias atividades celulares (proteínas AAA+) e compartilham similaridades com outras helicases. Apesar das proteínas MCM terem sido identificadas em eucariotos mais recentes, o complexo MCM2-MCM7 se mantém o candidato de primeira helicase replicativa (Maiorano *et al.*, 2006).

Além de essenciais para a replicação do DNA em todas as células eucarióticas, as proteínas da família MCM também têm um papel importante na restrição da replicação a uma por ciclo celular

(Kearsey e Labib, 1998). Estas proteínas, abundantes durante o ciclo celular (Kearsey *et al.*, 1996; Maiorano *et al.*, 1996), são reguladas negativamente durante a quiescência, diferenciação ou senescência celular (Musahl *et al.*, 1998; Madine *et al.*, 2000; Stoeber *et al.*, 2001). No epitélio cervical normal, estas proteínas estão confinadas à camada basal proliferativa e ausente nas camadas mais superficiais do mesmo, onde ocorre o maior grau de diferenciação dos queratinócitos (Williams *et al.*, 1998; Freeman *et al.*, 1999). No entanto, em neoplasias intra-epiteliais cervicais (NIC), a camada proliferativa se expande, resultando no aparecimento de células positivas para MCM nas camadas mais superficiais do epitélio (Costa e Onesti, 2008).

Em 1998, Williams e colaboradores demonstraram que a expressão anormal de genes da família MCM pode ser explorada como uma maneira de melhorar a detecção de células anormais num esfregaço cervical (Williams *et al.*, 1998). Outros estudos mostraram a eficiência desta marcação em diferentes neoplasias, incluindo intestino grosso (Davies *et al.*, 2002), laringe (Chatrath *et al.*, 2003) e cavidade oral (Scott *et al.*, 2006).

Em 2007, Mukherjee e colaboradores testaram, através de imunocitoquímica, a eficiência de proteínas da família MCM (2-7), como biomarcador de células anormais na cérvix uterina. Estes autores compararam a capacidade de detecção da reação de imunocitoquímica contra MCM e o teste de Papanicolau em mulheres indianas, como método de triagem, e mostram equiparidade nos resultados (Mukherjee *et al.*, 2007).

Além disso, foi observado que a expressão de proteínas MCM é uma característica de células displásicas e malignas, e que o anticorpo contra proteínas MCM é capaz de identificar mais células em ciclo do que outros marcadores de proliferação, como Ki67 e PCNA (Freeman *et al.*, 1999).

Os trabalhos descritos acima mostram o papel das proteínas da família MCM nos processos de quiescência, diferenciação ou senescência celular, além de sugerir o uso destas como marcador de proliferação celular. Além disso, trabalhos propõem o uso destas como biomarcador de células anormais na cérvix uterina. Estes dados juntos sugerem um papel importante da superexpressão dos genes MCM2 e MCM5 nas nossas amostras de PHKs que expressam gene E7 selvagem de HPV16, independente do tratamento com TNF (figura 44 e figura 45).

RAFT			
símbolo	descrição	p valor	FOLD
	E7wt x pLXSN		
MCM2	minichromosome maintenance complex component 2	0.00	7.41
MCM5	minichromosome maintenance complex component 5	0.03	3.77
	E7wt TNF x pLXSN		
MCM2	minichromosome maintenance complex component 2	0.00	7.53
MCM5	minichromosome maintenance complex component 5	0.03	3.65
	E7wt TNF x pLXSN TNF		
MCM2	minichromosome maintenance complex component 2	0.00	7.10

figura 44: Valores de FOLD e p valor, obtidos a partir dos testes *t de student* para os genes MCM2 e MCM5, feitos com base nos dados provenientes da ANOVA do grupo 4, em cada uma das diferentes comparações 2 a 2.

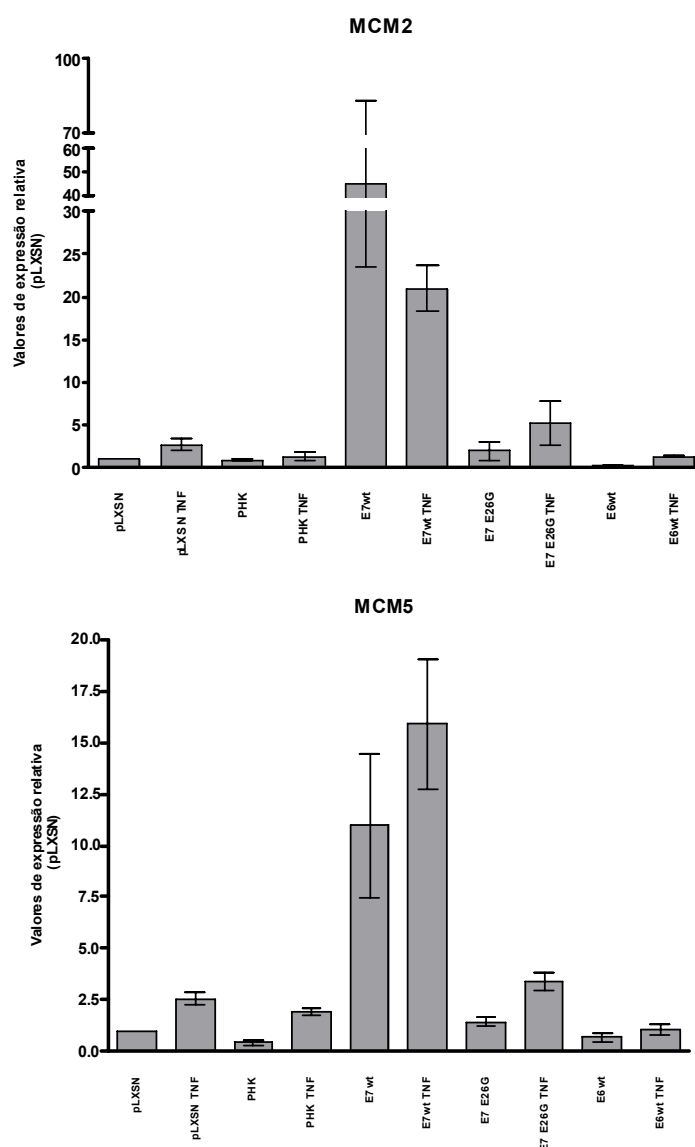


figura 45: Dados de expressão gênica de MCM2 e MCM5 obtidos a partir de PCR em Tempo Real

- MMP9 (Metalloproteinase de Matriz 9)

As metaloproteinases de matriz (MMPs) formam um grupo de enzimas dependentes de zinco, conhecidas por sua habilidade de degradar componentes da matriz extracelular. A MMP9 (gelatinase B) cliva especialmente colágeno IV e laminina 5, dois componentes da membrana basal, (Liotta *et al.*, 1980; Giannelli *et al.*, 1997). A capacidade das células tumorais de migrarem de seu tecido de origem para tecidos ao redor ou até mesmo distantes é um passo essencial para a progressão tumoral. As proteínas MMP1, MMP2 e MMP9 têm sido identificadas como

superexpressas em tecidos neoplásicos (Liotta *et al.*, 1980; Thorgeirsson *et al.*, 1985; Reich *et al.*, 1988; Stetler-Stevenson, 1996), incluindo o câncer de colo de útero (Zhai *et al.*, 2005). Estudos sobre as MMPs têm revelado funções adicionais destas proteínas, além de sua atividade proteolítica, tais como: contribuição na angiogênese do tumor (Fisher *et al.*, 1994; Stetler-Stevenson, 1996; Itoh *et al.*, 1998; Vu *et al.*, 1998; Hashimoto *et al.*, 2002), e participação na regulação da expressão de citocinas, tal como o TNF (Sheu *et al.*, 2001).

A figura 46 representa os dados obtidos a partir da análise de *Microarray* (razão entre o canal verde e o vermelho) para o gene MMP9, considerando o tipo celular (PHK normal ou transfectado com o gene E7wt de HPV16) e o tratamento com TNF. Observamos uma regulação negativa da expressão do mRNA de MMP9 quando compararmos PHK normal com 16E7wt ou PHK TNF com 16E7wt TNF. No entanto, o tratamento com TNF promoveu uma superexpressão do mRNA de MMP9 em todos os casos.

RAFT			
símbolo	descrição	p valor	FOLD
	E7wt/pLXSN		
MMP9	matrix metalloproteinase 9	0.03	-3.49

figura 46: Valores de FOLD e p valor, obtidos a partir dos testes *t de student* para o gene MMP9, feitos com base nos dados provenientes da ANOVA do grupo 4, em cada uma das diferentes comparações 2 a 2.

Trabalhos anteriores mostraram que MMP-9 está aumentada em carcinomas cervicais, relacionada com progressão tumoral e invasão (Sheu *et al.*, 2003). Vemos que na presença de E6wt, onde ocorre à degradação de p53, há um aumento de MMP-9. Em um outro modelo de estudo, a ausência de p53 está relacionada com o aumento da expressão de MMP-9. Em sarcomas, p53 inibe o fator transcricional NFκB, que atua diretamente no promotor de MMP-2,

inibindo sua expressão (Liu *et al.*, 2006). Neste estudo, observa-se uma expressão diminuída de MMP9 no mutante E6 Δ 9-13, onde não ocorre a degradação de p53. Observou-se também uma tendência na diminuição da expressão de MMP-9 na presença do oncogene E7wt. Esta expressão apresenta níveis semelhantes ao controle na presença do mutante de E726G, sugerindo a participação da via de pRb na baixa expressão de MMP9.

Estes resultados foram confirmados por PCR em Tempo Real pela aluna de Doutorado Laura Cardeal, orientada pela Dra Silvy Maria-Engler (Depto de Análises Clínicas e Toxicológicas Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP), em colaboração com o nosso grupo.

- **PCNA** (Proliferating Cell Nuclear Antigen)

O PCNA é um fator importante na atividade da DNA polimerase β , sendo, portanto um marcador de proliferação celular (Kato, 1999; Moldovan *et al.*, 2007). Observamos uma regulação positiva da expressão de mRNA codificado pelo gene PCNA, por análise de *microarray*, em células que expressam o gene E7 de HPV16, quando comparado com as células normais e aquelas transduzidas com o gene mutante E7 E26G. O tratamento com TNF promoveu uma diminuição dos níveis de expressão de PCNA em todos os casos, exceto nos PHKs transduzidos com o gene E7. A diminuição dos níveis desta proteína em células sensíveis ao TNF poderia estar diretamente envolvida na inibição da proliferação mediada por esta citocina. Por outro lado, as amostras derivadas de culturas que expressam o gene E7 de HPV16, e que são resistentes ao efeito antiproliferativo do TNF, apresentaram altos níveis deste fator, mesmo após tratamento com a citocina. Este resultado foi confirmado através da análise dos níveis protéicos de PCNA, por *Western Blot* (figura 48) e da presença desta proteína por Imunohistoquímica (figura 49) e Imunocitoquímica (figura 50).

A diminuição dos níveis de PCNA em células sensíveis ao TNF pode estar diretamente envolvida na inibição da proliferação mediada por esta citocina. Por outro lado, as amostras derivadas de culturas que expressam o gene E7 de HPV16, e que são resistentes ao efeito antiproliferativo do TNF, apresentaram altos níveis deste fator, mesmo após tratamento com a citocina. Estes dados estão de acordo com a capacidade proliferativa exibida pelas culturas que expressam o gene E7 e confirmam observações prévias feitas em nosso laboratório (Vieira *et al.*, 1996; Boccardo *et al.*, 2004)

RAFT			
símbolo	descrição	p valor	FOLD
	E7wt TNF/pLXSN		
PCNA	proliferating cell nuclear antigen	0.02	3.88
	E7wt TNF/pLXSN TNF		
PCNA	proliferating cell nuclear antigen	0.03	3.26

figura 47: Valores de FOLD e p valor, obtidos a partir dos testes *t de student* para o gene MMP9, feitos com base nos dados provenientes da ANOVA do grupo 4, em cada uma das diferentes comparações 2 a 2.

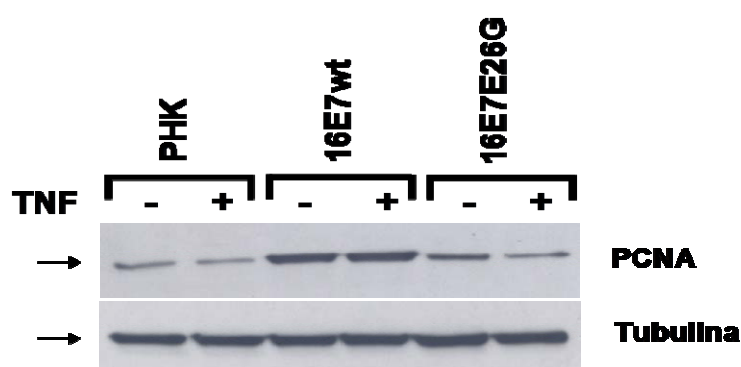


figura 48: Determinação dos níveis da proteína PCNA em culturas organotípicas de queratinócitos normais transduzidos com o vetor retroviral vazio ou portadores do gene E7 de HPV 16 (normal e mutante) antes e após tratamento com 2nM de TNF por 60 horas. Os níveis desta proteína foram determinados por *western blot* utilizando extratos protéicos totais obtidos a partir das culturas organotípicas. Visando confirmar a aplicação de quantidades equivalentes de extrato protéico de cada amostra foi utilizado um anticorpo anti-tubulina α .

