**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**Efeito do Fator de Necrose Tumoral-Alfa
(TNF- α) sobre Células Imortalizadas por
Papilomavírus Humano (HPV)**

Enrique Boccardo

TESE DE DOUTORADO

ORIENTADOR: Dra. Luisa Lina Villa

**SÃO PAULO
2002**

***“Efeito do Fator de Necrose Tumoral-Alfa (TNF- α)
sobre Células Imortalizadas por Papilomavírus
Humano (HPV)”***

***ENRIQUE MARIO BOCCARDO
PIERULIVO***

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências – Área: Bioquímica.

Aprovado por:

Profa. Dra. LUISA LINA VILLA
IQ – USP

(Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. HUGO AGUIRRE ARMELIN
IQ – USP

Prof. Dr. RONALDO BENTO QUAGGIO
IQ – USP

Prof. Dr. RAFAEL LINDEN
UFRJ

Prof. Dr. BRIAN ERIC STRAUS
ICB - USP

SÃO PAULO
05 DE JULHO 2002.

¿Dices que nada se crea?
Alfarero a tus cacharros.
Haz tu copa y no te importe,
Si no puedes hacer barro.

Antonio Machado

DEDICATÓRIA

Dedico esta Tesis a Cora, mi esposa, por ser ejemplo de amor, cariño y compañía permanentes.

Por enseñarme, siempre, a ser una persona mejor en todos los sentidos posibles.

Decirte “Gracias”, es simplemente poco.

A mi madre **Edilma** que, ignorando tiempo y distancias, siempre ha estado apoyando con amor. Gracias!

A mi padre **Juan José**. Mi ejemplo.

A mis hermanos **Carlos, Silvia y Laura** por ser una parte fundamental de mí.

A mis sobrinos **Guillermo, Victoria, Franco, María Belén, Juan José y Virginia** por ser la imagen de la alegría.

A mis amigos...y a los otros también.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, **Dra. Luisa Lina Villa** pela oportunidade, por acreditar e pela amizade. Por serem as pessoas, sempre, mais importantes que os resultados. Simplesmente, obrigado!

A minha **família**. A eles devo o que eu sou.

Ao Instituto Ludwig de Pesquisa Sobre o Câncer, através do **Prof. Dr. Ricardo Renzo Brentani**, pelo apoio e oportunidade de realizar este trabalho.

Ao **grupo de virologia**: Andrea, Carol, Isa, Jane, Joãozinho, Zé Carlos, Katiana, Lara, Laura, Lenice, Luisa, Mônica, Maria Cecília, Neide, Patricia Savio, Patricia Thomann, Paulinho, Raquel, Rômulo, Rodrigo, Stella e Tatiana. Vocês me fazem sentir em casa.

Ao **Joãozinho e Zé Carlos**, por estarem sempre presentes nos momentos difíceis.

Ao **Paulo, Laura e a Filha de Dona “Creide”**, mais do que colegas, meus amigos.

Ao **“rapaz do TNF”** e eterna chefe do grupo do TNF, **Lara Termini**, pela colaboração de ontem e a de amanhã.

A todos os colegas do Instituto, **Professores, estudantes, técnicos e outros funcionários** pois todos contribuíram para que este trabalho fosse possível (ou acharam que eu ia carregar com a culpa sozinho?).

Ao meu amigo **Francisco Noya** e aos **Profs. Drs. Louise T. Chow e Thomas R. Broker** do *Department of Biochemistry and Molecular Genetics, UAB, Birmingham, AL, USA* pelo apoio em boa parte deste trabalho.

A **FAPESP** pelo apoio financeiro.

Sumário

Abreviaturas	8
Lista de Tabelas	9
Lista de Figuras	10
Lista de Figuras	10
Resumo	13
Resumo	13
Summary	14
1. Introdução	15
1.1. Papilomavírus humanos (HPV)	15
1.2. Infecções por HPV	21
1.3. Papilomavírus e imunidade	22
2. Materiais e Métodos	31
2.1. Cultura de células	31
2.2. Extração de DNA das linhagens celulares	31
2.3. Amplificação dos exons 5-9 do gene p53	32
2.4. Purificação do produto de PCR	33
2.5. Fosforilação e ligação do produto de PCR purificado ao vetor pUC 18 <i>Sma</i> I	33
2.6. Transformação	34
2.6.1. Transformação por choque térmico	34
2.6.2. Transformação por eletroporação	35
2.7. Sequenciamento	35
2.8. Tratamento com TNF- α	36
2.9. Medida da proliferação celular	36
2.9.1. Incorporação de ^3H -Timidina	36
2.9.2. Citometria de fluxo	37
2.10. Extração de RNA	37
2.11. Extração de proteínas	38
2.12. Northern Blot	38
2.13. Densitometria	39
2.14. Análise Estatística	40
2.15. Análise do polimorfismo do gene p53	40
2.16. <i>Western Blot</i>	41
2.17. Ensaio de EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)	43
2.17.1 Preparação de extratos nucleares	43
2.17.2 Marcação do oligonucleotídeo	43
2.17.3 Reação de EMSA	44
2.18. Vetores retrovirais	45
2.18.1. Vetores para expressão das oncoproteínas de HPV 16	45
2.19. Cultura organotípica de queratinócitos (<i>raft</i>)	48
2.19.1. Preparação de células feeders	48
2.19.2. Obtenção de queratinócitos humanos primários (QPH)	48
2.19.3. Preparação do equivalente dérmico	49
2.19.4. Cultura organotípica de queratinócitos normais	50
2.19.5. Cultura organotípica de queratinócitos portadores de genes de HPV	50

2.19.6. Preparação dos raft para imunohistoquímica (IHQ) e imunofluorescência (IF)	52
2.19.7. Obtenção de extratos proteicos.....	52
2.20. Imunohistoquímica (IHC) e imunofluorescência (IF)	54
2.21. <i>Western Blot</i> de amostras de culturas organotípicas	55
3. Resultados e Discussão	57
3.1. Efeitos do TNF- α na proliferação celular	57
3.2. Análise mutacional do gene p53	62
3.3. Expressão de genes reguladores do ciclo celular	64
3.3.1. p53, p21 e p16	65
3.3.2. p27	73
3.3.3 Ciclinas e CDKs	74
3.4. Ativação do NF- κ B pelo TNF- α	77
3.4.1. p65	82
3.5. Efeitos do TNF- α em culturas organotípicas de queratinócitos normais e portadores de genes de HPV 16 ou 18.....	83
3.6. Expressão de genes reguladores do ciclo celular	92
3.6.1. p21 e p27	92
3.6.2. p16, p65, PCNA, ciclinas A e E.....	94
4. Conclusões	103
5. Referências Bibliográficas	104

Abreviaturas

AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida
BCS – Soro de bezerro
BrdU – Bromo-desoxiuridina
CDK – Quinase dependente de ciclinas (*Cyclin dependent kinases*)
CIN – Neoplasia cervical intraepitelial
CKI – Inibidor de CDK
DNA – Ácido desoxirribonucleico
DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DMSO – Dimetilsulfoxido
FACS – *Fluorescence Activated Cell Sorter*
FITC – Isotiocianato de fluoresceína
HLA – Antígeno Linfocitário humano
HPV – Papilomavírus humano
IHQ - Imunohistoquímica
I κ B – Inibidor de NF- κ B
IPTG – Isopropiltio- β -D-galactosideo
KSFM – *Keratinocyte Serum Free Medium*
LCR – Região controladora (*Long Control Region*)
LTR – *Long Terminal Repeat*
NF- κ B – *Nuclear Factor kappa B*
NK – *Natural Killer*
ORF – Janela aberta de leitura (*Open Reading Frame*)
PCR – Reação em cadeia da Polimerase
PCNA – *Proliferating Cell Nuclear Antigen*
PVDF – *Polyvinylidene Difluoride*
QPH – Queratinócitos primários humanos
RNA – Ácido ribonucleico
RNAm – Ácido ribonucleico mensageiro
SFB – Soro Fetal Bovino
SV40 – *Simian Virus 40*
TGF- β - *Transforming Growth Factor β*
TNF- α – Fator de necrose tumoral α

Lista de Tabelas

Tabela 1- Iniciadores utilizados para a amplificação dos exons 5-9 do gene p53	32
Tabela 2- Iniciadores utilizados para análise do polimorfismo no codon 72 do gene p53 (Storey <i>et al.</i> , 1998).....	41
Tabela 3- Iniciadores utilizados para a amplificação das regiões LCRE6, LCRE6/E7.	47
Tabela 4 - Análise por citometria de fluxo da distribuição das populações celulares (em porcentagem) nas diferentes fases do ciclo celular quando tratadas com 2 nM de TNF- α	59

Lista de Figuras

Figura 1- Representação dos vetores retrovirais utilizados nas culturas organotípicas de queratinócitos humanos.....	47
Figura 2 – Etapas na obtenção de culturas organotípicas de queratinócitos humanos normais ou portadores de genes de HPV.....	53
Figura 3 - Medida da incorporação de [metil- ³ H] timidina em linhagens celulares imortalizadas com HPV 16 e HPV 18 tratadas com 2 nM de TNF- α	58
Figura 4 – Distribuição das populações celulares nas diferentes fases do ciclo celular das linhagens estudadas na presença de 2 nM de TNF- α	59
Figura 5- Inibição diferencial da proliferação de células imortalizadas por HPV 16 e HPV 18 tratadas com 2 nM de TNF- α	60
Figura 6 - Polimorfismo no codon 72 do gene p53 das linhagens 698 e 18Nco...	64
Figura 7 – Efeito do TNF- α nos níveis de RNAm de p53 em queratinócitos normais ou imortalizados por HPV 16 ou 18. Os níveis de RNAm para p53 em amostras controle e tratadas com 2 nM de TNF- α foram determinados por <i>Northern blot</i>	66
Figura 8 – Resultado representativo obtido por <i>Western Blot</i> utilizando um anticorpo policlonal anti-p53 em extratos totais de queratinócitos normais ou transduzidos com genes de HPV 18. Observar o grande número e a intensidade das bandas inespecíficas.....	66
Figura 9 – Níveis relativos de RNAm de p21 e p16 em queratinócitos normais ou imortalizados por HPV 16 ou 18 após tratamento com 2 nM de TNF- α . Os níveis de RNAm foram determinados por <i>Northern blot</i> e normalizados em função dos níveis de RNAm para GAPDH. (*) valores com diferenças significativas entre células tratadas e controles ($P \leq 0,05$).....	68
Figura 10 - Efeitos do TNF- α sobre a expressão de p21 em queratinócitos normais ou imortalizados por HPV 16 ou 18 após tratamento com 2 nM de TNF- α por 60 horas Os níveis destas proteínas foi determinado por <i>Western blot</i> utilizando extratos proteicos totais de queratinócitos normais ou imortalizados por HPV 16 ou 18 após tratamento com 2 nM de TNF- α . (A) esquema da proteína p21 mostrando os domínios de interação com fatores celulares tais como ciclinas (C1 e C2), CDKs e PCNA e com a proteína E7 de HPV. Os níveis de RNAm e de proteína p21 foram determinados por <i>Northern blot</i> (B) e <i>Western blot</i> (B), respectivamente.	70
Figura 11- Efeitos do TNF- α sobre a expressão de p16 em queratinócitos normais ou imortalizados por HPV 16 ou 18 após tratamento com 2 nM de TNF- α por 60 horas. (A) esquema da via de regulação da atividade da proteína p16. Os níveis de RNAm e de proteína p16 foram determinados por <i>Northern blot</i> (B) e <i>Western blot</i> (B), respectivamente.	72
Figura 12 – Efeito do TNF- α nos níveis de p27. O nível de expressão desta proteína foi determinado por <i>Western blot</i> utilizando extratos proteicos totais de queratinócitos imortalizados por HPV 18 após tratamento com 2 nM de TNF- α por 60 horas.....	74