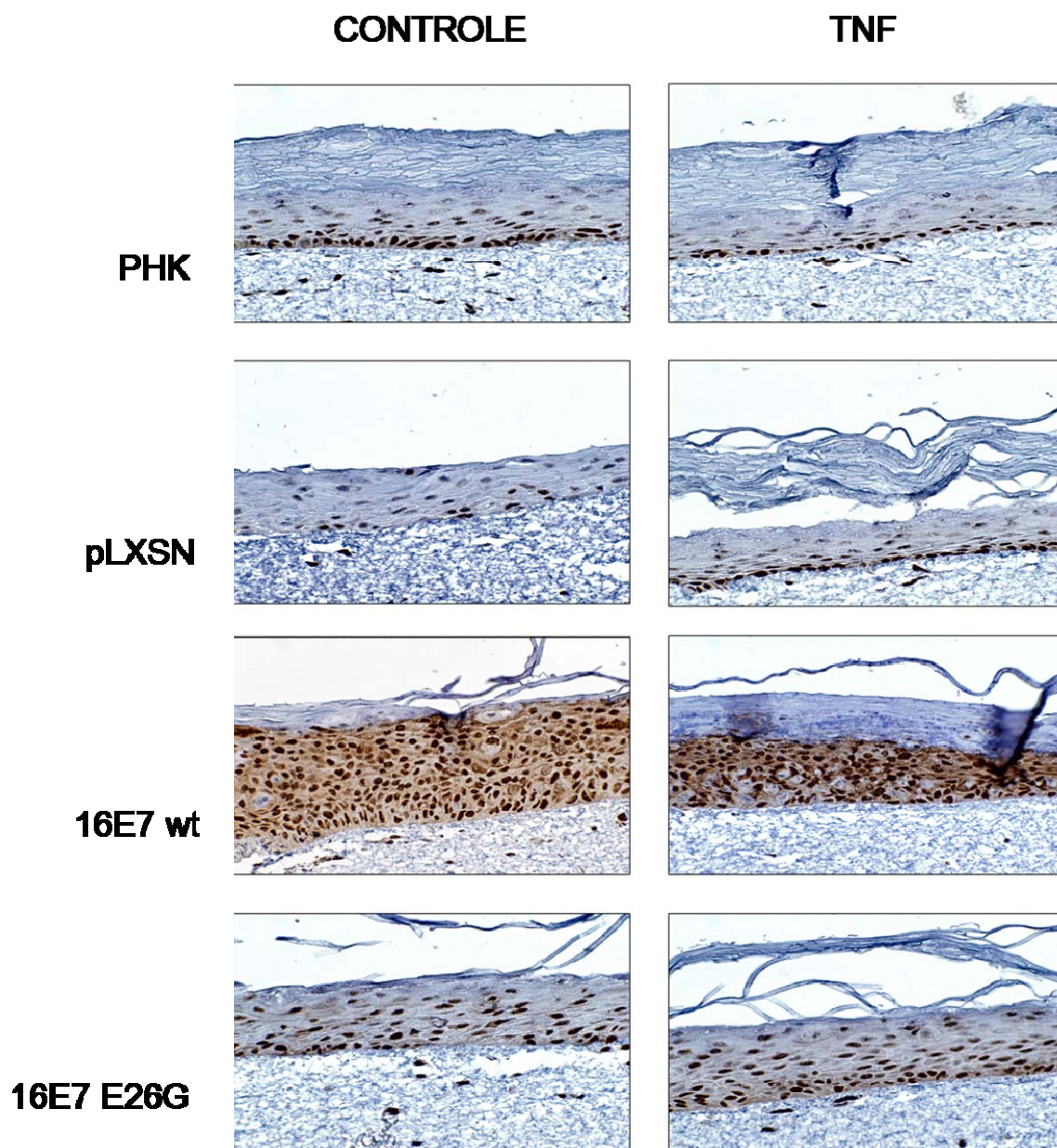


figura 49: Detecção da proteína PCNA através imunohistoquímica em cortes transversais de culturas organotípicas de PHKs normais, transduzidos com o vetor vazio, com o gene E7 selvagem de HPV 16 ou com o mutante E7 E26G.

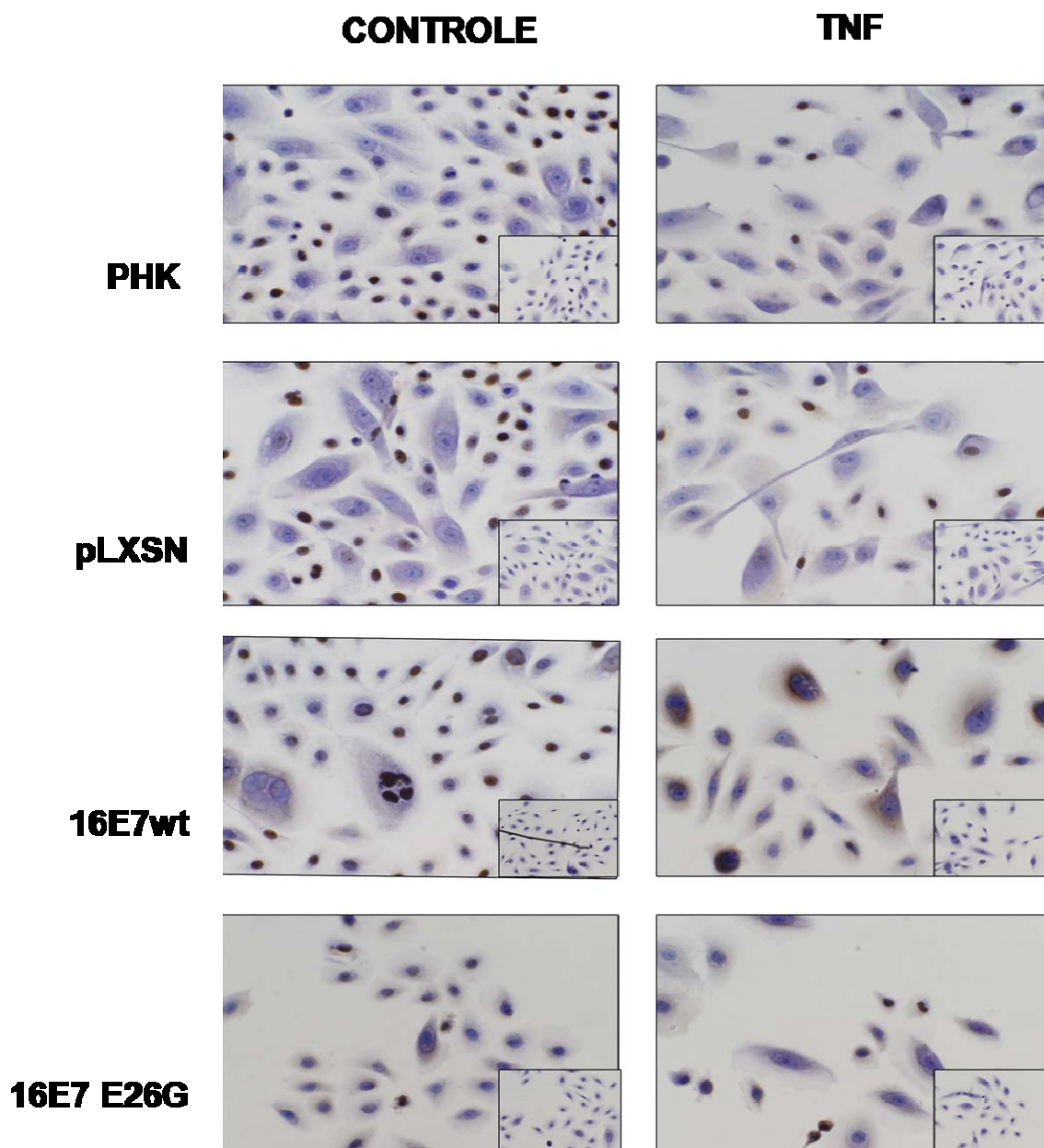


figura 50: Detecção da proteína PCNA através imunocitoquímica em cortes transversais de culturas organotípicas de PHKs normais, transduzidos com o vetor vazio e o gene E7 selvagem de HPV 16 ou com o mutante E7 E26G.

CONCLUSÕES

Conjuntamente, os dados obtidos mostram que:

1. A expressão do gene E7 de HPV16 em queratinócitos confere resistência ao efeito antiproliferativo do TNF tanto em culturas em monocamada, quanto em culturas organotípicas.

2. As alterações morfológicas causadas pela expressão do gene E7, e mais atenuadamente pela expressão do gene E6, são semelhantes às observadas nas displasias uterinas *in vivo* e dependem, pelo menos em parte, da degradação das proteínas pRb e p53.
3. A análise por ANOVA identificou um aumento significativo no número de genes diferencialmente expressos em amostras provenientes de *raft* quando comparados a células cultivadas em monocamada, independente do tratamento com TNF.
4. Foram identificados como diferencialmente expresso em nossas amostras que expressam as oncoproteínas virais, genes associados a diversos processos biológicos relevantes, tais como: regulação da proliferação celular, diferenciação celular, transdução de sinais, regulação da resposta inflamatória e da transcrição e metabolismo de ácidos nucleicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas Ak, L. A. Cellular and molecular immunology. Philadelphia: W B Saunders. 2003

Abiko, Y., M. Nishimura, K. Kusano, K. Nakashima, K. Okumura, T. Arakawa, T. Takuma, I. Mizoguchi e T. Kaku. Expression of MIP-3alpha/CCL20, a macrophage inflammatory protein in oral squamous cell carcinoma. Arch Oral Biol, v.48, n.2, Feb, p.171-5. 2003.

Ahn, W. S., S. M. Bae, J. M. Lee, S. E. Namkoong, S. J. Han, Y. L. Cho, G. H. Nam, J. S. Seo, C. K. Kim e Y. W. Kim. Searching for pathogenic gene functions to cervical cancer. Gynecol Oncol, v.93, n.1, Apr, p.41-8. 2004.

Al Aoukaty, A., B. Rolstad, A. Giaid e A. A. Maghazachi. MIP-3alpha, MIP-3beta and fractalkine induce the locomotion and the mobilization of intracellular calcium, and activate the heterotrimeric G proteins in human natural killer cells. Immunology, v.95, n.4, p.618-624. 1998.

Alberg, A. J., J. Selhub, K. V. Shah, R. P. Viscidi, G. W. Comstock e K. J. Helzlsouer. The risk of cervical cancer in relation to serum concentrations of folate, vitamin B12, and homocysteine. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, v.9, n.7, Jul, p.761-4. 2000.

Alexiadis, V., T. Waldmann, J. Andersen, M. Mann, R. Knippers e C. Gruss. The protein encoded by the proto-oncogene DEK changes the topology of chromatin and reduces the efficiency of DNA replication in a chromatin-specific manner. Genes Dev, v.14, n.11, Jun 1, p.1308-12. 2000.

Allavena, P., A. Sica, A. Vecchi, M. Locati, S. Sozzani e A. Mantovani. The chemokine receptor switch paradigm and dendritic cell migration: its significance in tumor tissues. Immunol.Rev., v.177, p.141-149. 2000.

Alts-Group. Human papillomavirus testing for triage of women with cytologic evidence of low-grade squamous intraepithelial lesions: baseline data from a randomized trial. The Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions Triage Study J Natl Cancer Inst, v.92, n.5, Mar 1, p.397-402. 2000.

Arends, M. J., A. H. Wyllie e C. C. Bird. Papillomaviruses and human cancer. Hum Pathol, v.21, n.7, Jul, p.686-98. 1990.

Ashrafi, G. H., M. R. Haghshenas, B. Marchetti, P. M. O'brien e M. S. Campo. E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I. Int J Cancer, v.113, n.2, Jan 10, p.276-83. 2005.

Aylon, Y. e M. Oren. Living with p53, dying of p53. Cell, v.130, n.4, Aug 24, p.597-600. 2007.

Baggiolini, M., B. Dewald e B. Moser. Human chemokines: an update. Annu.Rev.Immunol., v.15, p.675-705. 1997.

Baldwin, A. S., Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. Annu.Rev.Immunol., v.14, p.649-683. 1996.

Banerjee, N. S., N. J. Genovese, F. Noya, W. M. Chien, T. R. Broker e L. T. Chow. Conditionally activated E7 proteins of high-risk and low-risk human papillomaviruses induce S phase in postmitotic, differentiated human keratinocytes. J.Virol., v.80, n.13, p.6517-6524. 2006.

Banerjee, R. Chemistry and Biochemistry of B12.. New York: John Wiley and Sons. 1999

Banks, L., P. Spence, E. Androphy, N. Hubbert, G. Matlashewski, A. Murray e L. Crawford. Identification of human papillomavirus type 18 E6 polypeptide in cells derived from human cervical carcinomas. J Gen Virol, v.68 (Pt 5), May, p.1351-9. 1987.

Banno, T., A. Gazel e M. Blumenberg. Effects of tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) in epidermal keratinocytes revealed using global transcriptional profiling. J.Biol.Chem., v.279, n.31, p.32633-32642. 2004.

Barbosa, M. S. e R. Schlegel. The E6 and E7 genes of HPV-18 are sufficient for inducing two-stage in vitro transformation of human keratinocytes. Oncogene, v.4, n.12, Dec, p.1529-32. 1989.

Barksdale, S. K. e C. C. Baker. Differentiation-specific expression from the bovine papillomavirus type 1 P2443 and late promoters. J Virol, v.67, n.9, Sep, p.5605-16. 1993.

Barnard, P. e N. A. Mcmillan. The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon-alpha. Virology, v.259, n.2, Jul 5, p.305-13. 1999.

Basile, J. R., V. Zacny e K. Munger. The cytokines tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and TNF-related apoptosis-inducing ligand differentially modulate proliferation

and apoptotic pathways in human keratinocytes expressing the human papillomavirus-16 E7 oncoprotein. J.Biol.Chem., v.276, n.25, p.22522-22528. 2001.