Figura 13- Efeito do TNF- α na expressão das ciclinas A, E, D1 e CDK-4, CDK-6. Os níveis destas proteínas foi determinado por <i>Western blot</i> utilizando extratos proteicos totais de queratinócitos imortalizados por HPV 16 ou 18 após tratamento com 2 nM de TNF- α por 60 horas.	76
Figura 14 – Efeito diferencial do TNF- α na ativação do fator NF- κ B em queratinócitos normais e imortalizados de HPV 16 ou HPV 18 após tratamento com 2 nM de TNF- α por 45 minutos. (♦) Competição com oligonucleotídeo mutado (não reconhecido pelo NF- κ B). (♣) Competição com 50X de oligonucleotídeo frio.	79
Figura 15 – Efeito diferencial do TNF- α na ativação do NF- κ B em linhagens celulares transformadas por HPV 16 ou HPV 18 após tratamento com 2 nM de TNF- α por 45 minutos. (♦) Competição com oligonucleotídeo mutado (não reconhecido pelo NF- κ B). (♣) Competição com 50X de oligonucleotídeo frio.	80
Figura 16 – Efeito do TNF- α na ativação do NF- κ B em QPHs transduzidos com vetores retrovirais que expressam a proteínas E6 e/ou E7 de HPV 16 e 18 após tratamento com 2 nM de TNF- α por 45 minutos. (♦) Competição com oligonucleotídeo mutado (não reconhecido pelo NF- κ B). (♣) Competição com 50X de oligonucleotídeo frio.	81
Figura 17 – Efeitos do TNF- α na expressão de p65. O nível de expressão desta proteína foi determinado por <i>Western blot</i> utilizando extratos proteicos totais de queratinócitos normais ou imortalizados por HPV 16 ou 18. após tratamento com 2 nM de TNF- α por 60 horas.	82
Figura 20 – Efeitos do TNF- α na proliferação celular em rafts de QPH e queratinócitos transfectados com o genoma completo de HPV 16 ou 18. As setas indicam células que incorporaram BrdU, detectadas por IHQ. As pontas de setas indicam a membrana basal.	89
Figura 21 – Efeitos do TNF- α na proliferação celular em rafts de QPH e queratinócitos transduzidos com genes de HPV 16. As setas indicam células que incorporaram BrdU, detectadas por IHQ. As pontas de setas indicam a membrana basal.	90
Figura 22 – Efeitos do TNF- α na proliferação celular em rafts de QPH e queratinócitos transduzidos com genes de HPV 18. As setas indicam células que incorporaram BrdU, detectadas por IHQ. As pontas de setas indicam a membrana basal.	91
Figura 23 – Efeitos do TNF- α na proliferação celular e na expressão de p21 em rafts de QPH e queratinócitos que expressam genes de HPV 16. Os núcleos das células que incorporaram BrdU aparecem em verde. As setas indicam células que expressam p21 (vermelho), detectadas por IF. As pontas de setas indicam a membrana basal.	97
Figura 25 – Efeitos do TNF- α na proliferação celular e na expressão de p27 em rafts de QPH e queratinócitos transfectados com o genoma completo de HPV 16. Os núcleos das células que incorporaram BrdU aparecem em verde. As setas indicam células que expressam p27 (vermelho), detectadas por IF. As pontas de setas indicam a membrana basal.	99

- Figura 26** – Efeitos do TNF- α na proliferação celular e na expressão de p27 em *rafts* de QPH e queratinócitos transduzidos com oncogenes de HPV 16. Os núcleos das células que incorporaram BrdU aparecem em verde. As setas indicam células que expressam p27 (vermelho), detectadas por IF. As pontas de setas indicam a membrana basal..... 100
- Figura 27** – Efeitos do TNF- α na proliferação celular e na expressão de p27 em *rafts* de QPH e queratinócitos que expressam genes de HPV 18. Os núcleos das células que incorporaram BrdU aparecem em verde. As setas indicam células que expressam p27 (vermelho), detectadas por IF. As pontas de setas indicam a membrana basal. 101
- Figura 28-** Efeitos do TNF- α sobre os níveis de proteínas reguladoras do ciclo celular em *rafts* de queratinócitos normais e portadores de genes de HPV 16 ou 18 após tratamento com 2 nM de TNF- α por 72 horas. Os níveis destas proteínas foram determinados por *Western blot* utilizando extratos proteicos totais obtidos a partir das culturas organotípicas. 102

Resumo

A infecção por papilomavírus humano (HPV) é o principal fator de risco para o desenvolvimento de neoplasias intra-epiteliais cervicais, as lesões precursoras do carcinoma da cérvix uterina. O fator de necrose tumoral- α (TNF- α) é um dos principais mediadores da inflamação da pele e das mucosas. Esta citocina é capaz de inibir a proliferação de queratinócitos normais e imortalizados por HPV-16. Por outro lado, queratinócitos imortalizados por HPV-18 ou transformados por HPV 16 ou 18 são resistentes aos efeitos do TNF- α . Entretanto, a base molecular desta diferença ainda é pouco conhecida. No presente estudo observamos o aumento dos níveis do inibidor de quinases p21, diminuição dos níveis de ciclina A e a ativação do fator NF- κ B após tratamento com TNF- α , apenas em células sensíveis à citocina. Por outro lado não foi observada alteração dos níveis de p16, p27, p65, ciclinas D1, E e CDKs -4 e -6 em nenhuma das linhagens estudadas. Culturas organotípicas (*rafts*) de queratinócitos normais apresentaram uma acentuada inibição da proliferação após o tratamento com TNF- α . Isso não foi observado em *rafts* de queratinócitos infectados com o genoma completo de HPV-18. Entretanto, as culturas organotípicas transduzidas com vetores retrovirais contendo o gene viral E7 apresentaram um fenótipo intermediário, indicando que a proteína E7 desempenha um papel na resistência a esta citocina.

Summary

Infection by Human papillomavirus (HPV) is the major etiologic factor in the development of cervical intra-epithelial neoplasia, the precursor of carcinoma of the uterine cervix. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) is one of the main mediators of skin and mucosa inflammation and has a potent anti-proliferative effect on normal and HPV16 immortalized keratinocytes. On the other hand, HPV-18 immortalized and HPV-16 or -18 transformed keratinocytes are resistant to TNF- α . However the molecular basis of this difference is not well understood. In the present study we observed an increase in the CDK inhibitor p21, reduced levels of cyclin A and activation of NF- κ B factor only in cells sensitive to this cytokine. Conversely, no alterations in the p16, p27, p65, cyclins D1, E and CDKs -4 and -6 levels were observed in any of the cell lines analyzed. Proliferation of normal primary human keratinocytes (PHK) raft cultures was markedly inhibited after treatment with TNF- α . This was not observed in cultures transfected with HPV-18 whole genome. Cultures transduced retroviral vectors carrying the E7 viral gene showed an intermediate phenotype suggesting that this protein contributes to TNF- α resistance.

1. Introdução

1.1. Papilomavírus humanos (HPV)

Nos seres humanos, as infecções pelo papilomavírus humano (HPV) ocasionam uma variedade de proliferações benignas como verrugas, cistos epidérmicos, neoplasias intraepiteliais, papilomas anogenitais, oro-laríngeos ou faríngeos e outros tipos de hiperqueratoses. Sua relação com a etiologia de alguns cânceres humanos mais frequentes é de particular interesse. Alguns tipos específicos de HPV, classificados como de alto risco (ex: HPV 16, 18, 31, 33, 35 e 54), foram identificados como agentes etiológicos de mais de 90% dos cânceres da cérvix uterina e de aproximadamente 50% de outros cânceres anogenitais. Outros tipos de HPV, como HPV 6 e 11, estão associados a lesões benignas sendo então classificados como HPVs de baixo risco. Estas associações levaram a *World Health Organization's International Agency for Research on Cancer*, em 1995, deliberar que existem evidências suficientes, tanto do ponto de vista biológico como epidemiológico, para considerar carcinogênicos alguns tipos de HPV (revisado por Villa, 1997).

Os papilomavírus são pequenos vírus de DNA, sem envelope e icosaédricos que se replicam no núcleo de células dos epitélios escamosos. O vírion é formado por uma molécula circular de DNA de fita dupla de 7200 a 8000 pb, 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 (revisado por Howley, 1996; zur Hausen, 1996).

Apesar de terem sido descritos na atualidade mais de 85 tipos de HPVs e dezenas em outros mamíferos, a organização dos diferentes tipos é muito similar. Basicamente, o genoma dos papilomavírus pode dividir-se em três regiões: uma região controladora denominada LCR (*Long Control Region*) que compreende

quase 10% do genoma, uma região precoce E (*early*) e uma região tardia L (*late*). Os genes da região L (L1 e L2) codificam para proteínas estruturais do capsídeo, enquanto que os genes 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 proliferação celular (revisado por McMurray *et al.*, 2001; Howley, 1996). Todas as janelas de leitura abertas, ORFs (*Open Reading Frames*), estão localizadas na mesma fita do DNA viral (revisado por Howley, 1996; zur Hausen, 1996; McMurray *et al.*, 2001).

A regulação da expressão viral é complexa, sendo controlada por diversos fatores de transcrição celulares e virais. A regulação ocorre principalmente ao nível da região LCR, cuja composição nucleotídica varia nos diferentes tipos de HPV. Dentro desta região, existem elementos em *cis* que regulam a transcrição dos genes E6 e E7. Estes genes são responsáveis pela imortalização celular e persistência do fenótipo maligno nas células de cânceres da cérvix uterina infectadas por HPV (Villa e Schlegel, 1991; Romanczuk *et al.*, 1991; zur Hausen, 1996). Por outro lado, nesta região existem sítios para a ligação de diversos fatores de transcrição celulares como, por exemplo, AP1, NF1, AP2, SP1, OCT-1, C/EBP β , NF-IL6, NF- κ B, TEF-1, TEF-2, PEF-2, receptores de glucocorticóides e progesterona, CDP, e YY1 (Fontaine *et al.*, 2000; Bauknecht e Shi, 1998; Favre *et al.*, 1997; Pattison *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 1997; Kyo *et al.*, 1994). Nesta região acontece a regulação da expressão dos genes virais. Interessantemente, tem sido demonstrado que a atividade promotora da LCR é dependente da diferenciação celular. Estes promotores encontram-se inativos nas células basais dos epitélios estratificados, sendo ativados nas camadas espinosa e granular do epitélio (Parker *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 1997).

Os papilomavírus são espécie-específicos, possuindo um tropismo especial por células dos epitélios escamosos. Nestas células, a infecção produtiva por estes vírus pode dividir-se em duas fases, uma precoce e uma tardia. Estas fases estão relacionadas ao grau de diferenciação das células epiteliais. Uma vez que as

células basais dos epitélios escamosos são as únicas capazes de se dividir, o vírus deve infectá-las para poder produzir uma lesão produtiva. No caso do epitélio da cérvix, acredita-se que estas células são atingidas através de microlesões produzidas no ato sexual. Mediante estudos de hibridação *in situ* em lesões (papilomas) ocasionadas por estes vírus, detectou-se o DNA viral nas células basais e parabasais do epitélio escamoso. Nestes tipos celulares ocorre a replicação do DNA viral e a expressão dos genes precoces, que estimulam a progressão da fase G1 à fase S do ciclo celular, em células que normalmente não replicam seu DNA. No entanto, a expressão dos genes tardios, a síntese das proteínas da capsídeo, a síntese vegetativa do DNA viral e a montagem de vírions, somente ocorre em células diferenciadas do epitélio escamoso (revisado por Howley, 1996). Este aspecto deve-se ao fato que o vírus necessita de um certo grau de diferenciação do tecido para que exista a expressão de fatores próprios de células diferenciadas que permitam a expressão dos genes virais tardios (revisado por McMurray *et al.*, 2001).

Os genes E6 e E7 são os únicos genes do HPV expressos de forma consistente nas linhagens celulares derivadas de carcinomas da cérvix uterina. Além disso, a expressão destes genes é necessária para a manutenção do fenótipo transformado de linhagens celulares derivadas de tumores cervicais uma vez que a sua inibição tem como resultado a reativação de vias de sinalização mediada por genes supressores de tumor e a diminuição da proliferação celular (Goodwin e DiMaio, 2000; Francis *et al.*, 2000). Desta forma, estas proteínas cooperam para imortalizar queratinócitos humanos *in vitro* (Halbert *et al.*, 1992; Halbert *et al.*, 1991; Münger *et al.*, 1989; Watanabe *et al.*, 1989; zur Hausen, 1996; Liu *et al.*, 1997; Akerman *et al.*, 2001) ao mesmo tempo que induzem a proliferação e retardam a diferenciação destas células (Woodworth *et al.*, 1992). Finalmente, estas proteínas são capazes de desacoplar a duplicação do centróssomo da divisão celular, induzindo assim, defeitos mitóticos e instabilidade genômica (Duensing *et al.*, 2000).

Os produtos destes genes são capazes de interagir com diversos fatores celulares. Entre essas interações, destaca-se a capacidade da proteína E6 de unir-se à proteína supressora de tumor p53, alterar a sua capacidade funcional e promover 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).

O produto do gene *p53* é uma proteína supressora de tumor induzida por danos ao DNA ou por estímulos mitogênicos inapropriados. A importância deste fator nos mecanismos de tumorigênese é ressaltada pelo fato que este fator encontra-se mutado em mais de 50% dos cânceres humanos. O acúmulo e ativação deste fator acontece principalmente por estabilização proteica e pode mediar a parada do ciclo celular ou disparar mecanismos de apoptose. Esta proteína funciona como fator de transcrição regulando a expressão de genes envolvidos na regulação do ciclo celular ($p21^{WAF1/CIP1}$, GADD45, IGF-BP3), reparo do DNA (GADD45), apoptose (Bax) e a própria transcrição de p53 (MDM2) (revisado por Yang *et al.*, 2002; Sherr e Weber, 2000; Levine, 1997). A expressão da proteína E6 de HPVs de alto risco altera a resposta celular mediada por p53, desencadeada normalmente por danos ao DNA (Kesis *et al.*, 1993). Este fator contribui no acúmulo de alterações genéticas associadas à tumorigênese cervical. Além disso, a proteína E6 é capaz de superar a repressão da transcrição mediada por p53 *in vivo* (Lechner *et al.*, 1992).