Bauer, H. M., Y. Ting, C. E. Greer, J. C. Chambers, C. J. Tashiro, J. Chimera, A. Reingold e M. M. Manos. Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. Jama, v.265, n.4, Jan 23-30, p.472-7. 1991.

Bedell, M. A., K. H. Jones, S. R. Grossman e L. A. Laimins. Identification of human papillomavirus type 18 transforming genes in immortalized and primary cells. J Virol, v.63, n.3, Mar, p.1247-55. 1989.

Beer, D. G., S. L. Kardia, C. C. Huang, T. J. Giordano, A. M. Levin, D. E. Misek, L. Lin, G. Chen, T. G. Gharib, D. G. Thomas, M. L. Lizyness, R. Kuick, S. Hayasaka, J. M. Taylor, M. D. Iannettoni, M. B. Orringer e S. Hanash. Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. Nat Med, v.8, n.8, Aug, p.816-24. 2002.

Belbin, T. J., B. Singh, I. Barber, N. Socci, B. Wenig, R. Smith, M. B. Prystowsky e G. Childs. Molecular classification of head and neck squamous cell carcinoma using cDNA microarrays. Cancer Res, v.62, n.4, Feb 15, p.1184-90. 2002.

Beutler, B. e A. Cerami. Cachectin: more than a tumor necrosis factor. N Engl J Med, v.316, n.7, Feb 12, p.379-85. 1987.

Bieche, I., C. Chavey, C. Andrieu, M. Busson, S. Vacher, L. Le Corre, J. M. Guinebretiere, S. Burlinchon, R. Lidereau e G. Lazennec. CXC chemokines located in the 4q21 region are up-regulated in breast cancer. Endocr.Relat Cancer, v.14, n.4, p.1039-1052. 2007.

Bilezikjian, L. M., A. L. Blount, C. J. Donaldson e W. W. Vale. Pituitary actions of ligands of the TGF-beta family: activins and inhibins. Reproduction, v.132, n.2, Aug, p.207-15. 2006.

Boccardo, E., F. Noya, T. R. Broker, L. T. Chow e L. L. Villa. HPV-18 confers resistance to TNF-alpha in organotypic cultures of human keratinocytes. Virology, v.328, n.2, p.233-243. 2004.

Bornstein, J., N. Lahat, A. Kinarty, M. Revel, H. Abramovici e S. Shapiro. Interferon-beta and -gamma, but not tumor necrosis factor-alpha, demonstrate immunoregulatory effects on carcinoma cell lines infected with human papillomavirus. Cancer, v.79, n.5, Mar 1, p.924-34. 1997.

Bosch, F. X., M. M. Manos, N. Munoz, M. Sherman, A. M. Jansen, J. Peto, M. H. Schiffman, V. Moreno, R. Kurman e K. V. Shah. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. J Natl Cancer Inst, v.87, n.11, Jun 7, p.796-802. 1995.

Broker, T. R. Structure and genetic expression of papillomaviruses. Obstet Gynecol Clin North Am, v.14, n.2, Jun, p.329-48. 1987.

Bustin, M. e R. Reeves. High-mobility-group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function. Prog.Nucleic Acid Res.Mol.Biol., v.54, p.35-100. 1996.

Butz, K., T. Ristriani, A. Hengstermann, C. Denk, M. Scheffner e F. Hoppe-Seyler. siRNA targeting of the viral E6 oncogene efficiently kills human papillomavirus-positive cancer cells. Oncogene, v.22, n.38, Sep 4, p.5938-45. 2003.

Campbell, J. J., E. P. Bowman, K. Murphy, K. R. Youngman, M. A. Siani, D. A. Thompson, L. Wu, A. Zlotnik e E. C. Butcher. 6-C-kine (SLC), a lymphocyte adhesion-triggering chemokine expressed by high endothelium, is an agonist for the MIP-3beta receptor CCR7. J.Cell Biol., v.141, n.4, p.1053-1059. 1998.

Campillos, M., M. A. Garcia, F. Valdivieso e J. Vazquez. Transcriptional activation by AP-2alpha is modulated by the oncogene DEK. Nucleic Acids Res, v.31, n.5, Mar 1, p.1571-5. 2003.

Carcamo, J., F. M. Weis, F. Ventura, R. Wieser, J. L. Wrana, L. Attisano e J. Massague. Type I receptors specify growth-inhibitory and transcriptional responses to transforming growth factor beta and activin. Mol Cell Biol, v.14, n.6, Jun, p.3810-21. 1994.

Carro, M. S., F. M. Spiga, M. Quarto, V. Di Ninni, S. Volorio, M. Alcalay e H. Muller. DEK Expression is controlled by E2F and deregulated in diverse tumor types. Cell Cycle, v.5, n.11, Jun, p.1202-7. 2006.

Chan, W. K., G. Klock e H. U. Bernard. Progesterone and glucocorticoid response elements occur in the long control regions of several human papillomaviruses involved in anogenital neoplasia. J Virol, v.63, n.8, Aug, p.3261-9. 1989.

Chang, A. A. e C. Van Waes. Nuclear factor-KappaB as a common target and activator of oncogenes in head and neck squamous cell carcinoma. Adv Otorhinolaryngol, v.62, p.92-102. 2005.

Chang, Y. E. e L. A. Laimins. Microarray analysis identifies interferon-inducible genes and Stat-1 as major transcriptional targets of human papillomavirus type 31. J Virol, v.74, n.9, May, p.4174-82. 2000.

Charbonnier, A. S., N. Kohrgruber, E. Kriehuber, G. Stingl, A. Rot e D. Maurer. Macrophage inflammatory protein 3alpha is involved in the constitutive trafficking of epidermal langerhans cells. J.Exp.Med., v.190, n.12, p.1755-1768. 1999.

Chatrath, P., I. S. Scott, L. S. Morris, R. J. Davies, S. M. Rushbrook, K. Bird, S. L. Vowler, J. W. Grant, I. T. Saeed, D. Howard, R. A. Laskey e N. Coleman. Aberrant expression of minichromosome maintenance protein-2 and Ki67 in laryngeal squamous epithelial lesions. Br.J.Cancer, v.89, n.6, p.1048-1054. 2003.

Chaturvedi, V., J. Z. Qin, M. F. Denning, D. Choubey, M. O. Diaz e B. J. Nickoloff. Apoptosis in proliferating, senescent, and immortalized keratinocytes. J Biol Chem, v.274, n.33, Aug 13, p.23358-67. 1999.

Chen, J. J., C. E. Reid, V. Band e E. J. Androphy. Interaction of papillomavirus E6 oncoproteins with a putative calcium-binding protein. Science, v.269, n.5223, Jul 28, p.529-31. 1995.

Chen, Y. G., H. M. Lui, S. L. Lin, J. M. Lee e S. Y. Ying. Regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis by activin. Exp Biol Med (Maywood), v.227, n.2, Feb, p.75-87. 2002.

Cheng, S., D. C. Schmidt-Grimminger, T. Murant, T. R. Broker e L. T. Chow. Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. Genes Dev., v.9, n.19, p.2335-2349. 1995a.

Cheng, S., D. C. Schmidt-Grimminger, T. Murant, T. R. Broker e L. T. Chow. Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. Genes Dev, v.9, n.19, Oct 1, p.2335-49. 1995b.

Chow, L. T. e T. R. Broker. In vitro experimental systems for HPV: epithelial raft cultures for investigations of viral reproduction and pathogenesis and for genetic analyses of viral proteins and regulatory sequences. Clin.Dermatol., v.15, n.2, p.217-227. 1997.

Chow, L. T., S. S. Reilly, T. R. Broker e L. B. Taichman. Identification and mapping of human papillomavirus type 1 RNA transcripts recovered from plantar warts and infected epithelial cell cultures. J.Virol., v.61, n.6, p.1913-1918. 1987.

Clark-Lewis, I., B. Dewald, T. Geiser, B. Moser e M. Baggiolini. Platelet factor 4 binds to interleukin 8 receptors and activates neutrophils when its N terminus is modified with Glu-Leu-Arg. Proc Natl Acad Sci U S A, v.90, n.8, Apr 15, p.3574-7. 1993.

Conger, K. L., J. S. Liu, S. R. Kuo, L. T. Chow e T. S. Wang. Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human dna polymerase alpha/primase. J Biol Chem, v.274, n.5, Jan 29, p.2696-705. 1999.

Connor, J. P., K. Ferrer, J. P. Kane e J. M. Goldberg. Evaluation of Langerhans' cells in the cervical epithelium of women with cervical intraepithelial neoplasia. Gynecol Oncol, v.75, n.1, Oct, p.130-5. 1999.

Cook, D. N., D. M. Prosser, R. Forster, J. Zhang, N. A. Kuklin, S. J. Abbondanzo, X. D. Niu, S. C. Chen, D. J. Manfra, M. T. Wiekowski, L. M. Sullivan, S. R. Smith, H. B. Greenberg, S. K. Narula, M. Lipp e S. A. Lira. CCR6 mediates dendritic cell localization, lymphocyte homeostasis, and immune responses in mucosal tissue. Immunity, v.12, n.5, p.495-503. 2000.

Cooper, B., S. Schneider, J. Bohl, Y. Jiang, A. Beaudet e S. Vande Pol. Requirement of E6AP and the features of human papillomavirus E6 necessary to support degradation of p53. Virology, v.306, n.1, Feb 1, p.87-99. 2003.

Costa, A. e S. Onesti. The MCM complex: (just) a replicative helicase? Biochem.Soc.Trans., v.36, n.Pt 1, p.136-140. 2008.

Costello, E., P. Saudan, E. Winocour, L. Pizer e P. Beard. High mobility group chromosomal protein 1 binds to the adeno-associated virus replication protein (Rep) and promotes Rep-mediated site-specific cleavage of DNA, ATPase activity and transcriptional repression. EMBO J., v.16, n.19, p.5943-5954. 1997.

Cripe, T. P., T. H. Haugen, J. P. Turk, F. Tabatabai, P. G. Schmid, 3rd, M. Durst, L. Gissmann, A. Roman e L. P. Turek. Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis. Embo J, v.6, n.12, Dec 1, p.3745-53. 1987.

Crook, T., J. A. Tidy e K. H. Vousden. Degradation of p53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and trans-activation. Cell, v.67, n.3, p.547-556. 1991.

Current Protocols in Molecular Biology. 1996

Davies, R. J., A. Freeman, L. S. Morris, S. Bingham, S. Dilworth, I. Scott, R. A. Laskey, R. Miller e N. Coleman. Analysis of minichromosome maintenance proteins

as a novel method for detection of colorectal cancer in stool. Lancet, v.359, n.9321, p.1917-1919. 2002.

De Villiers, E. M. Taxonomic classification of papillomaviruses. p.57-63. 2001

Demers, G. W., E. Espling, J. B. Harry, B. G. Etscheid e D. A. Galloway. Abrogation of growth arrest signals by human papillomavirus type 16 E7 is mediated by sequences required for transformation. J Virol, v.70, n.10, Oct, p.6862-9. 1996.

Devany, M., N. P. Kotharu e H. Matsuo. Expression and isotopic labeling of structural domains of the human protein DEK. Protein Expr Purif, v.40, n.2, Apr, p.244-7. 2005.

Dieu-Nosjean, M. C., C. Massacrier, B. Homey, B. Vanbervliet, J. J. Pin, A. Vicari, S. Lebecque, C. Dezutter-Dambuyant, D. Schmitt, A. Zlotnik e C. Caux. Macrophage inflammatory protein 3alpha is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors. J Exp Med, v.192, n.5, Sep 4, p.705-18. 2000.

Dieu, M. C., B. Vanbervliet, A. Vicari, J. M. Bridon, E. Oldham, S. Ait-Yahia, F. Briere, A. Zlotnik, S. Lebecque e C. Caux. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. J.Exp.Med., v.188, n.2, p.373-386. 1998.

Dipaolo, J. A., C. D. Woodworth, N. C. Popescu, V. Notario e J. Doniger. Induction of human cervical squamous cell carcinoma by sequential transfection with human papillomavirus 16 DNA and viral Harvey ras. Oncogene, v.4, n.4, Apr, p.395-9. 1989.

Dollard, S. C., J. L. Wilson, L. M. Demeter, W. Bonnez, R. C. Reichman, T. R. Broker e L. T. Chow. Production of human papillomavirus and modulation of the infectious program in epithelial raft cultures. Genes Dev., v.6, n.7, p.1131-1142. 1992.

Duerksen-Hughes, P. J., J. Yang e S. B. Schwartz. HPV 16 E6 blocks TNF-mediated apoptosis in mouse fibroblast LM cells. Virology, v.264, n.1, Nov 10, p.55-65. 1999.

Duffy, C. L., S. L. Phillips e A. J. Klingelutz. Microarray analysis identifies differentiation-associated genes regulated by human papillomavirus type 16 E6. Virology, v.314, n.1, Sep 15, p.196-205. 2003.

Durst, M., D. Gallahan, G. Jay e J. S. Rhim. Glucocorticoid-enhanced neoplastic transformation of human keratinocytes by human papillomavirus type 16 and an activated ras oncogene. Virology, v.173, n.2, Dec, p.767-71. 1989.

Dyson, N., P. M. Howley, K. Munger e E. Harlow. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. Science, v.243, n.4893, p.934-937. 1989.

Enrique, B. Efeito do Fator de Necrose Tumoral-Alfa (TNF-) sobre Células Imortalizadas por Papilomavírus Humano (HPV). 2002.

Eto, Y., T. Tsuji, M. Takezawa, S. Takano, Y. Yokogawa e H. Shibai. Purification and characterization of erythroid differentiation factor (EDF) isolated from human leukemia cell line THP-1. Biochem Biophys Res Commun, v.142, n.3, Feb 13, p.1095-103. 1987.