A proteína E7 de HPVs de alto risco é capaz de unir-se e inativar a forma supressora de proliferação celular da proteína do retinoblastoma (pRb) (Dyson *et al.*, 1989; Münger *et al.*, 1989; Barbosa *et al.*, 1990), impedindo, a parada do ciclo celular na fase G1 em resposta a danos no DNA (Hickman *et al.*, 1997; Hickman *et al.*, 1994; Slebos *et al.*, 1994). O gene do retinoblastoma codifica para uma proteína supressora de tumor de 105-110 kDa. Este fator é um importante regulador da proliferação e da diferenciação celular. A principal função desta proteína é inibir a proliferação celular inapropriada, mantendo as células na fase

G1 do ciclo celular, mediante a repressão da transcrição de genes requeridos para a entrada na fase S do ciclo. Entre os fatores regulados por pRb na fase G1, os mais importantes são os pertencentes à família E2F. A forma hipofosforilada de pRb é capaz de se ligar aos membros da família E2F. Para que ocorra a transição entre as fases G1/S do ciclo celular, a proteína Rb deve ser fosforilada em vários sítios por complexos ciclinas/quinases dependentes de ciclinas (ciclinas/CDKs) específicos. Este fato resulta na dissociação dos complexos pRb-E2F. Desta maneira, o fator E2F pode estimular a transcrição de genes específicos da fase S do ciclo celular (revisado por Brehm e Kouzarides, 1999; Adams e Kaelin, 1996). A proteína E7 de HPVs de alto risco é capaz de interagir com a forma hipofosforilada da proteína pRb e induzir a dissociação dos complexos pRb-E2F (revisado por McMurray *et al.*, 2001).

As interações de E6 e E7 com p53 e pRb, respectivamente, são funções compartilhadas com oncoproteínas derivadas de outros vírus pequenos de DNA, tais como o antígeno T maior de SV40 e as proteínas E1A e E1B de adenovírus. Supõe-se que, apesar de não serem suficientes, estas interações são fundamentais no processo de transformação celular (Levine, 1997; Thompson *et al.*, 1997; Helt e Galloway, 2001).

A proteína E6 contribui na alteração do ambiente celular, tornando-o mais apropriado para a replicação viral. Isto inclui o bloqueio da apoptose através da degradação de p53, a alteração da transcrição de genes celulares pela interação com o fator p300 e o aumento do tempo de vida celular pela ativação da telomerase (revisado por McMurray *et al.*, 2001). De maneira semelhante, a proteína E7 é capaz de interagir com vários fatores celulares que regulam o crescimento celular, especialmente a transição entre as fases G1 e S do ciclo celular. Isto inclui interações com outras proteínas da família do pRb (p107 e p130), histona deacetilase (HDAC), o fator de transcrição AP-1, ciclinas, quinases dependentes de ciclinas (CDKs) e inibidores de CDKs (revisado por McMurray *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 1998; Funk *et al.*, 1997; Zerbass *et al.*, 1995). Assim,

estas proteínas são capazes de prolongar o tempo de vida de queratinócitos humanos normais, alterar o ciclo e o programa de diferenciação destas células, promovendo o acúmulo de defeitos mitóticos. Estes efeitos promovem a instabilidade genômica, contribuindo para a transformação maligna (Sherman *et al.*, 2002; Akerman *et al.*, 2001; Duensing *et al.*, 2000; Francis *et al.*, 2000; Nees *et al.*, 2000; Thomas e Laimins, 1998).

O aumento da expressão dos genes E6 e E7 em lesões malignas pode ser ocasionado pela integração do DNA viral no genoma celular ao longo do processo de progressão tumoral. A integração é observada em aproximadamente metade dos carcinomas genitais associados ao HPV 16 e em quase a totalidade dos relacionados ao HPV 18. A integração acontece ao acaso no DNA celular, mas invariavelmente interrompe a região E1-E2 do genoma viral. Este evento altera o controle negativo exercido pela proteína E2 na expressão dos genes E6 e E7 (revisado por Favre *et al.*, 1997).

A capacidade das oncoproteínas E6 e E7 de superar os pontos de controle (*checkpoints*) do ciclo celular pode ser um mecanismo através do qual os HPVs induzem a instabilidade genética. Estas proteínas, quando expressas de forma independente ou conjunta, são capazes de permitir que as células superem diferentes pontos de controle do ciclo celular. Células que expressam estas oncoproteínas não param na fase G1 do ciclo celular em resposta a danos ou lesões na molécula de DNA ou na ausência de soro (Thompson *et al.*, 1997; Ruesch e Laimins, 1997; Morozov *et al.*, 1997; Jones e Münger, 1997; Martin *et al.*, 1998). A proteína p53 foi identificada como mediadora da parada do ciclo na fase G1 em resposta a radiações ionizantes e lesões do DNA. Nestas circunstâncias, observa-se o acúmulo de p53 que, por sua vez, estimula a expressão do inibidor de quinases dependentes de ciclinas, p21. Este aumento nos níveis de p21 resulta na parada em G1, que depende da associação desta proteína com complexos ciclina-cdk (*cyclin dependent kinases*) e sua inativação (Peters, 1994; Graña e Reddy, 1995; Elledge, 1996; Levine, 1997). A ausência

deste ponto de controle em células que expressam E6 e E7 dos HPVs de alto risco, poderia dar origem à replicação do DNA danificado e ao acúmulo de anomalias cromossômicas, uma das principais características de muitos cânceres. Observou-se também, em células que expressam estas proteínas, a contínua replicação do DNA, mesmo em presença de inibidores do fuso mitótico (Thomas e Laimins, 1998). Por outro lado, estas oncoproteínas são capazes de interagir diretamente e influenciar a ação de diferentes proteínas reguladoras do ciclo celular (Jones *et al.*, 1997; Funk *et al.*, 1997; Ben-Bassat *et al.*, 1997; Rapp e Chen, 1998; revisado por McMurray *et al.*, 2001) e de associar-se com proteínas ou complexos protéicos relacionados às vias de degradação de proteínas (Berezutskaya e Bagchi, 1997; Pim *et al.*, 1997; Talis *et al.*, 1998).

1.2. Infecções por HPV

As infecções por HPV ocorrem freqüentemente em indivíduos sexualmente ativos. No entanto, somente uma minoria das mulheres infectadas desenvolve câncer da cérvix uterina. Portanto, presume-se que outros fatores ambientais e/ou hereditários estariam envolvidos na evolução maligna da infecção. Entre os possíveis fatores de risco relacionados com o desenvolvimento da neoplasia cervical intraepitelial (CIN) ou do câncer cervical, estão a persistência da infecção por HPV de alto risco, elevada carga viral, idade, número de parceiros sexuais, consumo de tabaco e o tipo de antígeno leucocitário humano (HLA) (Franco *et al.*, 1995; Villa, 1997; Kadish *et al.*, 1997). O caráter transitório da maioria destas 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 (Rösl *et al.*, 1994; Kyo *et al.*, 1994; Kadish *et al.*, 1997).

A presença de DNA viral pode ser detectada em 10 a 50% das mulheres assintomáticas em idade reprodutiva. É interessante destacar que, quando novas

amostras são obtidas destas mulheres em estudos de seguimento, observa-se que a maioria das infecções são do tipo transitório, e que somente uma pequena proporção das mulheres apresenta o mesmo tipo de HPV em amostragens realizadas em diferentes etapas do mesmo (Villa, 1997; Kadish *et al.*, 1997). Por outro lado, a persistência é maior em mulheres infectadas por HPVs de alto risco. Estudos epidemiológicos indicam que quando uma mulher é infectada de forma persistente por um HPV de tipo oncogênico, está mais susceptível ao desenvolvimento de lesões neoplásicas (Ho *et al.*, 1995; Remmink *et al.*, 1995; Kadish *et al.*, 1997). Neste sentido, foi observado que em humanos a resposta proliferativa de linfócitos T contra peptídeos específicos derivados das oncoproteínas E6 e E7 do HPV 16, está significativamente associada à eliminação de infecções por HPV e à regressão de neoplasias cervicais intraepiteliais (Kadish *et al.*, 1997).

1.3. Papilomavírus e imunidade

As verrugas de origem viral são eliminadas após um período de 6 meses em aproximadamente 20 a 35% dos pacientes. A regressão abrupta das lesões benignas causadas por HPV tem sido associada à ação do sistema imune. A infecção por HPV produz uma resposta humoral com baixo título de anticorpos contra as proteínas do capsídeo detectável em apenas 35 a 60% dos indivíduos infectados. Estudos realizados com papilomavírus animais mostraram que a regressão das lesões é consequência de respostas imunes celulares. Em tal sentido, observou-se que papilomas bovinos continuam crescendo na presença de anticorpos circulantes e regredem após a infiltração linfocitária (Bunney *et al.*, 1992). Mais ainda, como pode ser deduzido a partir de dados epidemiológicos, indivíduos imunossuprimidos ou portadores de AIDS, apresentam um risco relativo significativamente maior para o desenvolvimento de câncer cervical que indivíduos hígidos (Palefsky *et al.*, 1999). Além disso, foi observado que em situações em que a função das células T encontra-se comprometida -como no caso de infecções por HIV, utilização de imunossupressores ou gravidez- o tamanho e

número de verrugas e condilomas aumenta. Finalmente, observou-se que verrugas em regressão apresentam infiltração por células mononucleares e que pacientes com alterações na relação $CD4^+/CD8^+$ apresentam alta incidência de infecção por HPV (revisado por Shah e Howley, 1996).

A evasão do sistema imune é um dos fatores cruciais na persistência e prevalência viral. A ausência de inflamação e lise celular, e o baixo nível de expressão nas células da camada basal limitam as oportunidades de apresentação efetiva das proteínas virais às células do sistema imune e, conseqüentemente, a eliminação das células infectadas. Este fato poderia explicar a característica de reservatório viral exibido pelas células da camada basal. Adicionalmente, é possível que algumas proteínas precoces do HPV poderiam, através de diferentes mecanismos, restringir a eficácia da resposta imune.

O estudo da interação entre genes do HPV e a produção de citocinas demonstrou que algumas citocinas (ex. TNF, IL-1 e os interferons $-\alpha$, $-\beta$ e $-\gamma$) conjuntamente a fatores de crescimento, podem regular negativamente 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). No entanto, foi observado que os efeitos dos diferentes tipos de interferon na expressão dos oncogenes E6 e E7 varia em diferentes linhagens celulares derivadas de carcinomas cervicais. Observou-se que os três tipos de interferons são capazes de induzir a redução nos níveis dos transcritos para E6 e E7 em células HeLa (esta é uma linhagem celular derivada de carcinoma cervical positiva para HPV 18). Por outro lado, nenhuma destas citocinas afetou os níveis dos transcritos destes genes na linhagem C-4II (outra linhagem derivada de carcinoma cervical e positiva para HPV 18). Isto poderia explicar os resultados contraditórios obtidos na clínica após submeter pacientes com carcinoma cervical ao tratamento com interferons (Kim *et al.*, 2000).

Estudos recentes mostraram que a oncoproteína E7 de HPVs de alto risco é capaz de inibir a função antiviral e reguladora do crescimento mediada por interferon- α (Barnard *et al.*, 2000) e regular negativamente a resposta ao IRF-1 (*Interferon Regulatory Factor-1*) (Um *et al.*, 2002; revisado por Kormilas *et al.*, 2001;). Além disso, foi observado que as proteínas E7 dos HPVs tipo 16, 18 (alto risco oncogênico) e 6b (baixo risco oncogênico), são capazes de regular diferencialmente a expressão da cadeia pesada de classe I do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), do fator envolvido no processo de apresentação de antígenos TAP1 (*transporter associated with antigen processing subunit 1*) e da proteína integrante do imunoproteasomo LMP2 (*low molecular weight protein 2*) (Georgopoulos *et al.*, 2000). No entanto, a proteína E7 não é o único fator viral envolvido na alteração dos mecanismos antivirais mediados pelos interferons. Num estudo recente, Ronco e cols. (1998) observaram a interação da proteína E6 de HPV 16 com o fator IRF3. Os autores mostraram que esta interação tinha como resultado a inibição da atividade transcricional mediada por este fator. Além disso, existem estudos que mostram o efeito inibitório da proteína E6 de HPV 18 na ativação de Jak-Stat mediada pelo interferon- α (revisado por Koromilas *et al.*, 2001). Acredita-se, que estes efeitos possam contribuir na eliminação da resposta antiviral normal de uma célula infectada.

No entanto, os fatores responsáveis pelo crescimento limitado e a freqüente regressão de lesões potencialmente malignas relacionados com infecções por HPVs de tipo oncogênico são pouco compreendidos na atualidade. Portanto, 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 inter-celulares são funcionalmente alterados. Além disso, estes mecanismos podem estar associados à perda de sensibilidade ao controle imune das células infectadas por HPV. Assim, seria lógico aceitar que somente a existência de mecanismos de comunicação fisiologicamente intactos entre células infectadas por HPV e células inflamatórias, poderiam garantir uma resposta antiviral apropriada.

A resposta imune mediada por células está coordenada por várias citocinas inflamatórias. A infecção viral promove a liberação de citocinas, tais como, a interleucina-1 (IL-1), IL-6, fator de necrose tumoral e interferon, a partir de linfócitos T e macrófagos. As células alvo, assim como as funções biológicas destas citocinas, se sobrepõem umas às outras, formando uma rede de citocinas através da qual os linfócitos T, as células NK e os macrófagos são ativados com eficiência, eliminando células infectadas. Desta maneira, estas citocinas contribuem indiretamente na erradicação das infecções virais (Kyo *et al.*, 1994).