Faulkner, N. E., J. M. Hilfinger e D. M. Markovitz. Protein phosphatase 2A activates the HIV-2 promoter through enhancer elements that include the pTet site. J Biol Chem, v.276, n.28, Jul 13, p.25804-12. 2001.

Fehrmann, F. e L. A. Laimins. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. Oncogene, v.22, n.33, Aug 11, p.5201-7. 2003.

Feldman, A. L., N. G. Costouros, E. Wang, M. Qian, F. M. Marincola, H. R. Alexander e S. K. Libutti. Advantages of mRNA amplification for microarray analysis. Biotechniques, v.33, n.4, Oct, p.906-12, 914. 2002.

Filippova, M., T. A. Brown-Bryan, C. A. Casiano e P. J. Duerksen-Hughes. The human papillomavirus 16 E6 protein can either protect or further sensitize cells to TNF: effect of dose. Cell Death Differ, v.12, n.12, Dec, p.1622-35. 2005.

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

Fisher, C., S. Gilbertson-Beadling, E. A. Powers, G. Petzold, R. Poorman e M. A. Mitchell. Interstitial collagenase is required for angiogenesis in vitro. Dev Biol, v.162, n.2, Apr, p.499-510. 1994.

Flores, E. R., B. L. Allen-Hoffmann, D. Lee e P. F. Lambert. The human papillomavirus type 16 E7 oncogene is required for the productive stage of the viral life cycle. J.Virol., v.74, n.14, p.6622-6631. 2000.

Fornerod, M., J. Boer, S. Van Baal, M. Jaegle, M. Von Lindern, K. G. Murti, D. Davis, J. Bonten, A. Buijs e G. Grosveld. Relocation of the carboxyterminal part of CAN from

the nuclear envelope to the nucleus as a result of leukemia-specific chromosome rearrangements. Oncogene, v.10, n.9, p.1739-1748. 1995.

Foster, S. A., G. W. Demers, B. G. Etscheid e D. A. Galloway. The ability of human papillomavirus E6 proteins to target p53 for degradation in vivo correlates with their ability to abrogate actinomycin D-induced growth arrest. J Viro, v.68, n.9, Sep, p.5698-705. 1994.

Franco, E. L., L. L. Villa, A. Ruiz e M. C. Costa. Transmission of cervical human papillomavirus infection by sexual activity: differences between low and high oncogenic risk types. J.Infect.Dis., v.172, n.3, p.756-763. 1995.

Frattini, M. G., S. D. Hurst, H. B. Lim, S. Swaminathan e L. A. Laimins. Abrogation of a mitotic checkpoint by E2 proteins from oncogenic human papillomaviruses correlates with increased turnover of the p53 tumor suppressor protein. Embo J, v.16, n.2, Jan 15, p.318-31. 1997.

Frattini, M. G., H. B. Lim e L. A. Laimins. In vitro synthesis of oncogenic human papillomaviruses requires episomal genomes for differentiation-dependent late expression. Proc Natl Acad Sci U S A, v.93, n.7, Apr 2, p.3062-7. 1996.

Freeman, A., L. S. Morris, A. D. Mills, K. Stoeber, R. A. Laskey, G. H. Williams e N. Coleman. Minichromosome maintenance proteins as biological markers of dysplasia and malignancy. Clin.Cancer Res., v.5, n.8, p.2121-2132. 1999.

Funk, J. O., S. Waga, J. B. Harry, E. Espling, B. Stillman e D. A. Galloway. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. Genes Dev, v.11, n.16, Aug 15, p.2090-100. 1997.

Fushimi, T., A. Kojima, M. A. Moore e R. G. Crystal. Macrophage inflammatory protein 3alpha transgene attracts dendritic cells to established murine tumors and suppresses tumor growth. J.Clin.Invest, v.105, n.10, p.1383-1393. 2000.

Gao, Q., L. Singh, A. Kumar, S. Srinivasan, D. E. Wazer e V. Band. Human papillomavirus type 16 E6-induced degradation of E6TP1 correlates with its ability to immortalize human mammary epithelial cells. J Viro, v.75, n.9, May, p.4459-66. 2001.

Gao, Q., S. Srinivasan, S. N. Boyer, D. E. Wazer e V. Band. The E6 oncoproteins of high-risk papillomaviruses bind to a novel putative GAP protein, E6TP1, and target it for degradation. Mol Cell Biol, v.19, n.1, Jan, p.733-44. 1999.

Gewin, L. e D. A. Galloway. E box-dependent activation of telomerase by human papillomavirus type 16 E6 does not require induction of c-myc. J Virol, v.75, n.15, Aug, p.7198-201. 2001.

Giannelli, G., J. Falk-Marzillier, O. Schiraldi, W. G. Stetler-Stevenson e V. Quaranta. Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5. Science, v.277, n.5323, Jul 11, p.225-8. 1997.

Golub, T. R., D. K. Slonim, P. Tamayo, C. Huard, M. Gaasenbeek, J. P. Mesirov, H. Coller, M. L. Loh, J. R. Downing, M. A. Caligiuri, C. D. Bloomfield e E. S. Lander. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. Science, v.286, n.5439, Oct 15, p.531-7. 1999.

Gomes, L. I., R. L. Silva, B. S. Stolf, E. B. Cristo, R. Hirata, F. A. Soares, L. F. Reis, E. J. Neves e A. F. Carvalho. Comparative analysis of amplified and nonamplified RNA for hybridization in cDNA microarray. Anal.Biochem., v.321, n.2, p.244-251. 2003.

Gonzalez-Manchon, C. e W. Vale. Activin-A, inhibin and transforming growth factor-beta modulate growth of two gonadal cell lines. Endocrinology, v.125, n.3, Sep, p.1666-72. 1989.

Goodwin, E. C. e D. Dimaio. Repression of human papillomavirus oncogenes in HeLa cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways. Proc Natl Acad Sci U S A, v.97, n.23, Nov 7, p.12513-8. 2000.

Grasbeck, R. Intrinsic factor and the other vitamin B12 transport proteins. Prog Hematol, v.6, p.233-60. 1969.

Groner, B. Transcription factor regulation in mammary epithelial cells. Domest Anim Endocrinol, v.23, n.1-2, Jul, p.25-32. 2002.

Grottke, C., K. Mantwill, M. Dietel, D. Schadendorf e H. Lage. Identification of differentially expressed genes in human melanoma cells with acquired resistance to various antineoplastic drugs. Int J Cancer, v.88, n.4, Nov 15, p.535-46. 2000.

Guess, J. C. e D. J. Mccance. Decreased migration of Langerhans precursor-like cells in response to human keratinocytes expressing human papillomavirus type 16 E6/E7 is related to reduced macrophage inflammatory protein-3alpha production. J Virol, v.79, n.23, Dec, p.14852-62. 2005.

Halbert, C. L., G. W. Demers e D. A. Galloway. The E6 and E7 genes of human papillomavirus type 6 have weak immortalizing activity in human epithelial cells. J Virol, v.66, n.4, Apr, p.2125-34. 1992.

Harris, S. L. e A. J. Levine. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. Oncogene, v.24, n.17, Apr 18, p.2899-908. 2005.

Hashimoto, G., I. Inoki, Y. Fujii, T. Aoki, E. Ikeda e Y. Okada. Matrix metalloproteinases cleave connective tissue growth factor and reactivate angiogenic activity of vascular endothelial growth factor 165. J Biol Chem, v.277, n.39, Sep 27, p.36288-95. 2002.

Hawley-Nelson, P., K. H. Vousden, N. L. Hubbert, D. R. Lowy e J. T. Schiller. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. Embo J, v.8, n.12, Dec 1, p.3905-10. 1989.

Hebert, C. A., R. V. Vitangcol e J. B. Baker. Scanning mutagenesis of interleukin-8 identifies a cluster of residues required for receptor binding. J Biol Chem, v.266, n.28, Oct 5, p.18989-94. 1991.

Hebner, C. M. e L. A. Laimins. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. Rev Med Virol, v.16, n.2, Mar-Apr, p.83-97. 2006.

Helt, A. M. e D. A. Galloway. Destabilization of the retinoblastoma tumor suppressor by human papillomavirus type 16 E7 is not sufficient to overcome cell cycle arrest in human keratinocytes. J.Virol., v.75, n.15, p.6737-6747. 2001.

Helt, A. M. e D. A. Galloway. Mechanisms by which DNA tumor virus oncoproteins target the Rb family of pocket proteins. Carcinogenesis, v.24, n.2, p.159-169. 2003.

Hernandez, B. Y., K. Mcduffie, L. R. Wilkens, L. Kamemoto e M. T. Goodman. Diet and premalignant lesions of the cervix: evidence of a protective role for folate, riboflavin, thiamin, and vitamin B12. Cancer Causes Control, v.14, n.9, Nov, p.859-70. 2003.

Hieshima, K., T. Imai, M. Baba, K. Shoudai, K. Ishizuka, T. Nakagawa, J. Tsuruta, M. Takeya, Y. Sakaki, K. Takatsuki, R. Miura, G. Opendakker, J. Van Damme, O. Yoshie e H. Nomiyama. A novel human CC chemokine PARC that is most homologous to macrophage-inflammatory protein-1 alpha/LD78 alpha and chemotactic for T lymphocytes, but not for monocytes. J.Immunol., v.159, n.3, p.1140-1149. 1997.

Hockel, M., K. Schlenger, S. Hockel e P. Vaupel. Hypoxic cervical cancers with low apoptotic index are highly aggressive. Cancer Res, v.59, n.18, Sep 15, p.4525-8. 1999.

Hollenbach, A. D., C. J. Mcpherson, E. J. Mientjes, R. Iyengar e G. Grosveld. Daxx and histone deacetylase II associate with chromatin through an interaction with core

histones and the chromatin-associated protein Dek. J Cell Sci, v.115, n.Pt 16, Aug 15, p.3319-30. 2002.

Howley, P. Papillomavirinae: the viruses and their replication. Philadelphia: Lippincott-Raven. 1996. 947-977 p. (Fundamental virology)

Howley, P. M., and D. R. Lowy. Papillomaviruses and their replication. Philadelphia: Fields virology. 2001. 2197-2229 p.

Howley, P. M., K. Munger, B. A. Werness, W. C. Phelps e R. Schlegel. Molecular mechanisms of transformation by the human papillomaviruses. Princess Takamatsu Symp., v.20, p.199-206. 1989.

Hu, Y., V. Baud, T. Oga, K. I. Kim, K. Yoshida e M. Karin. IKKalpha controls formation of the epidermis independently of NF-kappaB. Nature, v.410, n.6829, Apr 5, p.710-4. 2001.

Hubert, P., J. H. Caberg, C. Gilles, L. Bousarghin, E. Franzen-Detrooz, J. Boniver e P. Delvenne. E-cadherin-dependent adhesion of dendritic and Langerhans cells to keratinocytes is defective in cervical human papillomavirus-associated (pre)neoplastic lesions. J Pathol, v.206, n.3, Jul, p.346-55. 2005.

Hubner, G., M. Brauchle, M. Gregor e S. Werner. Activin A: a novel player and inflammatory marker in inflammatory bowel disease? Lab Invest, v.77, n.4, Oct, p.311-8. 1997.

Hubner, G., Q. Hu, H. Smola e S. Werner. Strong induction of activin expression after injury suggests an important role of activin in wound repair. Dev Biol, v.173, n.2, Feb 1, p.490-8. 1996.

Hubner, G. e S. Werner. Serum growth factors and proinflammatory cytokines are potent inducers of activin expression in cultured fibroblasts and keratinocytes. Exp Cell Res, v.228, n.1, Oct 10, p.106-13. 1996.

Hudson, J. B., M. A. Bedell, D. J. Mccance e L. A. Laiminis. Immortalization and altered differentiation of human keratinocytes in vitro by the E6 and E7 open reading frames of human papillomavirus type 18. J Virol, v.64, n.2, Feb, p.519-26. 1990.

Hughes, F. J. e M. A. Romanos. E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. Nucleic Acids Res, v.21, n.25, Dec 25, p.5817-23. 1993.

Hurlin, P. J., P. Kaur, P. P. Smith, N. Perez-Reyes, R. A. Blanton e J. K. Mcdougall. Progression of human papillomavirus type 18-immortalized human keratinocytes to a malignant phenotype. Proc Natl Acad Sci U S A, v.88, n.2, Jan 15, p.570-4. 1991.

Hwang, S. G., D. Lee, J. Kim, T. Seo e J. Choe. Human papillomavirus type 16 E7 binds to E2F1 and activates E2F1-driven transcription in a retinoblastoma protein-independent manner. J Biol Chem, v.277, n.4, Jan 25, p.2923-30. 2002.

Iarc-Working-Group. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon: WORLD HEALTH ORGANIZATION INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, v.90. 2007

Inca. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER Rio de Janeiro, 2006.

Itoh, Y., A. Ito, K. Iwata, K. Tanzawa, Y. Mori e H. Nagase. Plasma membrane-bound tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 specifically inhibits matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) activated on the cell surface. J Biol Chem, v.273, n.38, Sep 18, p.24360-7. 1998.

Iwasaki, A. e B. L. Kelsall. Localization of distinct Peyer's patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-3alpha, MIP-3beta, and secondary lymphoid organ chemokine. J.Exp.Med., v.191, n.8, p.1381-1394. 2000.

Izadpanah, A., M. B. Dwinell, L. Eckmann, N. M. Varki e M. F. Kagnoff. Regulated MIP-3alpha/CCL20 production by human intestinal epithelium: mechanism for modulating mucosal immunity. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, v.280, n.4, Apr, p.G710-9. 2001.