Estudos realizados *in vitro* mostraram que a proliferação, diferenciação e imortalização de queratinócitos humanos pode ser modulada mediante diferentes reguladores positivos e negativos. Entre eles, TGF- β (*transforming growth factor*) e TNF- α são potentes inibidores da proliferação destas células e poderiam desempenhar um papel importante no controle *in vivo* do crescimento das mesmas (Vieira *et al.*, 1996; Villa *et al.*, 1992; Munger *et al.*, 1992).

O TNF- α é uma proteína de 17 Kd com um amplo espectro de atividades biológicas, incluindo a necrose hemorrágica de certos tumores humanos e de camundongo. Caracteriza-se por ser citotóxico e citoestático para uma variedade de linhagens celulares em cultura (Denis *et al.*, 1989; Villa *et al.*, 1992; Malejczyk *et al.*, 1994; Woodworth *et al.*, 1995; Vieira *et al.*, 1996). Foi descrito originalmente como um fator anti-tumoral e posteriormente foi demonstrada sua participação nas reações inflamatórias ativando a expressão de vários genes, como por exemplo, outras citocinas, imunoglobulinas e antígenos do complexo principal de histocompatibilidade (Beutler e Cerami, 1989; Woodworth *et al.*, 1995). Adicionalmente, o TNF- α é capaz de regular de modo negativo a expressão de genes virais em uma linhagem de queratinócitos humanos imortalizada com HPV 16 (Kyo *et al.*, 1994), sugerindo um efeito anti-viral deste fator.

O $\text{TNF}\alpha$ 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 produzir $\text{TNF}\alpha$ (Rubin *et al.*, 1986). Esta citocina possui uma ampla variedade de atividades biológicas, 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, interleucinas 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 contra células infectadas por agentes virais; 5) inibição da replicação de alguns vírus (Abbas, 1997).

Os principais componentes das vias de transdução de sinal desencadeadas pelo $\text{TNF}\alpha$ envolvem os seus receptores TNFR1 e TNFR2, assim como todas as proteínas associadas à estes receptores e 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 $\text{TNF}\alpha$ (Tartaglia *et al.*, 1993; Wong *et al.*, 1992).

Ao nível celular, o $\text{TNF-}\alpha$ pode exercer efeitos claramente opostos: apoptose e indução da proliferação (revisado por Szatmáry, 1999; Wallach *et al.*, 1999; Wajant e Scheurich, 2001). Estes efeitos dependem, em parte, da ativação do fator de transcrição NF- κ B (*Nuclear Factor kappaB*) (revisado por Balwin, 1996; Martin *et al.*, 2001). O fator NF- κ B 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). 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 transcrional. 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 na sua forma madura e apresentam um domínio RHD (*REL homology domain*) na região amino-terminal, requerido para a dimerização e união ao DNA. Os domínios envolvidos na modulação da transcrição encontram-se na região carboxi-terminal. A segunda classe consiste das proteínas p50/p105 (NF- κ B1) e p52/p100 (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 (revisado por Karim *et al.* 2002).

Quando a célula é exposta a sinais ativadores, como a ligação do TNF- α aos receptores na superfície celular, a proteína I κ B é fosforilada e degradada. Nestas condições, o complexo NF- κ B entra no núcleo, ligando-se a seqüências específicas na região promotora de genes associados à resposta imune, inflamação e controle da proliferação celular (revisado por Baldwin, 1996; Abraham, 2000; Karin e Ben-Neriah, 2000). Além disso, vários estudos tem mostrado a importância da ativação de NF- κ B durante a transformação maligna (Van Antwerp *et al.*, 2001; revisado por Mayo e Baldwin, 2000).

Por outro lado, diversos estudos indicam que NF- κ B é um regulador negativo de proliferação dos queratinócitos na epiderme, sendo importante na diferenciação celular e na 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). Nos epitélios estratificados, NF- κ B localiza-se no citoplasma das células proliferativas da camada basal, enquanto que nas células não proliferativas das camadas superiores, este fator é encontrado dentro do núcleo. Além disso, o bloqueio da atividade de NF- κ B na epiderme produz hiperplasia enquanto a sua superexpressão resulta em hipoplasia (Seitz *et al.*, 1998).

Além disso, queratinócitos da linhagem SKv (derivada da neoplasia intraepitelial vulvar e que expressa seqüências de HPV 16), liberam TNF- α espontaneamente, o qual exerce um efeito autócrino inibidor sobre a proliferação destas células (Malejczyk *et al.*, 1992). Este fato sugere que citocinas endógenas podem ser importantes na supressão de, ao menos, alguns tumores associados ao HPV e que o escape ao controle das citocinas possa ser um mecanismo fundamental da progressão tumoral.

No entanto, o estudo dos efeitos mediados pelo TNF- α demonstrou que os mesmos variam em função do tipo celular e do tipo de vírus que ocasionou a infecção. Enquanto a proliferação em cultura de queratinócitos humanos primários ou imortalizados com HPV 16 é inibida pelo TNF- α , queratinócitos imortalizados com HPV 18 ou com SV40 demonstraram ser resistentes aos efeitos inibidores desta citocina (Villa *et al.*, 1992; Vieira *et al.*, 1996). Além disso, tanto queratinócitos primários como imortalizados com HPV 16, apresentaram uma marcada inibição na expressão de algumas proteínas reguladoras do ciclo celular tais como a ciclina A, ciclina B e p34^{cdc2}, enquanto que não foram detectadas alterações nos níveis de expressão destas proteínas nas células imortalizadas com HPV 18 ou SV40 (Vieira *et al.*, 1996). O HPV 18 apresenta uma maior capacidade de transformar células *in vitro* que o HPV 16. Estudos realizados na LCR destes vírus, mostraram que esta região do HPV 18 é 10 a 50 vezes mais ativa que a sua contraparte no HPV 16. Este fato sugere que a diferença de atividade das LCRs de HPV 16 e 18 poderia ser a principal responsável pela maior capacidade transformadora do HPV 18 (Villa e Schlegel, 1991; Romanczuk *et al.*, 1991). A resistência diferencial dos queratinócitos imortalizados com HPV 16 e HPV 18 ao TNF- α poderia ser ocasionada pela diferença existente entre as LCR destes vírus, resultando na expressão diferencial das oncoproteínas virais.

No entanto, alguns estudos relatam que linhagens celulares tumorais que contém HPV 16 e HPV 18 são igualmente resistentes ao TNF- α (Vieira *et al.*, 1996; Bornstein *et al.*, 1997). Igualmente, Rösl *et al.* (1994) observaram que híbridos

celulares não tumorigênicos entre células HeLa (que contém DNA de HPV 18) e fibroblastos humanos normais, respondem ao TNF- α mediante a supressão da transcrição dos genes do HPV 18, juntamente à indução do fator MCP-1. Estes efeitos estariam relacionados à composição do fator de transcrição AP-1 (Soto *et al.* 1999; Finzer *et al.*, 2000; Soto *et al.*, 2000). Nenhum destes efeitos foi observado em células tumorigênicas. De maneira similar, observou-se que a resistência aos efeitos do TNF- α endógeno em queratinócitos imortalizados com HPV 16 (SKv-e, SKv-l), se correlaciona com o aumento da proliferação e da tumorigenicidade *in vitro* (Malejczyk *et al.*, 1994). De acordo a estes autores, a progressão tumoral poderia resultar do escape às limitações do crescimento impostas pelo TNF- α .

Em um trabalho recente, Cai *et al.* (1997) analisaram a resposta de uma linhagem celular sensível ao TNF- α derivada de um adenocarcinoma de mama humano e de duas sub-linhagens celulares resistentes. Observou-se que, enquanto que as linhagens sensíveis a esta citocina apresentavam o gene p53 normal, as sub-linhagens resistentes continham o gene mutado. Por outro lado, estas sub-linhagens mostraram ser resistentes também à irradiação com raios γ , e em nenhum caso verificou-se a expressão dos produtos gênicos regulados por p53, como por exemplo p21^{waf1/CIP1} e/ou MDM2. Estes autores acreditam que a proteína p53 estaria envolvida na citotoxicidade do TNF- α , e que a perda da sua função estaria relacionada à resistência das células tumorais à ação do mesmo. De fato, tem sido demonstrado que a expressão de p53 é fundamental para sensibilizar queratinócitos imortalizados por papilomavírus tipo 16 à apoptose mediada por CD-95 (Aguilar-Lemarroy *et al.*, 2002)

O TNF- α desempenha um papel importante na eliminação de células tumorais por macrófagos ativados 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 aos agentes quimioterápicos. Consequentemente, a resistência das células tumorais à citotoxicidade do TNF- α 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. Por isso, o entendimento dos mecanismos genéticos que modulam os efeitos do TNF- α poderia ser de crucial importância no controle da progressão tumoral.

No presente estudo visamos analisar a base molecular dos diferentes efeitos do TNF- α em queratinócitos normais ou imortalizados por HPV tipo 16 ou 18. Para isto, foram analisados os efeitos do TNF- α na proliferação e na expressão de genes reguladores do ciclo celular nestas células. Além disso, pretende-se estudar os efeitos do TNF- α em culturas organotípicas de queratinócitos normais ou transduzidos com vetores retrovirais que codificam para os genes E6 e/ou E7 de HPV 16 e 18 com o objetivo de determinar o papel desempenhado por estes genes na resistência ao efeito antiproliferativo do TNF- α .

2. Materiais e Métodos

2.1. Cultura de células

Foram utilizadas culturas de queratinócitos humanos primários (QPH) obtidos a partir de prepúcios de recém-nascidos (Clonetics), linhagens de queratinócitos humanos imortalizados com o genoma completo de HPV 16 (HF698) e HPV 18 (18Nco e HF18). Estas células imortalizadas por HPV foram isoladas de clones independentes e obtidas por transfecção de QPH como descrito anteriormente (Barbosa e Schlegel, 1989). A linhagem imortalizada 18.42 de queratinócitos normais transfectados com a região controladora e os genes E6 e E7 (LCR-E6-E7) de HPV 18 foi incluída na análise com fins comparativos. Os QPH foram mantidos em meio KSFM (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) suplementado com fator de crescimento epidérmico (5 ng/ml) e extrato de pituitária bovina (50 µg/ml). As células imortalizadas com HPV foram cultivadas numa mistura de 3 partes de K-SFM e uma parte de DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). As linhagens derivadas de tumores da cérvix uterina positivas para HPV 16 (SiHa e Caski), HPV 18 (HeLa e SW756) ou HPV negativa C33, foram cultivadas em meio DMEM acrescido de 10% SFB. As células Saos-2, linhagem derivada de um sarcoma osteogênico humano, foram cultivadas em meio McCoy 5A suplementado com 10% de SFB. Em todos os casos, as células foram mantidas em uma estufa úmida, a 37°C, e com 5% de CO₂.

2.2. Extração de DNA das linhagens celulares

O DNA das linhagens 698 e 18Nco foi purificado mediante o método de extração tradicional de proteinase K(Gibco BRL)-fenol-clorofórmio. O DNA da linhagem HF-18 foi extraído a partir de pellets de células empregando-se o kit de colunas de troca iônica “Glass Max DNA Isolation” (Gibco BRL).

2.3. Amplificação dos exons 5-9 do gene p53

Os exons 5 a 9 de p53 foram amplificados por PCR do DNA purificado a partir de pellets de células das linhagens 698, 18Nco e HF-18. A mistura da reação, composta por 10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dos 4 desoxiribonucleotídeos trifosfato e 0,5 U de Taq polimerase (Cenbiot) em um volume final de 50 µl foi submetida a 35 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 93°C, 30 segundos a 58°C para o anelamento e 1 minuto a 72°C (extensão) para o exon 5 das linhagens 698 e 18Nco; e 35 ciclos de 1 minuto a 93°C, 1 minuto a 60°C e 1 minuto a 72°C para os exons 6 a 9 para as linhagens 698 e 18Nco e os exons 5 a 9 da linhagens HF18. Os iniciadores utilizados são mostrados na tabela 1.

Tabela 1- Iniciadores utilizados para a amplificação dos exons 5-9 do gene p53

Exon	Seqüência
5 (5')	5'-TACTCCCCTGCCCTCAACAAG -3'
5 (3')	5'-CACCATCGCTATCTGAGCAGCG-3'
5 (5')	5'-TTCACCTTGTGCCCTGACTT-3'(*)
5 (3')	5'-AACCAGCCCTGTCTGTCTC-3'(*)
6 (5')	5'-CAGGGCTGGTTGCCCAGGGTCCCCCA-3'
6 (3')	5'-ACTGACAACCACCCTTAACCCCTCC-3'
7 (5')	5'-CCAAAGGCGCACTGGCCTC-3'
7 (3')	5'-CACAGCAGGCCAGTGTGC-3'
8-9 (5')	5'-CCTTACTGCCTCTTGCTTC-3'
8-9 (3')	5'-CTGGAAACTTTCCACTTGAT-3'

(*) Somente para HF18

2.4. Purificação do produto de PCR

Após a amplificação dos exons 5 a 9 do gene p53, o produto de PCR foi precipitado com etanol e purificado por troca iônica utilizando membranas de DEAE-celulose. O produto total precipitado foi submetido a eletroforese em um gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Após 60-100 minutos de corrida a 100 V, a banda do produto foi visualizada mediante luz UV e, com o auxílio de um estilete, foi aberta uma fenda no gel exatamente em frente a banda. Uma membrana de DEAE-celulose (mantida em água destilada e deionizada a 4°C) foi colocada na fenda. Em seguida, prosseguiu-se a corrida eletroforética até que todo o fragmento foi transferido à membrana (aproximadamente 10 minutos a 100V). A membrana foi removida do gel e, após conferir a transferência da banda mediante visualização com luz UV, esta foi imersa em tampão de baixo sal (0,15M NaCl, 0,1mM EDTA, 20mM Tris), a fim de eliminar o excesso de agarose retido na membrana. Em seguida, a membrana foi transferida para tampão de alto sal (1,0M NaCl, 0,1mM EDTA, 20mM Tris) e incubada à 65°C por 30 minutos; este procedimento foi repetido mais uma vez. Ao término destas incubações o fragmento amplificado está liberado da membrana. Com o objetivo de retirar o brometo de etídeo residual do fragmento de DNA, a fase aquosa foi extraída por fenol-clorofórmio e precipitada com 2,5 volumes de etanol. O precipitado foi ressuspenso em 11 µl de tampão água Milli-Q. Finalmente, a purificação foi conferida mediante a análise de 1 µl deste produto em gel de agarose 1%.