Jenner, R. G. e R. A. Young. Insights into host responses against pathogens from transcriptional profiling. Nat Rev Microbiol, v.3, n.4, Apr, p.281-94. 2005.

Jenson, A. B., R. J. Kurman e W. D. Lancaster. Tissue effects of and host response to human papillomavirus infection. Obstet Gynecol Clin North Am, v.14, n.2, Jun, p.397-406. 1987.

Jiang, M. e J. Milner. Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells treated with siRNA, a primer of RNA interference. Oncogene, v.21, n.39, Sep 5, p.6041-8. 2002.

Jones, D. L., R. M. Alani e K. Munger. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. Genes Dev., v.11, n.16, p.2101-2111. 1997a.

Jones, D. L., R. M. Alani e K. Munger. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. Genes Dev, v.11, n.16, Aug 15, p.2101-11. 1997b.

Junqueira, L. C. U. J., L.M.M.S. Técnicas básicas de citologia e histologia: Livraria Editora Santos. 1983. 123 1983 p.

Kadish, A. S., G. Y. Ho, R. D. Burk, Y. Wang, S. L. Romney, R. Ledwidge e R. H. Angeletti. Lymphoproliferative responses to human papillomavirus (HPV) type 16 proteins E6 and E7: outcome of HPV infection and associated neoplasia. J Natl Cancer Inst, v.89, n.17, Sep 3, p.1285-93. 1997.

Kanodia, S., L. M. Fahey e W. M. Kast. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. Curr Cancer Drug Targets, v.7, n.1, Feb, p.79-89. 2007.

Kappes, F., K. Burger, M. Baack, F. O. Fackelmayer e C. Gruss. Subcellular localization of the human proto-oncogene protein DEK. J.Biol.Chem., v.276, n.28, p.26317-26323. 2001.

Karin, M. e Y. Ben-Neriah. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. Annu Rev Immunol, v.18, p.621-63. 2000.

Katayama, T., K. Shiota e M. Takahashi. Activin A increases the number of follicle-stimulating hormone cells in anterior pituitary cultures. Mol Cell Endocrinol, v.69, n.2-3, Mar 5, p.179-85. 1990.

Kato, J. Induction of S phase by G1 regulatory factors. Front Biosci., v.4, p.D787-D792. 1999.

Kaur, P. e J. K. Mcdougall. Characterization of primary human keratinocytes transformed by human papillomavirus type 18. J Virol, v.62, n.6, Jun, p.1917-24. 1988.

Kearsey, S. E. e K. Labib. MCM proteins: evolution, properties, and role in DNA replication. Biochim.Biophys.Acta, v.1398, n.2, p.113-136. 1998.

Kearsey, S. E., D. Maiorano, E. C. Holmes e I. T. Todorov. The role of MCM proteins in the cell cycle control of genome duplication. Bioessays, v.18, n.3, p.183-190. 1996.

Kessis, T. D., R. J. Slebos, W. G. Nelson, M. B. Kastan, B. S. Plunkett, S. M. Han, A. T. Lorincz, L. Hedrick e K. R. Cho. Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts

the p53-mediated cellular response to DNA damage. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, v.90, n.9, p.3988-3992. 1993.

Kim, K. Y., L. Blatt e M. W. Taylor. The effects of interferon on the expression of human papillomavirus oncogenes. J Gen Virol, v.81, n.Pt 3, Mar, p.695-700. 2000.

Kimura, T., H. Takeshima, N. Nomiya, T. Nishi, T. Kino, M. Kochi, J. I. Kuratsu e Y. Ushio. Expression of lymphocyte-specific chemokines in human malignant glioma: Essential role of LARC in cellular immunity of malignant glioma. Int.J.Oncol., v.21, n.4, p.707-715. 2002.

Kiyono, T., A. Hiraiwa, M. Fujita, Y. Hayashi, T. Akiyama e M. Ishibashi. Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. Proc Natl Acad Sci U S A, v.94, n.21, Oct 14, p.11612-6. 1997.

Klingelutz, A. J., S. A. Foster e J. K. Mcdougall. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. Nature, v.380, n.6569, Mar 7, p.79-82. 1996.

Klumpp, D. J. e L. A. Laimins. Differentiation-induced changes in promoter usage for transcripts encoding the human papillomavirus type 31 replication protein E1. Virology, v.257, n.1, Apr 25, p.239-46. 1999.

Kojima, I., H. Mogami, N. Kawamura, H. Yasuda e H. Shibata. Modulation of growth of vascular smooth muscle cells by activin A. Exp Cell Res, v.206, n.1, May, p.152-6. 1993.

Kojima, I. e E. Ogata. Dual effect of activin A on cell growth in Balb/c 3T3 cells. Biochem Biophys Res Commun, v.159, n.3, Mar 31, p.1107-13. 1989.

Komine, M., L. S. Rao, T. Kaneko, M. Tomic-Canic, K. Tamaki, I. M. Freedberg e M. Blumenberg. Inflammatory versus proliferative processes in epidermis. Tumor necrosis factor alpha induces K6b keratin synthesis through a transcriptional complex containing NFkappa B and C/EBPbeta. J Biol Chem, v.275, n.41, Oct 13, p.32077-88. 2000.

Kondoh, N., T. Wakatsuki, A. Ryo, A. Hada, T. Aihara, S. Horiuchi, N. Goseki, O. Matsubara, K. Takenaka, M. Shichita, K. Tanaka, M. Shuda e M. Yamamoto. Identification and characterization of genes associated with human hepatocellular carcinogenesis. Cancer Res, v.59, n.19, Oct 1, p.4990-6. 1999.

Koromilas, A. E., S. Li e G. Matlashewski. Control of interferon signaling in human papillomavirus infection. Cytokine Growth Factor Rev, v.12, n.2-3, Jun-Sep, p.157-70. 2001.

Kroes, R. A., A. Jastrow, M. G. Mclone, H. Yamamoto, P. Colley, D. S. Kersey, V. W. Yong, E. Mkrdichian, L. Cerullo, J. Leestma e J. R. Moskal. The identification of novel therapeutic targets for the treatment of malignant brain tumors. Cancer Lett, v.156, n.2, Aug 11, p.191-8. 2000.

Kulasingam, S. L., J. P. Hughes, N. B. Kiviat, C. Mao, N. S. Weiss, J. M. Kuypers e L. A. Koutsky. Evaluation of human papillomavirus testing in primary screening for cervical abnormalities: comparison of sensitivity, specificity, and frequency of referral. Jama, v.288, n.14, Oct 9, p.1749-57. 2002.

Kupper, T. S. e R. C. Fuhlbrigge. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. Nat Rev Immunol, v.4, n.3, Mar, p.211-22. 2004.

Kwanbunjan, K., R. Mas-Ngammueng, P. Chusongsang, Y. Chusongsang, P. Maneekan, Y. Chantaranipapong, S. Pooudong e P. Butraporn. Health and nutrition survey of tsunami victims in Phang-Nga Province, Thailand. Southeast Asian J.Trop.Med.Public Health, v.37, n.2, p.382-387. 2006.

Kyo, S., M. Inoue, N. Hayasaka, T. Inoue, M. Yutsudo, O. Tanizawa e A. Hakura. Regulation of early gene expression of human papillomavirus type 16 by inflammatory cytokines. Virology, v.200, n.1, p.130-139. 1994.

Lakhani, S. R. e A. Ashworth. Microarray and histopathological analysis of tumours: the future and the past? Nat Rev Cancer, v.1, n.2, Nov, p.151-7. 2001.

Lechner, M. S. e L. A. Laimins. Human epithelial cells immortalized by SV40 retain differentiation capabilities in an in vitro raft system and maintain viral DNA extrachromosomally. Virology, v.185, n.2, p.563-571. 1991.

Lechner, M. S. e L. A. Laimins. Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. J.Virol., v.68, n.7, p.4262-4273. 1994.

Lechner, M. S., D. H. Mack, A. B. Finicle, T. Crook, K. H. Vousden e L. A. Laimins. Human papillomavirus E6 proteins bind p53 in vivo and abrogate p53-mediated repression of transcription. Embo J, v.11, n.8, Aug, p.3045-52. 1992.

Lee, S. S., R. S. Weiss e R. T. Javier. Binding of human virus oncoproteins to hDlg/SAP97, a mammalian homolog of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. Proc Natl Acad Sci U S A, v.94, n.13, Jun 24, p.6670-5. 1997.

Levine, A. J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. Cell, v.88, n.3, Feb 7, p.323-31. 1997.

Li, J. J., J. S. Rhim, R. Schlegel, K. H. Vousden e N. H. Colburn. Expression of dominant negative Jun inhibits elevated AP-1 and NF-kappaB transactivation and suppresses anchorage independent growth of HPV immortalized human keratinocytes. Oncogene, v.16, n.21, May 28, p.2711-21. 1998.

Li, T., Y. Li, Z. Y. Han, Q. Chen, M. Y. Qiu, S. Ni, Z. L. Jiang, Y. Xie e Y. M. Mao. [Optimization of T7-based RNA amplification system for cDNA microarray]. Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai), v.35, n.5, May, p.441-8. 2003.

Liao, F., R. Alderson, J. Su, S. J. Ullrich, B. L. Kreider e J. M. Farber. STRL22 is a receptor for the CC chemokine MIP-3alpha. Biochem.Biophys.Res.Comm., v.236, n.1, p.212-217. 1997.

Liao, F., R. L. Rabin, C. S. Smith, G. Sharma, T. B. Nutman e J. M. Farber. CC-chemokine receptor 6 is expressed on diverse memory subsets of T cells and determines responsiveness to macrophage inflammatory protein 3 alpha. J.Immunol., v.162, n.1, p.186-194. 1999.

Liao, F., A. K. Shirakawa, J. F. Foley, R. L. Rabin e J. M. Farber. Human B cells become highly responsive to macrophage-inflammatory protein-3 alpha/CC chemokine ligand-20 after cellular activation without changes in CCR6 expression or ligand binding. J.Immunol., v.168, n.10, p.4871-4880. 2002.

Liotta, L. A., K. Tryggvason, S. Garbisa, I. Hart, C. M. Foltz e S. Shafie. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. Nature, v.284, n.5751, Mar 6, p.67-8. 1980.

Liu, J., M. Zhan, J. A. Hannay, P. Das, S. V. Bolshakov, D. Kotilingam, D. Yu, A. F. Lazar, R. E. Pollock e D. Lev. Wild-type p53 inhibits nuclear factor-kappaB-induced matrix metalloproteinase-9 promoter activation: implications for soft tissue sarcoma growth and metastasis. Mol Cancer Res, v.4, n.11, Nov, p.803-10. 2006.

Liu, X., S. Han, M. A. Baluda e N. H. Park. HPV-16 oncogenes E6 and E7 are mutagenic in normal human oral keratinocytes. Oncogene, v.14, n.19, May 15, p.2347-53. 1997.

Liu, Y. e J. D. Baleja. Structure and function of the papillomavirus E6 protein and its interacting proteins. Front Biosci, v.13, p.121-34. 2008.

- Liu, Y., J. J. Chen, Q. Gao, S. Dalal, Y. Hong, C. P. Mansur, V. Band e E. J. Androphy. Multiple functions of human papillomavirus type 16 E6 contribute to the immortalization of mammary epithelial cells. J Virol, v.73, n.9, Sep, p.7297-307. 1999.
- Longworth, M. S. e L. A. Laimins. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. Microbiol Mol Biol Rev, v.68, n.2, Jun, p.362-72. 2004.
- Lopez, P., F. Vidal, M. Rassoulzadegan e F. Cuzin. A role of inhibin as a tumor suppressor in Sertoli cells: down-regulation upon aging and repression by a viral oncogene. Oncogene, v.18, n.51, Dec 2, p.7303-9. 1999.
- Lorincz, A. T., R. Reid, A. B. Jenson, M. D. Greenberg, W. Lancaster e R. J. Kurman. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. Obstet Gynecol, v.79, n.3, Mar, p.328-37. 1992.
- Lowy, D. R., R. Kirnbauer e J. T. Schiller. Genital human papillomavirus infection. Proc Natl Acad Sci U S A, v.91, n.7, Mar 29, p.2436-40. 1994.
- Luger, T. A., A. Kock, M. Danner, M. Colot e M. Micksche. Production of distinct cytokines by epidermal cells. Br J Dermatol, v.113 Suppl 28, Jul, p.145-56. 1985.
- Luster, A. D. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. N.Engl.J.Med., v.338, n.7, p.436-445. 1998.
- Madine, M. A., M. Swietlik, C. Pelizon, P. Romanowski, A. D. Mills e R. A. Laskey. The roles of the MCM, ORC, and Cdc6 proteins in determining the replication competence of chromatin in quiescent cells. J.Struct.Biol., v.129, n.2-3, p.198-210. 2000.
- Maiorano, D., M. Lutzmann e M. Mechali. MCM proteins and DNA replication. Curr.Opin.Cell Biol., v.18, n.2, p.130-136. 2006.
- Maiorano, D., G. B. Van Assendelft e S. E. Kearsey. Fission yeast cdc21, a member of the MCM protein family, is required for onset of S phase and is located in the nucleus throughout the cell cycle. EMBO J., v.15, n.4, p.861-872. 1996.
- Malejczyk, J., M. Malejczyk, S. Majewski, F. Breitburd, T. A. Luger, S. Jablonska e G. Orth. Increased tumorigenicity of human keratinocytes harboring human papillomavirus type 16 is associated with resistance to endogenous tumor necrosis factor-alpha-mediated growth limitation. Int.J.Cancer, v.56, n.4, p.593-598. 1994.
- Markowitz, D., S. Goff e A. Bank. Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line. Virology, v.167, n.2, Dec, p.400-6. 1988.

Martin, A. G., B. San-Antonio e M. Fresno. Regulation of nuclear factor kappa B transactivation. Implication of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase C zeta in c-Rel activation by tumor necrosis factor alpha. J Biol Chem, v.276, n.19, May 11, p.15840-9. 2001.

Massimi, P., D. Pim, A. Storey e L. Banks. HPV-16 E7 and adenovirus E1a complex formation with TATA box binding protein is enhanced by casein kinase II phosphorylation. Oncogene, v.12, n.11, Jun 6, p.2325-30. 1996.

Matlashewski, G., J. Schneider, L. Banks, N. Jones, A. Murray e L. Crawford. Human papillomavirus type 16 DNA cooperates with activated ras in transforming primary cells. Embo J, v.6, n.6, Jun, p.1741-6. 1987.

Mccance, D. J. Human papillomaviruses and cervical cancer. J Med Microbiol, v.47, n.5, May, p.371-3. 1998.

Mccarthy, S. A. e R. Bicknell. Inhibition of vascular endothelial cell growth by activin-A. J Biol Chem, v.268, n.31, Nov 5, p.23066-71. 1993.

Mcmurray, H. R., D. Nguyen, T. F. Westbrook e D. J. Mcance. Biology of human papillomaviruses. Int.J.Exp.Pathol., v.82, n.1, p.15-33. 2001.

Meyers, C., M. G. Frattini, J. B. Hudson e L. A. Laimins. Biosynthesis of human papillomavirus from a continuous cell line upon epithelial differentiation. Science, v.257, n.5072, Aug 14, p.971-3. 1992.

Miller, A. D. e G. J. Rosman. Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. Biotechniques, v.7, n.9, Oct, p.980-2, 984-6, 989-90. 1989.

Mistry, N., M. Simonsson e M. Evander. Transcriptional activation of the human papillomavirus type 5 and 16 long control region in cells from cutaneous and mucosal origin. Virol J, v.4, p.27. 2007.

Mohr, I. J., R. Clark, S. Sun, E. J. Androphy, P. Macpherson e M. R. Botchan. Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. Science, v.250, n.4988, Dec 21, p.1694-9. 1990.

Moldovan, G. L., B. Pfander e S. Jentsch. PCNA, the maestro of the replication fork. Cell, v.129, n.4, May 18, p.665-79. 2007.

Moore, B. B., D. A. Arenberg, C. L. Addison, M. P. Keane e R. M. Strieter. Tumor angiogenesis is regulated by CXC chemokines. J.Lab Clin.Med., v.132, n.2, p.97-103. 1998.

Mukherjee, G., B. Muralidhar, U. D. Bafna, R. A. Laskey e N. Coleman. MCM immunocytochemistry as a first line cervical screening test in developing countries: a prospective cohort study in a regional cancer centre in India. Br J Cancer, v.96, n.7, Apr 10, p.1107-11. 2007.

Munger, K., J. R. Basile, S. Duensing, A. Eichten, S. L. Gonzalez, M. Grace e V. L. Zacny. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. Oncogene, v.20, n.54, p.7888-7898. 2001.

Munger, K., W. C. Phelps, V. Bubb, P. M. Howley e R. Schlegel. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. J.Virol., v.63, n.10, p.4417-4421. 1989.

Munger, K., J. A. Pietenpol, M. R. Pittelkow, J. T. Holt e H. L. Moses. Transforming growth factor beta 1 regulation of c-myc expression, pRB phosphorylation, and cell cycle progression in keratinocytes. Cell Growth Differ., v.3, n.5, p.291-298. 1992.

Munger, K., B. A. Werness, N. Dyson, W. C. Phelps, E. Harlow e P. M. Howley. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. EMBO J., v.8, n.13, p.4099-4105. 1989.

Musahl, C., H. P. Holthoff, R. Lesch e R. Knippers. Stability of the replicative Mcm3 protein in proliferating and differentiating human cells. Exp.Cell Res., v.241, n.1, p.260-264. 1998.

Nair, A., M. Venkatraman, T. T. Maliekal, B. Nair e D. Karunagaran. NF-kappaB is constitutively activated in high-grade squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinomas of the human uterine cervix. Oncogene, v.22, n.1, Jan 9, p.50-8. 2003.

Nakayama, T., R. Fujisawa, H. Yamada, T. Horikawa, H. Kawasaki, K. Hieshima, D. Izawa, S. Fujie, T. Tezuka e O. Yoshie. Inducible expression of a CC chemokine liver- and activation-regulated chemokine (LARC)/macrophage inflammatory protein (MIP)-3 alpha/CCL20 by epidermal keratinocytes and its role in atopic dermatitis. Int Immunol, v.13, n.1, Jan, p.95-103. 2001.

Narisawa-Saito, M. e T. Kiyono. Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins. Cancer Sci, v.98, n.10, Oct, p.1505-11. 2007.

Nees, M., J. M. Geoghegan, T. Hyman, S. Frank, L. Miller e C. D. Woodworth. Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive

genes and upregulate proliferation-associated and NF-kappaB-responsive genes in cervical keratinocytes. J Virol, v.75, n.9, May, p.4283-96. 2001.

Nishimura, M., K. Kaku, Y. Azuno, K. Okafuji, Y. Etoh, M. Shiozaki, H. Sasaki, T. Inoue e T. Kaneko. Effect of erythroid differentiation factor on megakaryocytic differentiation of L8057, a murine megakaryoblastic leukemia cell line. Biochem Biophys Res Commun, v.181, n.3, Dec 31, p.1042-7. 1991.

Noya, F., W. M. Chien, T. R. Broker e L. T. Chow. p21cip1 Degradation in differentiated keratinocytes is abrogated by costabilization with cyclin E induced by human papillomavirus E7. J.Virol., v.75, n.13, p.6121-6134. 2001.

O'connor M, A. D., Bernard Hu. DNA tumor viruses: papilloma. San Diego: Encyclopedia of cancer. 1997. 520-31 p.

Ogawa, Y., D. K. Schmidt, R. M. Nathan, R. M. Armstrong, K. L. Miller, S. J. Sawamura, J. M. Ziman, K. L. Erickson, E. R. De Leon, D. M. Rosen e Et Al. Bovine bone activin enhances bone morphogenetic protein-induced ectopic bone formation. J Biol Chem, v.267, n.20, Jul 15, p.14233-7. 1992.

Oh, S. T., S. Kyo e L. A. Laimins. Telomerase activation by human papillomavirus type 16 E6 protein: induction of human telomerase reverse transcriptase expression through Myc and GC-rich Sp1 binding sites. J Virol, v.75, n.12, Jun, p.5559-66. 2001.

Opdenakker, G. e J. Van Damme. The countercurrent principle in invasion and metastasis of cancer cells. Recent insights on the roles of chemokines. Int J Dev Biol, v.48, n.5-6, p.519-27. 2004.

Orlic, M., C. E. Spencer, L. Wang e B. L. Gallie. Expression analysis of 6p22 genomic gain in retinoblastoma. Genes Chromosomes Cancer, v.45, n.1, Jan, p.72-82. 2006.

Osborn, M. IUBMB: the first half-century. Trends Biochem Sci, v.30, n.6, Jun, p.273-5. 2005.

Pahl, H. L. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. Oncogene, v.18, n.49, Nov 22, p.6853-66. 1999.

Pao, C. C., C. Y. Lin, D. S. Yao e C. J. Tseng. Differential expression of cytokine genes in cervical cancer tissues. Biochem.Biophys.Res.Commun., v.214, n.3, p.1146-1151. 1995.

Park, J. S., E. J. Kim, H. J. Kwon, E. S. Hwang, S. E. Namkoong e S. J. Um. Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7

oncoprotein. Implication for the E7-mediated immune evasion mechanism in cervical carcinogenesis. J.Biol.Chem., v.275, n.10, p.6764-6769. 2000.

Parkin, D. M., F. I. Bray e S. S. Devesa. Cancer burden in the year 2000. The global picture. Eur J Cancer, v.37 Suppl 8, Oct, p.S4-66. 2001.

Patel, D., S. M. Huang, L. A. Baglia e D. J. Mccance. The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300. Embo J, v.18, n.18, Sep 15, p.5061-72. 1999.

Paul, N. L. e N. H. Ruddle. Lymphotoxin. Annu Rev Immunol, v.6, p.407-38. 1988.

Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res, v.29, n.9, May 1, p.e45. 2001.

Phillips, A. C. e K. H. Vousden. Analysis of the interaction between human papillomavirus type 16 E7 and the TATA-binding protein, TBP. J Gen Virol, v.78 (Pt 4), Apr, p.905-9. 1997.

Pietenpol, J. A., R. W. Stein, E. Moran, P. Yaciuk, R. Schlegel, R. M. Lyons, M. R. Pittelkow, K. Munger, P. M. Howley e H. L. Moses. TGF-beta 1 inhibition of c-myc transcription and growth in keratinocytes is abrogated by viral transforming proteins with pRB binding domains. Cell, v.61, n.5, p.777-785. 1990.

Pillai, S., D. D. Bikle, T. E. Eessalu, B. B. Aggarwal e P. M. Elias. Binding and biological effects of tumor necrosis factor alpha on cultured human neonatal foreskin keratinocytes. J.Clin.Invest, v.83, n.3, p.816-821. 1989.

Pirisi, L., S. Yasumoto, M. Feller, J. Doniger e J. A. Dipaolo. Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. J Viro, v.61, n.4, Apr, p.1061-6. 1987.

Pisani, P., F. Bray e D. M. Parkin. Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. Int J Cancer, v.97, n.1, Jan 1, p.72-81. 2002.

Pomeroy, S. L., P. Tamayo, M. Gaasenbeek, L. M. Sturla, M. Angelo, M. E. McLaughlin, J. Y. Kim, L. C. Goumnerova, P. M. Black, C. Lau, J. C. Allen, D. Zagzag, J. M. Olson, T. Curran, C. Wetmore, J. A. Biegel, T. Poggio, S. Mukherjee, R. Rifkin, A. Califano, G. Stolovitzky, D. N. Louis, J. P. Mesirov, E. S. Lander e T. R. Golub. Prediction of central nervous system embryonal tumour outcome based on gene expression. Nature, v.415, n.6870, Jan 24, p.436-42. 2002.

Power, C. A., D. J. Church, A. Meyer, S. Alouani, A. E. Proudfoot, I. Clark-Lewis, S. Sozzani, A. Mantovani e T. N. Wells. Cloning and characterization of a specific

receptor for the novel CC chemokine MIP-3 α from lung dendritic cells. J.Exp.Med., v.186, n.6, p.825-835. 1997.

Raman, D., P. J. Baugher, Y. M. Thue e A. Richmond. Role of chemokines in tumor growth. Cancer Lett, v.256, n.2, Oct 28, p.137-65. 2007.

Reeck, G. R., P. J. Isackson e D. C. Teller. Domain structure in high molecular weight high mobility group nonhistone chromatin proteins. Nature, v.300, n.5887, p.76-78. 1982.

Reich, R., B. Stratford, K. Klein, G. R. Martin, R. A. Mueller e G. C. Fuller. Inhibitors of collagenase IV and cell adhesion reduce the invasive activity of malignant tumour cells. Ciba Found Symp, v.141, p.193-210. 1988.

Robertson, D. M., E. Pruyssers, H. G. Burger, T. Jobling, J. Mcneilage e D. Healy. Inhibins and ovarian cancer. Mol Cell Endocrinol, v.225, n.1-2, Oct 15, p.65-71. 2004.

Roden, R. B., P. M. Day, B. K. Bronzo, W. H. T. Yutzy, Y. Yang, D. R. Lowy e J. T. Schiller. Positively charged termini of the L2 minor capsid protein are necessary for papillomavirus infection. J Virol, v.75, n.21, Nov, p.10493-7. 2001.

Rolfe, M., P. Beer-Romero, S. Glass, J. Eckstein, I. Berdo, A. Theodoras, M. Pagano e G. Draetta. Reconstitution of p53-ubiquitinylation reactions from purified components: the role of human ubiquitin-conjugating enzyme UBC4 and E6-associated protein (E6AP). Proc Natl Acad Sci U S A, v.92, n.8, Apr 11, p.3264-8. 1995.

Romanczuk, H., L. L. Villa, R. Schlegel e P. M. Howley. The viral transcriptional regulatory region upstream of the E6 and E7 genes is a major determinant of the differential immortalization activities of human papillomavirus types 16 and 18. J.Virol., v.65, n.5, p.2739-2744. 1991.

Ronco, L. V., A. Y. Karpova, M. Vidal e P. M. Howley. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. Genes Dev, v.12, n.13, Jul 1, p.2061-72. 1998.

Rosl, F., M. Lengert, J. Albrecht, K. Kleine, R. Zawatzky, B. Schraven e H. H. Zur. Differential regulation of the JE gene encoding the monocyte chemoattractant protein (MCP-1) in cervical carcinoma cells and derived hybrids. J.Virol., v.68, n.4, p.2142-2150. 1994.

Rossi, D. e A. Zlotnik. The biology of chemokines and their receptors. Annu.Rev.Immunol., v.18, p.217-242. 2000.

Rossi, D. L., A. P. Vicari, K. Franz-Bacon, T. K. McClanahan e A. Zlotnik. Identification through bioinformatics of two new macrophage proinflammatory human chemokines: MIP-3alpha and MIP-3beta. J.Immunol., v.158, n.3, p.1033-1036. 1997.

Rot, A. e U. H. Von Andrian. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokinese grammar for immune cells. Annu.Rev.Immunol., v.22, p.891-928. 2004.

Rothe, J., G. Gehr, H. Loetscher e W. Lesslauer. Tumor necrosis factor receptors--structure and function. Immunol Res, v.11, n.2, p.81-90. 1992.