2.5. Fosforilação e ligação do produto de PCR purificado ao vetor pUC 18 *Sma*I

Anteriormente à ligação dos fragmentos de DNA ao plasmídeo, foi realizada a fosforilação do produto purificado utilizando-se o SureClone® Ligation Kit (Pharmacia). O produto de PCR foi preparado para a ligação mediante a remoção das extremidades simples fita do produto purificado. Para isto, utilizou-se da

atividade exonucleásica 3'-5' do fragmento Klenow da DNA polimerase I. Concomitantemente, esses fragmentos de PCR foram fosforilados pela T4 polinucleotídeo quinase. Posteriormente, o produto foi extraído por fenol-clorofórmio e purificado utilizando uma microcoluna empacotada com Sephacryl S-200 HR. Nestas condições o produto pode ser ligado a um vetor como o plasmídeo pUC18 *Sma*I defosforilado, que possui extremidades cegas (*blunt*) e defosforiladas. A ligação foi realizada utilizando-se 8 µl do produto fosforilado, 0,5 µl da T4 DNA ligase (400U/µl, Biolabs), 0,5 µl do vetor pUC18 *Sma*I, e 1 µl de tampão de reação 10x. A reação de ligação foi incubada a 16°C por 16 horas. Finalmente, a ligase foi inativada por incubação a 65°C durante 10 minutos.

2.6. Transformação

2.6.1. Transformação por choque térmico

Uma alíquota (5 µl) do produto de ligação correspondendo a cada um dos exons de p53 foi adicionada a 50µl de bactérias termo-competentes, e esta mistura foi mantida no gelo por uma hora. Em seguida, o choque térmico foi realizado colocando-se as bactérias a 42°C por 1 minuto. Foi adicionado 1ml de meio de cultura SOC (20g de triptona, 5g de extrato de levedura, 0,5g de NaCl, 10ml de KCl 250mM, 5ml de MgCl₂ 2M, 20mM de glicose 1M para 1 litro de água destilada e deionizada) a cada mistura, seguindo-se incubação por uma hora a 37°C, sob agitação suave. Após este período, 200µl de cada cultura foram plaqueados em meio LB-agar 1,5%, ampicilina (100µg/ml), IPTG (0,1mM) e X-gal (0,003%), a 37°C, por aproximadamente 20 horas. Para cada exon foram selecionadas duas colônias brancas. Cada uma destas colônias foi transferida para um tubo contendo 6 ml de meio de cultura LB (1 g triptona, 0,5 g extrato de levedura, 0,5 g NaCl, 1 ml Tris pH=7,4, 0,1 ml MgSO₄ 1M para 50 ml de água destilada e deionizada) e 6 µl de ampicilina (50 µg/ml), e incubada a 37°C por aproximadamente 20 horas,

sob agitação vigorosa. A extração do DNA do vetor contendo o amplicon foi realizada utilizando-se o kit WizardTM Minipreps DNA Purification System (Promega) seguindo as instruções do fabricante.

2.6.2. Transformação por eletroporação

As células eletrocompetentes foram descongeladas no gelo e colocadas imediatamente no gelo conjuntamente com as cubetas de eletroporação (gap 2 mm, Bio-Rad). Em seguida foram misturados 40 µl da suspensão celular com 1 µl do produto de ligação correspondendo a cada um dos exons (5 a 9) de p53, e deixados em gelo durante 1 minuto. A eletroporação foi realizada em um Gene Pulser (Bio-Rad) a 25 µF e 2500 volts. Após o pulso foi adicionado 1 ml de meio SOC, a suspensão foi transferida para um tubo de polipropileno e incubada a 37°C durante uma hora, sob agitação. Em seguida, 200 µl foram plaqueados em meio seletivo a 37°C, por aproximadamente 20 horas. A seleção das colônias e a purificação do plasmídeo foram realizadas conforme descrito para a transformação por choque térmico.

2.7. Seqüenciamento

A seqüência dos DNAs extraídos de dois clones de cada construção foi determinada em um sequenciador automático Alfie-Express (Pharmacia Biotech), empregando-se o "Sequenase 2.0- DNA Sequencing Kit"- (USB, USA) conforme o método desenvolvido por Sanger e cols. (1977). A seqüência de cada exon foi comparada com seqüências correspondentes aos exons 5 a 9 do gene p53 depositadas no GenBank (número de acesso M13115-19).

2.8. Tratamento com TNF- α

As linhagens celulares foram cultivadas nas condições anteriormente descritas, tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer. Em seguida, foram semeadas em placas de Petri de plástico ($2-5 \times 10^5$ ou $0,7-1 \times 10^5$ células por placa, conforme as placas utilizadas, 90 ou 60 mm de diâmetro, respectivamente). Ao atingirem uma confluência de 40% a 50%, o meio de cultura foi substituído por meio fresco com 2 nM de TNF- α humano recombinante (Boehringer Mannheim). Após 60 horas de cultura procedeu-se à análise de proliferação celular, extração de RNA e proteínas. Em todos os casos foram semeadas placas controle que não foram tratadas com TNF- α .

2.9. Medida da proliferação celular

Os efeitos do TNF- α na proliferação das células em cultura foram avaliados mediante ensaios de incorporação de timidina tritiada ou mediante análise das populações celulares por citometria de fluxo.

2.9.1. Incorporação de ^3H -Timidina

As células foram cultivadas em placas de Petri de 60 mm (aproximadamente 7×10^4 células por placa), e mantidas até 40-60% de confluência. Nesta fase as células foram tratadas com TNF- α (2 nM) e, após 60 horas, marcadas durante 12 horas com 100 μCi /placa de [metil- ^3H] timidina (25 Ci/mmol, Amersham Corp.). Após a lavagem das placas com solução salina (PBS), estas foram fixadas com etanol absoluto, a 4°C durante 15 a 20 minutos. As células foram então solubilizadas em 1 ml de NaOH 0,5 N durante 2 a 3 minutos e neutralizadas com 0,8 ml de HCl 0,5 N. Em seguida, 600 μl dessa solução foram acrescentados a 12 ml de líquido de cintilação (Sardi) e a incorporação de radioatividade foi avaliada por cintilação líquida em um cintilador Beckman LS 6800.

2.9.2. Citometria de fluxo

As células foram cultivadas em placas de Petri (90 mm) e tratadas com TNF- α conforme descrito anteriormente. Em seguida, as células foram tripsinizadas, lavadas duas vezes em 5 ml de PBS, resuspendidas em DMSO em tampão sacarose-citrato (10^6 células/100 μ l Cycle TEST PLUS buffer solution, Beckton Dickinson) e utilizadas para citometria de fluxo ou estocadas a -70°C até a análise. A marcação das células foi feita com iodeto de propídio utilizando o kit Cycle TEST PLUS (Beckton Dickinson). A 100 μ l de células acrescentou-se 250 μ l da solução A (que contém tripsina) a temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 200 μ l da solução B (que contém inibidor de tripsina e Ribonuclease A), a temperatura ambiente, durante 10 minutos. Finalmente, foram adicionados 200 μ l da solução C (que contém iodeto de propídio e tetrahidrocloreto de espermina), a 4°C por 15 minutos.

A avaliação da fluorescência do iodeto de propídio no núcleo das células foi realizada por citometria de fluxo em um FACScan (Becton Dickinson) empregando-se como programa de análise o "CellFit", que permite visualizar e quantificar as diferentes populações de células distribuídas pelas diferentes fases do ciclo celular.

2.10. Extração de RNA

O RNA de todas as linhagens celulares foi isolado utilizando RNeasyTM B (TEL-TEST, INC) ou TRIzol[®] (InvitrogenTM) conforme as instruções do fabricante. A concentração de RNA presente em cada amostra foi determinada a 260/280 nm utilizando um espectrofotômetro Genesys 2 (Spectronic[®]).

2.11. Extração de proteínas

A extração de proteínas das linhagens analisadas foi realizada mediante lise celular e posterior separação da fração proteica. Para isto, 500 µl de solução de lise (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,5% NP40, 0,5% fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF), 0,1 mM EDTA, 100 unidades/ml de Aprotinina) foram adicionados a cada placa e as células foram coletadas mediante o uso de um *cell scraper* e transferidas a um tubo Eppendorf de 1,5 ml. Em seguida, as células foram incubadas no gelo durante 15 minutos e centrifugadas sob velocidade máxima a 4°C, durante 30 minutos. Finalmente, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e as amostras estocadas a -70°C.

2.12. 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 1g de agarose (GibcoBRL), 2 ml de borato 50x (1 M ácido bórico, pH 8,3), 50 µl de EDTA (0,5 M, pH 8,0) e 17 ml de formaldeído 37% (Merck).

As amostras foram preparadas colocando-se 10 µg 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 as amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C durante 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, 0,5 mM EDTA e 5% formaldeído) durante 4 a 5 horas.

O gel foi lavado em 4x SSC (0,6 M NaCl, 60 mM citrato de sódio, pH 6,45) e 10x SSC (1,5 M NaCl, 0,15 M citrato de sódio, pH 6,45) durante 20 minutos afim 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 p16, p21 (gentilmente cedidas pela Dra. Eugenia Constanzi, ICB, USP) e p53 (correspondente ao produto de amplificação do exon 6) foram marcadas com $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP pelo método de *random priming* utilizando o kit Rediprime II (Pharmacia Biotech) ou o *Random Primers DNA Labeling System* (GibcoBRL).

A hibridização foi realizada a 65°C durante 16 horas em solução de hibridização (0,25 M Na_2HPO_4 , 7% SDS, 1% BSA, 1mM EDTA). Posteriormente, a membrana foi lavada com uma solução de lavagem (0.25 M Na_2HPO_4 , 1% SDS e 1 mM EDTA) durante 30 minutos, a 65°C afim de retirar o excesso de sonda. Finalmente, as membranas foram expostas a filmes de raios X a -70°C, durante 36 a 48 horas. Com o objetivo de normalizar a quantidade de RNA aplicada em cada poço do gel foi utilizada uma sonda para o mRNA da gliceraldeído 3-P desidrogenase. Essa enzima faz parte da via glicolítica e é codificada de forma constitutiva em todos os tecidos.

2.13. Densitometria

Para a quantificação e normalização das intensidades relativas das bandas obtidas, os filmes foram submetidos a densitometria de laser em um UltraScan (Pharmacia/LKB).

2.14. Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada aplicando o teste T de Student com intervalos de confiança de 95%. Os cálculos foram realizados utilizando o programa **SPSS® 10.0** (SPSS Inc., EUA)

2.15. Análise do polimorfismo do gene p53

Para analisar o polimorfismo do codon 72 do gene p53 foram realizadas reações de PCR utilizando iniciadores específicos para os alelos prolina e arginina neste codon (Storey *et al.*, 1998). Estas reações foram do tipo *Hot Start*, envolvendo diferentes perfis de ciclagem para cada alelo.

A marcação da extremidade 5' dos iniciadores foi realizada utilizando 2,5 µl de cada oligonucleotídeo (200 µM), 10 µCi [γ -32P]ATP (Amersham Pharmacia Biotech) e a enzima T4 polinucleotídeo quinase (5 U/µl) (Gibco, BRL) em um volume final de 15 µl. A reação de PCR foi realizada utilizando-se 2 µl dos oligonucleotídeos marcados (66,6 pmoles/µl), 1,5 mM de MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,5), 200 µM de cada dNTP, 2 U de Taq DNA Polimerase (Cenbiot, RS, Brasil) e 3 µl de DNA (das linhagens 698 e 18Nco), em um volume final de 50 µl. Do produto da PCR, 10 µl foram fracionados em um gel de poliacrilamida 7%, que após seco foi exposto a um filme de raio X (Kodak) durante 12 horas.

O produto da reação de PCR para o alelo *pro* é um fragmento de 177pb e foi realizada submetendo a mistura de reação a 25 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 59°C e 1 minuto a 72°C. O produto da reação de PCR para o alelo *arg* é um fragmento de 141pb e foi realizada submetendo a mistura de reação a 25

ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 62°C e 1 minuto a 72°C. Os iniciadores utilizados são mostrados na tabela 2.

Tabela 2- Iniciadores utilizados para análise do polimorfismo no codon 72 do gene p53 (Storey *et al.*, 1998).

Alelo	Iniciador	Seqüência
Prolina	Pro+	5'-GCCAGAGGCTGCTCCCCC-3'
	P53-	5'-CGTGCAAGTCACAGACTT-3'
Arginina	Arg-	5'-TTCACTTGTGCCCTGACTT-3'
	P53+	5'-AACCAGCCCTGTCGTCTC-3'

2.16. Western Blot

As amostras de proteína, purificadas conforme descrito anteriormente, foram submetidas à eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida 10% ou 12,5% utilizando o mini-Protean II Cell (Bio-Rad). Para um gel de separação de 4,5 ml 10% de acrilamida foram utilizados: 1,5 ml de H₂O Milli-Q, 1,5 ml de *lower buffer* (Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, SDS 0,4%), 1,5 ml de acrilamida-bisacrilamida (29:1) 30%, 24 µl de persulfato de amônio 10% (APS) e 11,25 µl de TEMED. Para géis de acrilamida 12,5% foram utilizados: 1,125 ml de H₂O Milli-Q e 1,875 ml de acrilamida-bisacrilamida (29:1) 30%. Na porção superior do gel de separação foi aplicado um gel de *stacking* composto por: 1,5 ml de H₂O Milli-Q, 625 µl de *upper buffer* (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, SDS 0,4%), 313 µl de acrilamida-bisacrilamida (29:1) 30%, 11,25 µl de APS 10% e 3,75 µl de TEMED.

As amostras foram preparadas colocando-se 50 µg de proteína em tampão de amostra 4x v/v (Tris-HCl 240 mM pH 6,8, SDS 0,8%, β-mercaptoetanol 200 mM,

glicerol 40% e azul de bromofenol 0,02%) e desnaturadas a 95 °C durante 10 minutos. Em seguida, as amostras foram aplicadas no gel e submetidas à eletroforese a 20-30 mA em tampão de corrida (glicina 192 mM, Tris 25mM, SDS 0,1%). Finalmente as amostras foram eletrotransferidas (Mini Trans-Blot Cell, BIO-RAD) para uma membrana de nitrocelulose (Protran, Schleicher & Schüll) a 250 mA em tampão de transferência (glicina 200 mM, Tris 25 mM, metanol 20% v/v (Merck)) durante 1h a 4 °C. A transferência foi conferida através da coloração com Ponceau (SIGMA) 0,1% em ácido acético 1%.

As membranas foram analisadas na presença de anticorpos policlonais de coelho, específicos para as proteínas p53 (FL-393), CDK-2 (sc-748), CDK-4 (sc-601), CDK-6 (sc-177), as ciclinas A (sc-751), D1 (sc-718), E (sc-481), e os inibidores de CDKs p21 (sc-756) (Santa Cruz Biotechnology) e p16 (15126E, PharMingen). Inicialmente, as membranas foram bloqueadas com TBS-T (Tris 20 mM pH 7,6, NaCl 137 mM, Tween-20 0,05%) cotendo 5% de leite em pó durante 1 hora. Em seguida, as membranas foram lavadas (2x) durante 3 a 5 minutos com TBS-T e incubadas durante 1 hora na presença de algum dos anticorpos específicos descritos acima. Os anticorpos foram diluídos em TBS-T nas concentrações sugeridas pelo fabricante. Posteriormente, as membranas foram lavadas (4x) com TBS-T durante 5 minutos e incubadas durante 1 hora na presença de anticorpo anti-imunoglobulina de coelho conjugado à peroxidase (Amersham) diluído 1:5000 em TBS-T. Finalmente, as membranas foram lavadas (4x) com TBS-T e (2x) com TBS (Tris 20 mM pH 7,6, NaCl 137 mM) durante 5 minutos e reveladas utilizando o kit ECL (Amersham).

2.17. Ensaio de EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)

2.17.1 Preparação de extratos nucleares

Os QPH normais, QPH transduzidos com vetores retrovirais que expressam as oncoproteínas E6 e/ou E7, e as linhagens HF698, 18Nco, 18.42, HeLa, SW756, SiHa, CasKi foram cultivadas e tratadas com 2 nM de TNF- α humano recombinante por 1 Hora. Logo após as placas foram lavadas com PBS e as células foram coletadas mediante o uso de um *cell scraper* em 5 ml de PBS e transferidas para um tubo Falcon de 15 ml. Em seguida as células foram sedimentadas a 3000rpm por 3 min, o sobrenadante foi descartado, e o pellet ressuspensionado em 4 ml de tampão de lise (10mM HEPES pH 7,9, 10mM KCl, 0,2mM EDTA, 1mM DTT) sob agitação intensa. A suspensão celular foi incubada em gelo por 5 min, centrifugada e o pellet foi ressuspensionado sob agitação em 4 ml de tampão de lise. Os núcleos assim obtidos foram sedimentados a 2000rpm por 2 min e o sobrenadante foi descartado cuidadosamente tentando eliminar o maior volume possível. Os núcleos foram ressuspensionados em 100 μ l de tampão de extração (20mM HEPES 7,9, 0,42M NaCl, 2mM EDTA, 1mM DTT, 1mM PMSF, 2 μ M Pepstatina, 0,6 μ M Leupeptina, 25mU/ml Aprotinina), transferidos a tubos Eppendorf e incubados em gelo por 30 min. Finalmente as amostras foram centrifugadas a 4°C e 12rpm por 15 min. O sobrenadante foi dividido em alíquotas e estocados a -80°C. A concentração proteica foi determinada pelo método de Bradford (Bio-Rad).

2.17.2 Marcação do oligonucleotídeo

No presente estudo foram utilizados oligonucleotídeos dupla-fita com sequência consenso para ligação pelo Fator Nuclear kappa B (NF- κ B) 5'-GCCTGGGAAAGTCCCCTCAACT-3' (fita sense) (GibcoBRL). Para cada ensaio de EMSA foram utilizados 20fmol de oligonucleotídeo/amostra. Para um ensaio

típico com 12 amostras 0,25pmol de oligonucleotídeo consenso foram marcados com $\gamma^{32}\text{ATP}$ por uma hora a 37°C utilizando T4 polinucleotídeo kinase seguindo as instruções do fabricante (Biolabs). Em seguida, o oligonucleotídeo foi passado por uma coluna de Sephadex G50 e o volume recuperado foi aumentado até 100 μl por adição de H_2O Milli-Q. Logo após o oligonucleotídeo marcado foi extraído sucessivamente com fenol/clorofórmio, com clorofórmio e precipitado com 3 volumes de etanol na presença de acetato de Sódio 0,3M (concentração final) pH 5,2 utilizando 10 μg de DNA de esperma de salmão como carregador. Após centrifugação o oligonucleotídeo foi lavado com etanol 70%, o pellet seco e ressuspenso em 100 μl de tampão de *binding* (20mM HEPES pH 7,9, 20% glicerol, 0,1M KCl, 2mM EDTA, 1mM PMSF, 2 μM Pepstatina, 0,6 μM Leupeptina, 25mU/ml Aprotinina) para obter uma concentração final de 2,5fmol/ μl . A atividade específica do oligonucleotídeo foi determinada utilizando um cintilador LS6500 (Beckman Coulter).

2.17.3 Reação de EMSA

A mistura de reação composta por 5 μg de proteína de extrato nuclear, 5 μg de BSA e 5 μg de DNA de esperma de salmão/amostra em um volume final de 32 μl de tampão de *binding* foi incubada em gelo por 10 min. Em seguida foram adicionados 8 μl do oligonucleotídeo marcado (20fmol/amostra) e a mistura foi incubada por 15 min a 30°C. Finalmente as amostras foram aplicadas em um gel de 4% de poliacrilamida (29:1) em 0,5X TBE (0,42M Tris, 0,42M Borato e 1mM EDTA) e submetidas a electroforese em 0,5X TBE e 200V.

Após a corrida electroforética o gel foi fixado por 20 min utilizando-se uma solução com 20% etanol e 10% de ácido acético. Em seguida o gel foi aderido a um papel Whatmman e secado sob vácuo, a 80°C, durante 2 horas. Finalmente, o gel foi exposto a filmes de raios X a -70°C, durante 12 a 48 horas.

2.18. Vetores retrovirais

Os vetores retrovirais pLNSX e pLN-LacZ (Miller e Rosman, 1989; revisado por Chow e Broker, 1997) foram gentilmente cedidos pela Dra. Louise T. Chow (*Department of Biochemistry and Molecular Genetics, UAB, Birmingham, AL, USA*). Os vetores foram utilizados para transformar bactérias *Escherichia coli* DH5 α por choque térmico e purificados conforme descrito anteriormente.

2.18.1. Vetores para expressão das oncoproteínas de HPV 16

As regiões LCRE6 (aproximadamente 1500pb) e LCRE6E7 (aproximadamente 1800pb) de HPV 16 foram amplificadas por PCR a partir do plasmídeo de HPV 16 protótipo (gentilmente cedido pelo Dr. Harald zur Hausen, Heidelberg) mediante o uso de iniciadores que apresentavam sítios de corte para as endonucleases de restrição *Bam*HI e *Cla*I. Estas endonucleases apresentam sítios únicos de digestão em regiões apropriadas do vetor pLNSX. As seqüências dos iniciadores são apresentadas na tabela 3.

A mistura da reação, composta por MgSO₄ 2 mM, 0,5 μ M de cada iniciador, 200 μ M dos 4 dNTPs, 1X de tampão de PCR “high fidelity” e 3,5 U de *Platinum Taq DNA polymerase High Fidelity* (GibcoBRL), em um volume final de 100 μ l, foi submetida a 35 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 95°C, 1 minuto a 60 °C para o anelamento e 2,5 minutos a 72°C (extensão). Noventa e cinco μ l de cada produto de PCR foram precipitados com 240 μ l de etanol absoluto e 38 μ l de Acetato de Sódio 3M durante uma hora a –70°C. Em seguida, foram centrifugados por 20 minutos a 4°C e, após aspirar o sobrenadante, secados sob vácuo e ressuspensos em 30 μ l H₂O Milli-Q.

Os produtos de PCR de LCRE6 e LCRE6E7 e o vetor pLNSX foram digeridos com *Bam*HI (Biolabs), a 37°C por 12 horas seguindo as instruções do fabricante para uma reação de 20 µl. Em seguida a enzima foi inativada a 65°C por 10 minutos. As amostras foram precipitadas conforme descrito acima e ressuspensas em 20 µl H₂O Milli-Q. Finalmente as amostras foram digeridas com *Cla*I (GibcoBRL) nas condições descritas acima. Os fragmentos digeridos foram purificados conforme descrito anteriormente utilizando membranas de DEAE-celulose (Schleicher & Schüll) ou o kit Concert™ Rapid PCR Purification System (GibcoBRL).

Antes da reação de ligação, o vetor (previamente digerido com *Bam*HI e *Cla*I) foi tratado com fosfatase (*Calf Intestinal Alkaline Phosphatase*, GibcoBRL), seguindo as instruções do fabricante, visando minimizar a re-circularização do vetor. Para a reação de ligação foram utilizados 25-50 ng de produto de PCR apropriado e 25-50 ng de vetor digerido de maneira que se possa obter uma relação 4:1 de fragmento:vetor em número de moléculas (para isso deve-se levar em conta o tamanho dos fragmentos de DNA e as respectivas concentrações). A reação foi realizada utilizando-se 1 µl da T4 DNA ligase (400U/µl, Biolabs), 2 µl de tampão de reação 10X em um volume final de 20 µl. A reação de ligação foi incubada a 16°C por 16 horas. Finalmente, a ligase foi inativada por incubação a 65°C durante 10 minutos.

O produto de ligação foi utilizado para transformar bactérias, clonado e purificado conforme descrito acima. A sequência dos vetores foi verificada utilizando um sequenciador automático ABI PRISM™ 377 (Perkin Elmer), empregando-se o DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing Premix kit (Pharmacia). A sequência dos genes de HPV presentes em cada vetor foi comparada com a sequência correspondente do HPV 16 depositada no GenBank (número de acesso K027018).

Tabela 3- Iniciadores utilizados para a amplificação das regiões LCRE6, LCRE6/E7.

Exon	Seqüência
LCR F	5'-CGTATT <u>GGATCCTT</u> CTGCAGACCTAGATCAG-3'
E6 R	5'-ATTAGC <u>ATCGAT</u> AGGTGTATCTCCATGCATG-3'
E7 R	5'-ATTAGC <u>ATCGAT</u> GCAGGATCAGCCATGGTAG-3'

GGATCC, ATCGAT são seqüências reconhecidas especificamente por *Bam*HI e *Cla*I, respectivamente.

O esquema dos vetores retrovirais utilizados neste estudo é apresentado na figura 1.

Figura 1- Representação dos vetores retrovirais utilizados nas culturas organotípicas de queratinócitos humanos

2.19. Cultura organotípica de queratinócitos (*raft*)

2.19.1. Preparação de células *feeders*

A linhagem de fibroblastos de camundongo J2 (derivada de NIH 3T3) (revisado por Chow e Broker, 1997) foi mantida em cultura utilizando meio DMEM com 10% BCS (Soro de Bezerro) (D10*). Estas células foram utilizadas como *feeders* nas culturas organotípicas e na preparação de QPH. Para a preparação de QPH as células J2 foram cultivadas até atingir 10-20% de confluência. Em seguida, as células foram tratadas com 4 µg/ml de mitomicina-C por 4 horas e mantidas em cultura (por até 5 dias) até a adição de QPH. Para as culturas organotípicas as células J2 foram tratadas conforme descrito abaixo.