Rottman, J. B. Key role of chemokines and chemokine receptors in inflammation, immunity, neoplasia, and infectious disease. Vet Pathol, v.36, n.5, Sep, p.357-67. 1999.

Rubin, B. Y., S. L. Anderson, S. A. Sullivan, B. D. Williamson, E. A. Carswell e L. J. Old. Nonhematopoietic cells selected for resistance to tumor necrosis factor produce tumor necrosis factor. J Exp Med, v.164, n.4, Oct 1, p.1350-5. 1986.

Ruesch, M. N. e L. A. Laimins. Initiation of DNA synthesis by human papillomavirus E7 oncoproteins is resistant to p21-mediated inhibition of cyclin E-cdk2 activity. J.Virol., v.71, n.7, p.5570-5578. 1997.

Sammons, M., S. S. Wan, N. L. Vogel, E. J. Mientjes, G. Grosveld e B. P. Ashburner. Negative regulation of the RelA/p65 transactivation function by the product of the DEK proto-oncogene. J Biol Chem, v.281, n.37, Sep 15, p.26802-12. 2006.

Santoro, M. G., A. Rossi e C. Amici. NF-kappaB and virus infection: who controls whom. Embo J, v.22, n.11, Jun 2, p.2552-60. 2003.

Sasaki, N., T. Morisaki, K. Hashizume, T. Yao, M. Tsuneyoshi, H. Noshiro, K. Nakamura, T. Yamanaka, A. Uchiyama, M. Tanaka e M. Katano. Nuclear factor-kappaB p65 (RelA) transcription factor is constitutively activated in human gastric carcinoma tissue. Clin Cancer Res, v.7, n.12, Dec, p.4136-42. 2001.

Scheffner, M. Ubiquitin, E6-AP, and their role in p53 inactivation. Pharmacol Ther, v.78, n.3, Jun, p.129-39. 1998.

Scheffner, M., J. M. Huibregtse, R. D. Vierstra e P. M. Howley. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. Cell, v.75, n.3, Nov 5, p.495-505. 1993.

Scheffner, M., B. A. Werness, J. M. Huibregtse, A. J. Levine e P. M. Howley. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. Cell, v.63, n.6, p.1129-1136. 1990.

Schiller, J. T., W. C. Vass, K. H. Vousden e D. R. Lowy. E5 open reading frame of bovine papillomavirus type 1 encodes a transforming gene. J Virol, v.57, n.1, Jan, p.1-6. 1986.

Schilling, B., T. De Medina, J. Syken, M. Vidal e K. Munger. A novel human DnaJ protein, hTid-1, a homolog of the Drosophila tumor suppressor protein Tid56, can interact with the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. Virology, v.247, n.1, p.74-85. 1998.

Schlecht, N. F., S. Kulaga, J. Robitaille, S. Ferreira, M. Santos, R. A. Miyamura, E. Duarte-Franco, T. E. Rohan, A. Ferenczy, L. L. Villa e E. L. Franco. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. JAMA, v.286, n.24, p.3106-3114. 2001.

Schlegel, R., W. C. Phelps, Y. L. Zhang e M. Barbosa. Quantitative keratinocyte assay detects two biological activities of human papillomavirus DNA and identifies viral types associated with cervical carcinoma. Embo J, v.7, n.10, Oct, p.3181-7. 1988.

Schoenfeld, H. J., B. Poeschl, J. R. Frey, H. Loetscher, W. Hunziker, A. Lustig e M. Zulauf. Efficient purification of recombinant human tumor necrosis factor beta from Escherichia coli yields biologically active protein with a trimeric structure that binds to both tumor necrosis factor receptors. J Biol Chem, v.266, n.6, Feb 25, p.3863-9. 1991.

Schramm, A., V. Von Schuetz, H. Christiansen, W. Havers, M. Papoutsis, J. Wilting e L. Schweigerer. High activin A-expression in human neuroblastoma: suppression of malignant potential and correlation with favourable clinical outcome. Oncogene, v.24, n.4, Jan 20, p.680-7. 2005.

Schuttyser, E., S. Struyf e J. Van Damme. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. Cytokine Growth Factor Rev, v.14, n.5, Oct, p.409-26. 2003.

Scott, I. S., E. Odell, P. Chatrath, L. S. Morris, R. J. Davies, S. L. Vowler, R. A. Laskey e N. Coleman. A minimally invasive immunocytochemical approach to early detection of oral squamous cell carcinoma and dysplasia. Br.J.Cancer, v.94, n.8, p.1170-1175. 2006.

Sedjo, R. L., P. Inserra, M. Abrahamsen, R. B. Harris, D. J. Roe, S. Baldwin e A. R. Giuliano. Human papillomavirus persistence and nutrients involved in the methylation pathway among a cohort of young women. Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev., v.11, n.4, p.353-359. 2002.

Seitz, C. S., H. Deng, K. Hinata, Q. Lin e P. A. Khavari. Nuclear factor kappaB subunits induce epithelial cell growth arrest. Cancer Res, v.60, n.15, Aug 1, p.4085-92. 2000.

Seitz, C. S., Q. Lin, H. Deng e P. A. Khavari. Alterations in NF-kappaB function in transgenic epithelial tissue demonstrate a growth inhibitory role for NF-kappaB. Proc Natl Acad Sci U S A, v.95, n.5, Mar 3, p.2307-12. 1998.

Sethi, G., B. Sung e B. B. Aggarwal. TNF: a master switch for inflammation to cancer. Front Biosci, v.13, p.5094-107. 2008.

Shao, L., N. L. Frigon, Jr., D. W. Sehy, A. L. Yu, J. Lofgren, R. Schwall e J. Yu. Regulation of production of activin A in human marrow stromal cells and monocytes. Exp Hematol, v.20, n.10, Nov, p.1235-42. 1992.

Shao, L. E., N. L. Frigon, Jr., A. Yu, J. Palyash e J. Yu. Contrasting effects of inflammatory cytokines and glucocorticoids on the production of activin A in human marrow stromal cells and their implications. Cytokine, v.10, n.3, Mar, p.227-35. 1998.

Sheu, B. C., H. C. Lien, H. N. Ho, H. H. Lin, S. N. Chow, S. C. Huang e S. M. Hsu. Increased expression and activation of gelatinolytic matrix metalloproteinases is associated with the progression and recurrence of human cervical cancer. Cancer Res, v.63, n.19, Oct 1, p.6537-42. 2003.

Sheu, W. H., W. J. Lee, L. Y. Lin, R. L. Chang e Y. T. Chen. Tumor necrosis factor alpha -238 and -308 polymorphisms do not associate with insulin resistance in hypertensive subjects. Metabolism, v.50, n.12, Dec, p.1447-51. 2001.

Shirakawa, H. e M. Yoshida. Existence of a transcription factor for the human HMG2 gene positively related to the level of HMG2 mRNA in the cells. Biochemistry, v.34, n.8, p.2521-2527. 1995.

Singh, J. e G. H. Dixon. High mobility group proteins 1 and 2 function as general class II transcription factors. Biochemistry, v.29, n.26, p.6295-6302. 1990.

Sitwala, K. V., K. Adams e D. M. Markovitz. YY1 and NF-Y binding sites regulate the transcriptional activity of the dek and dek-can promoter. Oncogene, v.21, n.57, Dec 12, p.8862-70. 2002.

Sitwala, K. V., N. Mor-Vaknin e D. M. Markovitz. Minireview: DEK and gene regulation, oncogenesis and AIDS. Anticancer Res, v.23, n.3A, p.2155-2158. 2003.

Smotkin, D., H. Prokoph e F. O. Wettstein. Oncogenic and nononcogenic human genital papillomaviruses generate the E7 mRNA by different mechanisms. J Virol, v.63, n.3, Mar, p.1441-7. 1989.

Soares, L. M., K. Zanier, C. Mackereth, M. Sattler e J. Valcarcel. Intron removal requires proofreading of U2AF/3' splice site recognition by DEK. Science, v.312, n.5782, Jun 30, p.1961-5. 2006.

Soto, U., B. C. Das, M. Lengert, P. Finzer, H. Zur Hausen e F. Rosl. Conversion of HPV 18 positive non-tumorigenic HeLa-fibroblast hybrids to invasive growth involves loss of TNF-alpha mediated repression of viral transcription and modification of the AP-1 transcription complex. Oncogene, v.18, n.21, May 27, p.3187-98. 1999.

Southern, E., K. Mir e M. Shchepinov. Molecular interactions on microarrays. Nat Genet, v.21, n.1 Suppl, Jan, p.5-9. 1999.

Spitkovsky, D., S. P. Hehner, T. G. Hofmann, A. Moller e M. L. Schmitz. The human papillomavirus oncoprotein E7 attenuates NF-kappa B activation by targeting the Ikappa B kinase complex. J Biol Chem, v.277, n.28, Jul 12, p.25576-82. 2002.

Steger, G. e S. Corbach. Dose-dependent regulation of the early promoter of human papillomavirus type 18 by the viral E2 protein. J Virol, v.71, n.1, Jan, p.50-8. 1997.

Stetler-Stevenson, W. G. Dynamics of matrix turnover during pathologic remodeling of the extracellular matrix. Am J Pathol, v.148, n.5, May, p.1345-50. 1996.

Stoeber, K., T. D. Tlsty, L. Happerfield, G. A. Thomas, S. Romanov, L. Bobrow, E. D. Williams e G. H. Williams. DNA replication licensing and human cell proliferation. J.Cell Sci., v.114, n.Pt 11, p.2027-2041. 2001.

Stoler, M. H., C. R. Rhodes, A. Whitbeck, S. M. Wolinsky, L. T. Chow e T. R. Broker. Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias. Hum.Pathol., v.23, n.2, p.117-128. 1992.

Storey, A., M. Thomas, A. Kalita, C. Harwood, D. Gardiol, F. Mantovani, J. Breuer, I. M. Leigh, G. Matlashewski e L. Banks. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. Nature, v.393, n.6682, May 21, p.229-34. 1998.

Strieter, R. M., P. J. Polverini, D. A. Arenberg e S. L. Kunkel. The role of CXC chemokines as regulators of angiogenesis. Shock, v.4, n.3, Sep, p.155-60. 1995.

Strieter, R. M., P. J. Polverini, S. L. Kunkel, D. A. Arenberg, M. D. Burdick, J. Kasper, J. Dzuiba, J. Van Damme, A. Walz e D. Marriott. The functional role of the ELR motif

in CXC chemokine-mediated angiogenesis. J.Biol.Chem., v.270, n.45, p.27348-27357. 1995.

Strieter, R. M., P. J. Polverini, S. L. Kunkel, D. A. Arenberg, M. D. Burdick, J. Kasper, J. Dzuiba, J. Van Damme, A. Walz, D. Marriott e Et Al. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. J Biol Chem, v.270, n.45, Nov 10, p.27348-57. 1995.

Stubenrauch, F., A. M. Colbert e L. A. Laimins. Transactivation by the E2 protein of oncogenic human papillomavirus type 31 is not essential for early and late viral functions. J Virool, v.72, n.10, Oct, p.8115-23. 1998.

Sugino, H., T. Nakamura, Y. Hasegawa, K. Miyamoto, Y. Abe, M. Igarashi, Y. Eto, H. Shibai e K. Titani. Erythroid differentiation factor can modulate follicular granulosa cell functions. Biochem Biophys Res Commun, v.153, n.1, May 31, p.281-8. 1988.

Szatmary, Z. Tumor necrosis factor-alpha: molecular-biological aspects minireview. Neoplasma, v.46, n.5, p.257-66. 1999.

Takahashi, S., K. Uchimaru, K. Harigaya, S. Asano e T. Yamashita. Tumor necrosis factor and interleukin-1 induce activin A gene expression in a human bone marrow stromal cell line. Biochem Biophys Res Commun, v.188, n.1, Oct 15, p.310-7. 1992.

Tanaka, Y., T. Imai, M. Baba, I. Ishikawa, M. Uehira, H. Nomiya e O. Yoshie. Selective expression of liver and activation-regulated chemokine (LARC) in intestinal epithelium in mice and humans. Eur J Immunol, v.29, n.2, Feb, p.633-42. 1999.

Tartaglia, L. A., M. Rothe, Y. F. Hu e D. V. Goeddel. Tumor necrosis factor's cytotoxic activity is signaled by the p55 TNF receptor. Cell, v.73, n.2, Apr 23, p.213-6. 1993.

Tay, S. K., D. Jenkins, P. Maddox, M. Campion e A. Singer. Subpopulations of Langerhans' cells in cervical neoplasia. Br J Obstet Gynaecol, v.94, n.1, Jan, p.10-5. 1987.

Termini, L., E. Boccardo, G. H. Esteves, R. Hirata, Jr., W. K. Martins, A. E. Colo, E. J. Neves, L. L. Villa e L. F. Reis. Characterization of global transcription profile of normal and HPV-immortalized keratinocytes and their response to TNF treatment. BMC Med Genomics, v.1, p.29. 2008.

Tessier, P. A., P. H. Naccache, I. Clark-Lewis, R. P. Gladue, K. S. Neote e S. R. Mccoll. Chemokine networks in vivo: involvement of C-X-C and C-C chemokines in neutrophil extravasation in vivo in response to TNF-alpha. J Immunol, v.159, n.7, Oct 1, p.3595-602. 1997.

Thomas, J. T., W. G. Hubert, M. N. Ruesch e L. A. Laimins. Human papillomavirus type 31 oncoproteins E6 and E7 are required for the maintenance of episomes during the viral life cycle in normal human keratinocytes. Proc Natl Acad Sci U S A, v.96, n.15, Jul 20, p.8449-54. 1999.