2.19.2. Obtenção de queratinócitos humanos primários (QPH)

Os queratinócitos primários humanos foram obtidos a partir de prepúcios de recém nascidos. Os prepúcios foram lavados rapidamente em etanol 70%, submersos em PBS com 10% de BCS e colocados em uma placa de Petri de 100 mm. Em seguida, todo o tecido conectivo da derme foi retirado utilizando tesoura e bisturi. Esta é uma etapa muito importante para diminuir o número de fibroblastos. Em seguida, os prepúcios foram cortados em fragmentos de aproximadamente 2 mm, transferidos para um erlenmeyer e incubados com 10-20 ml de 0,25% Tripsina e 1 mM EDTA (GibcoBRL) por 45 minutos a 37°C, sob agitação. Logo após o conteúdo do erlenmeyer foi filtrado com uma grelha de aço para eliminar os fragmentos maiores. O produto filtrado foi neutralizado com um volume igual de PBS com 10% de BCS e centrifugado por 5 minutos a 1000 rpm. O precipitado celular foi ressuspensionado com KSFM (*Keratinocyte Serum Free Medium*) e as células foram transferidas para as placas de Petri de 100 mm que continham células *feeders*. Em seguida foram adicionados 200 µl/placa de antibióticos PSN (GibcoBRL, 5 mg Penicilina, 5 mg Estreptomicina e 10 mg Neomicina/ml) e as

placas foram mantidas a 37°C e em atmosfera de 5% CO₂. Após 72 horas a concentração de antibióticos utilizada foi diminuída para a metade e após outras 48 horas as culturas foram mantidas em meio KSFM sem antibióticos até atingir 80-90% de confluência. Finalmente as células foram congeladas em KSFM com 10% dimetil-sulfóxido (DMSO).

2.19.3. *Preparação do equivalente dérmico*

As células J2 foram tripsinizadas ao atingir 60-70% de confluência. O número de células necessário foi determinado para obter uma concentração final de 1×10^5 células/0,75ml de equivalente dérmico (por exemplo para 7,5 ml de equivalente dérmico são necessárias 1×10^6 células J2). Logo após a centrifugação as células J2 foram ressuspensas em um volume de SFB (Soro Bovino Fetal) igual a 1/20 do volume total de equivalente dérmico a ser preparado (por exemplo, 500 µl de FBS para 10 ml de equivalente dérmico). Paralelamente, em um tubo estéril foram misturados um volume equivalente a 1/10 do volume final de equivalente dérmico a ser preparado de meio Ham's F12 10X (GibcoBRL), um volume igual de tampão de reconstituição 10X (2,2% NaHCO₃, 0,05 M NaOH, 200mM HEPES) e um volume de colágeno de cauda de rato correspondente a 8/10 do volume total de equivalente dérmico a ser preparado. Em seguida foram adicionadas as células e a suspensão foi misturada por inversão evitando fazer bolhas e transferida para uma placa de 24 poços (0,75 ml/poço). Após a solidificação a temperatura ambiente, por 40 minutos, adicionou-se 1 ml de meio para *raft* a cada poço e a placa foi mantida a 37 °C, em atmosfera de 5% de CO₂ até a adição dos QPH.

2.19.4. Cultura organotípica de queratinócitos normais

Os queratinócitos humanos primários (passagem 0) foram cultivados com meio KSFM (GibcoBRL) em placas de Petri de 60 mm até atingir uma confluência de 80-90%. Em seguida, foram tripsinizados, contados, ressuspensos em KSFM (2×10^5 células por ml) e colocados sobre o equivalente dérmico em uma densidade de 1×10^5 células/poço em uma placa de 24 poços. Logo após foi adicionado 0,5 ml de meio para *raft* a cada poço e a placa foi colocada a 37 °C e 5% 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 queratinócitos, 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 nove dias após a transferência à interface ar-meio, os *rafts* foram tratados com 2 nM TNF- α por 72 horas sendo que as últimas 12 horas de cultura foram realizadas na presença de 100 μ g/ml bromodeoxiuridina (BrdU, GibcoBRL) para detectar as células em proliferação. Finalmente, os *rafts* foram fixados em formol e incluídos em parafina ou utilizados para a obtenção de extratos proteicos.

2.19.5. Cultura organotípica de queratinócitos portadores de genes de HPV

Os vetores retrovirais contendo os genes de HPV foram introduzidos em células da linhagem ecotrópica de fibroblastos de camundongo Bosc23 (derivada de NIH 3T3) por eletroporação. Para isso foram utilizados 15 μ g de vetor e 50 μ g de DNA de esperma de salmão como carregador. O DNA (carregador e vetor) foi colocado em uma cubeta de eletroporação (4 mm de distância entre os eletrodos) junto com 2,5 μ l de BES (ácido N,N-bis[2-hidroxietil]-2-aminoetanosulfônico) 0,5M, pH 7,2.

Finalmente foram acrescentadas 5×10^6 células/cubeta em um volume de 250 μ l de meio DMEM com 10% de SFB (D10). A eletroporação foi realizada a 170V e 960 μ F (a constante de tempo τ do circuito Resistência/Capacitância deve ficar entre 40-50 msec). Em seguida, as células foram transferidas para placas de Petri de 100 mm com 7 ml de meio D10 e incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Quatro horas depois, o meio de cultura foi aspirado e substituído por 5 ml de meio D10 fresco, dessa maneira podem-se concentrar as partículas retrovirais que começam a ser produzidas aproximadamente 24 horas depois.

Após 48 horas, o sobrenadante das células Bosc23 foi utilizado para infectar a linhagem anfitriã de fibroblastos de camundongo Am12 (deriva de NIH 3T3) que foram mantidas em cultura em placas de Petri de 100 mm em uma confluência de 20%. Para isso o meio das células Bosc23 foi aspirado com uma seringa de 5 ml e, utilizando um filtro de 0,45 μ m, gotejado sobre as células Am12. Após 4–8 horas foram adicionados 5 ml de meio D10 fresco às células Am12. No dia seguinte o meio foi aspirado e substituído por 10 ml de meio D10 fresco e mantidas nessas condições por mais 24 horas. Finalmente, o meio foi substituído por meio D10 com 500 μ g/ml Geneticina (G418, GibcoBRL). Após uma semana de seleção com G418, as células foram mantidas em meio D10 fresco até verificar-se a formação de colônias.

Quando as colônias cubriram 40-50% da superfície da placa, as células foram tripsinizadas e re-plaqueadas. Ao atingir 80-90% de confluência o meio cultura foi aspirado e substituído por 5 ml de meio fresco. No dia seguinte o sobrenadante foi utilizado para infectar queratinócitos humanos primários (QPH) mantidos em cultura em placas de Petri de 60 mm com confluência de 20-30%. A infecção foi feita nas mesmas condições descritas para as células Am12 com exceção que 45 minutos após adição do meio D10 com as partículas retrovirais foram acrescentados 5 ml de meio KSFM (GibcoBRL) para minimizar os efeitos do soro sobre os queratinócitos. Após quatro horas o meio foi substituído por KSFM fresco. Dois dias depois o meio foi aspirado e os queratinócitos foram selecionados em meio KSFM

com 250 µg/ml de G418 por 48 horas. Finalmente, o meio foi substituído por KSFM.

Os queratinócitos foram mantidos nestas condições até atingir uma confluência de 80-90% e tratados conforme descrito para QPH normais. As etapas para o estabelecimentos das culturas organotípicas estão esquematizadas na figura 2.

2.19.6. Preparação dos raft para imunohistoquímica (IHQ) e imunofluorescência (IF)

Após 9-12 dias na interface ar-meio (incluindo 72 horas de tratamento com TNF- α e 12 horas na presença de BrdU) as culturas organotípicas foram lavadas com PBS pH 7,4, fixadas por 45 minutos em 10% formol, incluídas em parafina e cortadas em secções de 4 µm.

2.19.7. Obtenção de extratos proteicos

Após 9-12 dias na interface ar-meio (incluindo 72 horas de tratamento com TNF- α) as culturas organotípicas foram lavadas com PBS pH 7,4. A camada de células epidérmicas foi separada da matriz de colágeno utilizando pinça e bisturi, colocada em um tubo eppendorf e congelada em banho de gelo seco com etanol. Em seguida, foram adicionados 150 µl de tampão de lise (50 mM HEPES pH 7, 1 mM DTT, 200 mM NaCl, 4 mM EDTA, ZnCl₂ e 0,5% de NP-40) na presença de inibidores de proteases e os *rafts* foram homogeneizados por maceração. Após centrifugação por 20 minutos a 4°C, os sobrenadantes foram mantidos a -80°C. A concentração proteica foi determinada pelo método de Bradford (Bio-Rad).

Figura 2 – Etapas na obtenção de culturas organotípicas de queratinócitos humanos normais ou portadores de genes de HPV.

2.20. Imunohistoquímica (IHC) e imunofluorescência (IF)

As secções obtidas a partir das culturas organotípicas foram desparafinizadas por incubação a 65°C durante uma hora, seguida de duas lavagens de 10 minutos com xileno, uma lavagem de 10 min com etanol 100%, e lavagens sucessivas de 5 minutos em etanol 95%, etanol 70% e água Milli-Q (2X). Posteriormente, as secções foram incubadas em tampão citrato 10 mM (pH 6) a 95°C por 10 min para desmascarar os antígenos. A detecção de BrdU por IHC foi realizada utilizando o anticorpo primário de camundongo conjuntamente com o kit Histostain-SP de amplo espectro seguindo as instruções do fabricante (Zymed Laboratories Inc.). Logo após foi feita uma leve contra coloração das secções com hematoxilina. As imagens foram obtidas com uma câmera digital SPOT (Diagnostic Instrument, Sterling Heights, Mich.) acoplada a um microscópio Olympus BH-2.

Para a IF dupla envolvendo BrdU as secções foram tratadas para desmascarar os antígenos (ver acima), bloqueadas com 10% de soro de cabra em PBS por 30 min e incubadas por 12-16 horas com um dos anticorpos monoclonais específicos para as proteínas de interesse (p65 /Rel A e TNF- α (sc F-6, sc-7317; Santa Cruz Biotechnology), p21 (Ab-1, Oncogene Research), p27 (NCL-p27; Novocastra), citoqueratina K1 (C34904; Enzo Diagnostics)). As concentrações de anticorpos utilizadas variaram conforme o anticorpo de 1:25 a 1:100. Em seguida as secções foram lavadas com PBS e incubadas 1-3 horas com IgG biotilada anti-camundongo. As secções foram novamente lavadas com PBS e incubadas com estreptavidina-Texas Red (1:50, Vector Laboratories, Burlingame, Calif.). Logo após as secções foram lavadas com PBS e incubadas por 2 horas com um anticorpo anti-BrdU conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC, 1:50, Roche Biochemicals). Após lavagem com PBS as secções foram montadas com Vectashield Mounting Medium com DAPI (Vector). As imagens foram obtidas utilizando uma câmera digital Olympix 2000 (Life Science Resources, ●●●, United Kingdom) acoplada a um microscópio Olympus Provis AX70. Todas as imagens

foram processadas digitalmente utilizando Photoshop 6.0 (Adobe Systems, San Jose, Calif.).

2.21. Western Blot de amostras de culturas organotípicas

As amostras de proteína das culturas organotípicas foram obtidas separando a camada epitelial do equivalente dérmico. Em seguida, as amostras foram congeladas em banho de gelo seco e etanol. As amostras foram homogeneizadas utilizando um “dounce” de vidro em 150µl de tampão de lise (50mM HEPES pH 7, 1mM DTT, 250mM NaCl, 4mM EDTA, 10µM ZnCl₂, 0,5% NP-40) suplementado com inibidores de proteases CompleteTM (Boehringer Mannheim), centrifugadas a 4°C por 20 minutos e os sobrenadantes transferidos a tubos novos e mantidos a – 80°C. As amostras foram quantificadas pelo método de Bradford (Bio-Rad).

Os ensaios de Western blot foram realizados segundo descrito anteriormente com as seguintes modificações: em alguns casos foi utilizado PBS-T (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄, pH 7,4, Tween-20 0,05%) em vez de TBS-T (Tris 20mM pH 7,6, NaCl 137mM, Tween-20 0,05%). O bloqueio foi realizado com PBS-T com 5% de leite e a incubação com os anticorpos primários e secundários foi realizada em PBS-T com 1% de leite. Além disso, as amostras de proteína foram transferidas para membranas de polivinilidene difluoreto (PVDF) (Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech).

As membranas foram analisadas na presença de anticorpos monoclonais de camundongo específicos para as proteínas PCNA (18-0110; ZYMED), p65/Rel A (sc F-6; Santa Cruz Biotechnology), as ciclinas A (Novocastra), E (14591c; PharMingen), e os inibidores de CDKs p21 (Ab-1, Oncogene Research), p16 (13251A; PharMingen) e p27 (NCL-p27; Novocastra). Estes anticorpos foram utilizados diluídos 1:1000 (1:5000 no caso de PCNA) em PBS-T com 1% de leite. Como anticorpo secundário foi utilizado um anticorpo anti-imunoglobulina de

camundongo conjugado à peroxidase (NIF-825; Amersham) diluído 1:10000 em PBS-T com 1% de leite.