Thomas, M. e L. Banks. Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. Oncogene, v.17, n.23, Dec 10, p.2943-54. 1998.

Thomas, M. e L. Banks. Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. J Gen Virol, v.80 (Pt 6), Jun, p.1513-7. 1999.

Thompson, D. A., V. Zacny, G. S. Belinsky, M. Classon, D. L. Jones, R. Schlegel e K. Munger. The HPV E7 oncoprotein inhibits tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis in normal human fibroblasts. Oncogene, v.20, n.28, Jun 21, p.3629-40. 2001.

Thones, N., A. Herreiner, L. Schadlich, K. Piuko e M. Muller. A direct comparison of human papillomavirus type 16 L1 particles reveals a lower immunogenicity of capsomeres than viruslike particles with respect to the induced antibody response. J Virol, v.82, n.11, Jun, p.5472-85. 2008.

Thorgeirsson, U. P., T. Turpeenniemi-Hujanen e L. A. Liotta. Cancer cells, components of basement membranes, and proteolytic enzymes. Int Rev Exp Pathol, v.27, p.203-34. 1985.

Tohyama, M., Y. Shirakara, K. Yamasaki, K. Sayama e K. Hashimoto. Differentiated keratinocytes are responsible for TNF-alpha regulated production of macrophage inflammatory protein 3alpha/CCL20, a potent chemokine for Langerhans cells. J Dermatol Sci, v.27, n.2, Oct, p.130-9. 2001.

Tong, S., E. M. Wallace e H. G. Burger. Inhibins and activins: clinical advances in reproductive medicine. Clin Endocrinol (Oxf), v.58, n.2, Feb, p.115-27. 2003.

Tracey, K. J. The inflammatory reflex. Nature, v.420, n.6917, Dec 19-26, p.853-9. 2002.

Tremethick, D. J. e P. L. Molloy. High mobility group proteins 1 and 2 stimulate transcription in vitro by RNA polymerases II and III. J Biol Chem, v.261, n.15, May 25, p.6986-92. 1986.

Tremethick, D. J. e P. L. Molloy. Effects of high mobility group proteins 1 and 2 on initiation and elongation of specific transcription by RNA polymerase II in vitro. Nucleic Acids Res, v.16, n.23, Dec 9, p.11107-23. 1988.

Trottier, H. e E. L. Franco. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. Vaccine, v.24 Suppl 1, Mar 30, p.S1-15. 2006.

Tungteakkhun, S. S. e P. J. Duerksen-Hughes. Cellular binding partners of the human papillomavirus E6 protein. Arch Virol, v.153, n.3, p.397-408. 2008.

Van Den Brule, A. J., C. J. Meijer, V. Bakels, P. Kenemans e J. M. Walboomers. Rapid detection of human papillomavirus in cervical scrapes by combined general primer-mediated and type-specific polymerase chain reaction. J Clin Microbiol, v.28, n.12, Dec, p.2739-43. 1990.

Van Hogerlinden, M., B. L. Rozell, L. Ahrlund-Richter e R. Toftgard. Squamous cell carcinomas and increased apoptosis in skin with inhibited Rel/nuclear factor-kappaB signaling. Cancer Res, v.59, n.14, Jul 15, p.3299-303. 1999.

Vancurova, I., R. Wu, V. Miskolci e S. Sun. Increased p50/p50 NF-kappaB activation in human papillomavirus type 6- or type 11-induced laryngeal papilloma tissue. J Virol, v.76, n.3, Feb, p.1533-6. 2002.

Vandercappellen, J., J. Van Damme e S. Struyf. The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. Cancer Lett, Jun 23. 2008.

Veldman, T., I. Horikawa, J. C. Barrett e R. Schlegel. Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. J Virol, v.75, n.9, May, p.4467-72. 2001.

Veldman, T., X. Liu, H. Yuan e R. Schlegel. Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. Proc Natl Acad Sci U S A, v.100, n.14, Jul 8, p.8211-6. 2003.

Verma, I. M., J. K. Stevenson, E. M. Schwarz, D. Van Antwerp e S. Miyamoto. Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. Genes Dev, v.9, n.22, Nov 15, p.2723-35. 1995.

Vieira, K. B., D. J. Goldstein e L. L. Villa. Tumor necrosis factor alpha interferes with the cell cycle of normal and papillomavirus-immortalized human keratinocytes. Cancer Res., v.56, n.10, p.2452-2457. 1996.

Villa, L. L. Human papillomaviruses and cervical cancer. Adv.Cancer Res., v.71, p.321-341. 1997.

Villa, L. L. e R. Schlegel. Differences in transformation activity between HPV-18 and HPV-16 map to the viral LCR-E6-E7 region. Virology, v.181, n.1, p.374-377. 1991.

Villa, L. L., K. B. Vieira, X. F. Pei e R. Schlegel. Differential effect of tumor necrosis factor on proliferation of primary human keratinocytes and cell lines containing human papillomavirus types 16 and 18. Mol.Carcinog., v.6, n.1, p.5-9. 1992.

Volkov, I. The master key effect of vitamin B12 in treatment of malignancy--a potential therapy? Med Hypotheses, v.70, n.2, p.324-8. 2008.

Von Lindern, M., M. Fornerod, S. Van Baal, M. Jaegle, T. De Wit, A. Buijs e G. Grosveld. The translocation (6;9), associated with a specific subtype of acute myeloid leukemia, results in the fusion of two genes, dek and can, and the expression of a chimeric, leukemia-specific dek-can mRNA. Mol Cell Biol, v.12, n.4, Apr, p.1687-97. 1992.

Von Lindern, M., A. Poustka, H. Lerach e G. Grosveld. The (6;9) chromosome translocation, associated with a specific subtype of acute nonlymphocytic leukemia, leads to aberrant transcription of a target gene on 9q34. Mol.Cell Biol., v.10, n.8, p.4016-4026. 1990.

Vousden, K. H., J. Doniger, J. A. Dipaolo e D. R. Lowy. The E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 encodes a transforming gene. Oncogene Res, v.3, n.2, Sep, p.167-75. 1988.

Vu, T. H., J. M. Shipley, G. Bergers, J. E. Berger, J. A. Helms, D. Hanahan, S. D. Shapiro, R. M. Senior e Z. Werb. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. Cell, v.93, n.3, May 1, p.411-22. 1998.

Waga, S., S. Mizuno e M. Yoshida. Chromosomal protein HMG1 removes the transcriptional block caused by the cruciform in supercoiled DNA. J.Biol.Chem., v.265, n.32, p.19424-19428. 1990.

Waga, S., H. Shirakawa, S. Mizuno e M. Yoshida. The selective binding of HMG1 to the cruciform DNA structure and the subsequent resumption of transcription. Nucleic Acids Symp.Ser., n.22, p.81-82. 1990.

Wakefield, L. M. e A. B. Roberts. TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. Curr Opin Genet Dev, v.12, n.1, Feb, p.22-9. 2002.

Waldmann, T., I. Scholten, F. Kappes, H. G. Hu e R. Knippers. The DEK protein--an abundant and ubiquitous constituent of mammalian chromatin. Gene, v.343, n.1, p.1-9. 2004.

Wallach, D., E. E. Varfolomeev, N. L. Malinin, Y. V. Goltsev, A. V. Kovalenko e M. P. Boldin. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. Annu.Rev.Immunol., v.17, p.331-367. 1999.

Wang, T., D. Hopkins, C. Schmidt, S. Silva, R. Houghton, H. Takita, E. Repasky e S. G. Reed. Identification of genes differentially over-expressed in lung squamous cell carcinoma using combination of cDNA subtraction and microarray analysis. Oncogene, v.19, n.12, Mar 16, p.1519-28. 2000.

Wang, W., J. L. Abbruzzese, D. B. Evans, L. Larry, K. R. Cleary e P. J. Chiao. The nuclear factor-kappa B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells. Clin Cancer Res, v.5, n.1, Jan, p.119-27. 1999.

Watanabe, S., T. Kanda e K. Yoshiike. Human papillomavirus type 16 transformation of primary human embryonic fibroblasts requires expression of open reading frames E6 and E7. J Virol, v.63, n.2, Feb, p.965-9. 1989.

Watt, F. M. Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, v.353, n.1370, Jun 29, p.831-7. 1998.

Williams, G. H., P. Romanowski, L. Morris, M. Madine, A. D. Mills, K. Stoeber, J. Marr, R. A. Laskey e N. Coleman. Improved cervical smear assessment using antibodies against proteins that regulate DNA replication. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., v.95, n.25, p.14932-14937. 1998.

Wise-Draper, T. M., H. V. Allen, E. E. Jones, K. B. Habash, H. Matsuo e S. I. Wells. Apoptosis inhibition by the human DEK oncoprotein involves interference with p53 functions. Mol Cell Biol, v.26, n.20, Oct, p.7506-19. 2006.

Wise-Draper, T. M., H. V. Allen, M. N. Thobe, E. E. Jones, K. B. Habash, K. Munger e S. I. Wells. The human DEK proto-oncogene is a senescence inhibitor and an upregulated target of high-risk human papillomavirus E7. J.Virol., v.79, n.22, p.14309-14317. 2005.

Wolpe, S. D., B. Sherry, D. Juers, G. Davatellis, R. W. Yurt e A. Cerami. Identification and characterization of macrophage inflammatory protein 2. Proc Natl Acad Sci U S A, v.86, n.2, Jan, p.612-6. 1989.

Wong, G. H., L. A. Tartaglia, M. S. Lee e D. V. Goeddel. Antiviral activity of tumor necrosis factor is signaled through the 55-kDa type I TNF receptor [corrected]. J Immunol, v.149, n.10, Nov 15, p.3350-3. 1992.

Woodruff, T. K. Regulation of cellular and system function by activin. Biochem Pharmacol, v.55, n.7, Apr 1, p.953-63. 1998.

Woodworth, C. D., S. Waggoner, W. Barnes, M. H. Stoler e J. A. Dipaolo. Human cervical and foreskin epithelial cells immortalized by human papillomavirus DNAs exhibit dysplastic differentiation in vivo. Cancer Res, v.50, n.12, Jun 15, p.3709-15. 1990.

Yamashita, T., S. Takahashi e E. Ogata. Expression of activin A/erythroid differentiation factor in murine bone marrow stromal cells. Blood, v.79, n.2, Jan 15, p.304-7. 1992.

Yamazaki, F., Y. Nagatsuka, H. Shirakawa e M. Yoshida. Repression of cell cycle progression by antisense HMG2 RNA. Biochem.Biophys.Res.Commun., v.210, n.3, p.1045-1051. 1995.

Yasuda, H., T. Mine, H. Shibata, Y. Eto, Y. Hasegawa, T. Takeuchi, S. Asano e I. Kojima. Activin A: an autocrine inhibitor of initiation of DNA synthesis in rat hepatocytes. J Clin Invest, v.92, n.3, Sep, p.1491-6. 1993.

Yu, A. W., L. E. Shao, N. L. Frigon, Jr. e J. Yu. Detection of functional and dimeric activin A in human marrow microenvironment. Implications for the modulation of erythropoiesis. Ann N Y Acad Sci, v.718, Apr 15, p.285-98; discussion 298-9. 1994.

Yu, E. W., K. E. Dolter, L. E. Shao e J. Yu. Suppression of IL-6 biological activities by activin A and implications for inflammatory arthropathies. Clin Exp Immunol, v.112, n.1, Apr, p.126-32. 1998.

Zerfass, K., A. Schulze, D. Spitkovsky, V. Friedman, B. Henglein e P. Jansen-Durr. Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. J Virol, v.69, n.10, Oct, p.6389-99. 1995.

Zhai, Y., K. B. Hotary, B. Nan, F. X. Bosch, N. Munoz, S. J. Weiss e K. R. Cho. Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase is associated with cervical carcinoma progression and invasion. Cancer Res, v.65, n.15, Aug 1, p.6543-50. 2005.

Zhao, J., J. Roth, B. Bode-Lesniewska, M. Pfaltz, P. U. Heitz e P. Komminoth. Combined comparative genomic hybridization and genomic microarray for detection of gene amplifications in pulmonary artery intimal sarcomas and adrenocortical tumors. Genes Chromosomes Cancer, v.34, n.1, May, p.48-57. 2002.

Zhou, W., S. K. Tying, M. Brysk e T. S. Chan. Immortalization of differentiated human keratinocytes by human papillomavirus (HPV) 16 DNA. J Dermatol Sci, v.13, n.2, Nov, p.140-52. 1996.

Zimmermann, H., R. Degenkolbe, H. U. Bernard e M. J. O'connor. The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. J Virol, v.73, n.8, Aug, p.6209-19. 1999.

Zlotnik, A. Chemokines in neoplastic progression. Semin.Cancer Biol., v.14, n.3, p.181-185. 2004.

Zlotnik, A. e O. Yoshie. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. Immunity, v.12, n.2, p.121-127. 2000.

Zur Hausen, H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. Biochim.Biophys.Acta, v.1288, n.2, p.F55-F78. 1996.

Zur Hausen, H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. J.Natl.Cancer Inst., v.92, n.9, p.690-698. 2000.

Zur Hausen, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. Nat.Rev.Cancer, v.2, n.5, p.342-350. 2002.

Zwerschke, W. e P. Jansen-Durr. Cell transformation by the E7 oncoprotein of human papillomavirus type 16: interactions with nuclear and cytoplasmic target proteins. Adv Cancer Res, v.78, p.1-29. 2000.

Zwerschke, W., S. Mazurek, P. Massimi, L. Banks, E. Eigenbrodt e P. Jansen-Durr. Modulation of type M2 pyruvate kinase activity by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. Proc Natl Acad Sci U S A, v.96, n.4, Feb 16, p.1291-6. 1999.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)