3. Resultados e Discussão

3.1. Efeitos do TNF- α na proliferação celular

O TNF- α é uma proteína de 17 KDa com um amplo espectro de atividades biológicas. Caracteriza-se por ser citotóxico e citoestático para uma variedade de linhagens celulares em cultura (Denis *et al.*, 1989; Villa *et al.*, 1992; Malejczyk *et al.*, 1994; Woodworth *et al.*, 1995; Vieira *et al.*, 1996). Esta proteína é membro de uma superfamília de ligantes incluindo fatores como: TNF- β , LT- α , FasL (CD95L), OX40L, CD40L, CD27L, CD30L, 4-1BBL, LT β , Apo3L/TWEAK, APO2L/TRAIL e RANKL que possuem homologia em uma região de 50 aminoácidos na extremidade C-terminal (revisado por Baker e Reddy, 1998; Dragovich *et al.* 1998).

O TNF- α é capaz de regular tanto a expressão de genes virais em uma linhagem de queratinócitos humanos imortalizada com HPV 16 (Kyo *et al.*, 1994), quanto a proliferação de queratinócitos humanos normais e imortalizados por diferentes tipos de HPV (Villa *et al.*, 1992; Malejczyk *et al.*, 1994; Vieira *et al.*, 1996). Neste estudo, foram analisados os efeitos do TNF- α na proliferação de queratinócitos humanos normais e imortalizados por HPV 16 e HPV 18. QPH e células das linhagens 698, HF-18, 18Nco e 18.42 em cultura, com 45% a 50% de confluência foram tratadas com 2 nM de TNF- α humano recombinante. Os efeitos desta citocina sobre a proliferação das linhagens foram avaliados por ensaios de incorporação de [metil- 3 H] timidina e citometria de fluxo (FACS). Os resultados obtidos por estas abordagens são indicativos da existência de uma diferença na resposta aos efeitos antiproliferativos desta citocina entre as linhagens que apresentam HPV 16 e HPV 18. As células da linhagem 698 tratadas com TNF- α apresentaram uma acentuada redução na incorporação de [metil- 3 H] timidina em relação aos controles, contrariamente ao observado com as células da linhagem 18Nco (Figura 3), indicando uma diminuição na fração de células em proliferação.

Estes dados foram confirmados através da análise por citometria de fluxo em que foi observada uma diminuição estatisticamente significativa na fração proliferativa de células 698 tratadas com $\text{TNF-}\alpha$ quando comparadas aos controles (não tratadas com $\text{TNF-}\alpha$). Por outro lado, isto não foi observado em células das linhagens 18Nco, HF-18 e 18.42 que apresentam genes de HPV-18 (tabela 4, figuras 4 e 5). Os dados apresentados correspondem à média de um mínimo de três experimentos independentes.

Figura 3 - Medida da incorporação de [metil-³H] timidina em linhagens celulares imortalizadas com HPV 16 e HPV 18 tratadas com 2 nM de $\text{TNF-}\alpha$.

Tabela 4 - Análise por citometria de fluxo da distribuição das populações celulares (em porcentagem) nas diferentes fases do ciclo celular quando tratadas com 2 nM de TNF- α .

Linhagem	698		18Nco		HF-18		18.42	
TNF- α	-	+	-	+	-	+	-	+
G1	61,2 $\pm$ 3,1	73,4 $\pm$ 2,2	68,3 $\pm$ 4,6	70,9 $\pm$ 6,4	70,3 $\pm$ 1,8	73,7 $\pm$ 1,6	80,5 $\pm$ 9,4	81,2 $\pm$ 1,9
S	28,2 $\pm$ 1,1	18,0 $\pm$ 1,9	20,9 $\pm$ 2,1	17,8 $\pm$ 4,1	24,8 $\pm$ 3,2	19,6 $\pm$ 2,7	13,9 $\pm$ 8,6	12,6 $\pm$ 0,2
G2+M	10,6 $\pm$ 4,1	8,6 $\pm$ 2,4	10,8 $\pm$ 4,0	8,6 $\pm$ 3,1	5,0 $\pm$ 1,4	6,8 $\pm$ 3,0	5,6 $\pm$ 0,9	6,3 $\pm$ 2,1

♦ (n $\geq$ 3)

Figura 4 – Distribuição das populações celulares nas diferentes fases do ciclo celular das linhagens estudadas na presença de 2 nM de TNF- α .

(*) valores com diferenças significativas entre células tratadas e controles (P $\leq$ 0,05).

Figura 5- Inibição diferencial da proliferação de células imortalizadas por HPV 16 e HPV 18 tratadas com 2 nM de TNF- α

Estudos dos efeitos mediados pelo TNF- α mostraram que os mesmos variam em função do tipo celular e do tipo de vírus que ocasionou a infecção (Villa *et al.*, 1992; Rong *et al.*, 1996; Vieira *et al.*, 1996). Além disso, o HPV 18 apresenta uma maior capacidade que o HPV 16 de transformar células *in vitro*. Estudos realizados na região LCR destes vírus mostraram que a LCR do HPV 18 é 10 a 50 vezes mais ativa que a LCR do HPV 16, sugerindo que essa região seja a principal responsável pela maior capacidade transformadora do HPV 18 (Villa e Schlegel, 1991; Romanczuk *et al.*, 1991). A maior atividade promotora da LCR de HPV 18 poderia resultar em níveis maiores das proteínas E6 e E7 e na resistência diferencial ao TNF- α dos queratinócitos imortalizados por este tipo de vírus quando comparados aos imortalizados com HPV 16. Além disso, a perda de sensibilidade ao TNF- α em células infectadas por HPV poderia estar envolvida no processo tumorigênico como evidenciado em estudos de híbridos entre células HeLa e fibroblastos normais (Soto, *et al.* 1999) e em estudos com outras linhagens

celulares infectadas ou transformadas por HPV (Malejczyk, *et al.*, 1994; Bornstein, *et al.*, 1997).

3.2. Análise mutacional do gene p53

O gene p53 é um supressor de tumores que apresenta mutações em mais de 50% dos cânceres humanos (revisado por Levine, 1997). Alguns estudos têm mostrado que a sensibilidade ao TNF- α encontra-se associada à presença da proteína p53 ativa (Cai *et al.*, 1997; Klefstrom *et al.*, 1997).

Foi observado que a proteína E6 de HPV de alto risco é capaz de ligar-se à proteína p53 e promover a sua degradação pela via de proteólise dependente de ubiquitinação e se supõe que desempenhe um papel fundamental no processo de transformação celular (revisado por Levine, 1997; Thompson *et al.*, 1997).

A diferença na sensibilidade de células imortalizadas por HPV 16 e HPV 18 aos efeitos antiproliferativos do TNF- α poderia dever-se a alguma mutação no gene p53 ou aos baixos níveis celulares desta proteína devido à degradação mediada por a proteína viral E6. Por outro lado, foi observado que p53 pode manter certos níveis de atividade basal mesmo na presença desta oncoproteína viral (Butz *et al.*, 1995; Butz *et al.*, 1999). No entanto, se desconhece se esta atividade basal poder ser suficiente para mediar a resposta ao TNF- α .

Com o objetivo de determinar se uma mutação em p53 pode ser a responsável pela diferente sensibilidade ao TNF- α nestas linhagens, foi realizado o seqüenciamento dos exons 5 a 9 deste gene. Estes exons apresentam 88% de todas as mutações já descritas no gene p53 (Walker *et al.*, 1999).

Os produtos de PCR destes exons foram clonados, e dois clones de cada exon foram submetidos a seqüenciamento automático no sentido "forward" e "reverse". As seqüências geradas foram comparadas com as seqüências selvagens depositadas no GenBank (números de acesso M13115-19) e verificou-se a ausência de mutações nos exons 5 a 9 do gene p53 destas linhagens.

Foi realizado também o estudo do polimorfismo no codon 72 do gene p53. Este polimorfismo consiste na presença de uma Arginina ou uma Prolina na posição 72 da proteína. Em um trabalho recente realizado por Storey e col. (1998) foi mostrado que a proteína que apresenta Arg é mais susceptível à degradação por E6 de HPVs de alto risco, e que indivíduos homozigotos para o alelo Arg são sete vezes mais susceptíveis a tumores associados a infecções por HPV que indivíduos heterozigotos. Por outro lado, existem vários estudos que não encontram essa relação (Giannoudis *et al.*, 1999; Hayes *et al.*, 1998; Helland *et al.*, 1998; Hildesheim *et al.*, 1998; Josefsson *et al.*, 1998; Klaes *et al.*, 1999; Madeleine *et al.*, 1999; Minaguchi *et al.*, 1998; Muñoz *et al.*, 1999; Riou *et al.*, 1999; Rosenthal *et al.*, 1998). De todos modos, as variantes polimórficas no codon 72 da proteína p53 tem mostrado possuir propriedades biológicas e bioquímicas diferentes (Thomas *et al.*, 1999)

Neste estudo, tanto a linhagem 698 quanto a linhagem 18Nco mostraram ser heterozigotos para os alelos Arg/Pro (Figura 6). Esta observação sugere que este polimorfismo não estaria envolvido na resposta ao TNF- α , porém não permite excluir que a homozigose para algum destes alelos pudesse influir na resposta à ação desta citocina.

Figura 6 - Polimorfismo no codon 72 do gene p53 das linhagens 698 e 18Nco. Ambas linhagens são heterozigotas para os alelos Pro/Arg. P/A, controle positivo de indivíduo heterozigoto; P, indivíduo homozigoto para o alelo Pro; MP, marcador de peso molecular. As setas indicam os produtos esperados para cada alelo (141pb Arg; 170pb Pro).

3.3. Expressão de genes reguladores do ciclo celular

Para caracterizar no nível molecular, possíveis diferenças entre as linhagens celulares utilizadas que pudessem explicar as diferentes respostas ao TNF- α , foram analisados os níveis de expressão de vários genes reguladores do ciclo celular. Com este objetivo foram conduzidos ensaios de *Northern blot* e *Western blot* para avaliar os níveis de p16, p21, p27, p53, p65, ciclina A, ciclina D1, ciclina E, CDK-2, CDK-4 e CDK-6.

3.3.1. p53, p21 e p16

O produto do gene p53 é um fator de transcrição que regula positivamente a expressão de vários genes (p21, MDM2, GADD45, Bax e outros) envolvidos na regulação do ciclo celular. Alguns estudos têm mostrado que a sensibilidade ao TNF- α encontra-se associada à presença da proteína p53 ativa (Cai *et al.*, 1997; Klefstrom *et al.*, 1997). O produto do gene p21 é um inibidor de quinases dependentes de ciclinas sendo responsável, quando expresso, pela parada do ciclo celular na fase G1. Este gene apresenta um sítio de união a p53 na sua região promotora, sendo diretamente regulado por este fator (revisado por Levine, 1997; Jiang e Proter, 1998; Thomas *et al.*, 1999). Uma vez que a proteína E6 de HPV de alto risco é capaz de ligar e induzir a degradação da proteína p53 pela via de proteólise dependente de ubiquitinação (revisado por zur Hausen, 1996; Thompson *et al.*, 1997), e que a proteína p53 tem sido envolvida na via de ação de TNF em diversas linhagens celulares (Cai *et al.*, 1997; Sleijfer *et al.*, 1999), tornou-se necessário analisar os níveis destes fatores nas linhagens estudadas.

No presente estudo foi observado que todas as linhagens analisadas apresentaram uma diminuição nos níveis de RNAm para p53 após tratamento com TNF- α (figura 7). Lamentavelmente, não foi possível confirmar este fato ao nível proteico. Isto foi devido a que o anticorpo policlonal utilizado originou uma grande quantidade de bandas inespecíficas fortes tornando muito difícil a identificação da banda específica (figura 8). A utilização de um anticorpo monoclonal anti-p53 seria importante para determinar em forma precisa os efeitos do TNF- α sobre os níveis de p53 nas linhagens analisadas.

Figura 7 – Efeito do TNF- α nos níveis de RNAm de p53 em queratinócitos normais ou imortalizados por HPV 16 ou 18. Os níveis de RNAm para p53 em amostras controle e tratadas com 2 nM de TNF- α foram determinados por *Northern blot*.

Figura 8 – Resultado representativo obtido por *Western Blot* utilizando um anticorpo policlonal anti-p53 em extratos totais de queratinócitos normais ou transduzidos com genes de HPV 18. Observar o grande número e a intensidade das bandas inespecíficas.

Um aumento estatisticamente significativo nos níveis de RNAm de *p21* foi observado apenas nas células imortalizadas por HPV 16 após tratamento com TNF- α (figuras 9 e 10). No entanto, queratinócitos normais e células da linhagem HF-18 apresentaram um aumento marginal dos níveis de RNAm para *p21*, enquanto que a linhagem 18.42 apresentou níveis comparativamente elevados de RNAm para *p21* independentemente de terem sido ou não tratadas com a citocina. Isto poderia significar que a resposta diferencial da linhagem 698 aos efeitos do TNF- α poderia estar associada a um aumento nos níveis de *p21*. Cabe ressaltar que os queratinócitos normais não apresentaram aumentos significativos nos níveis de RNAm de *p21*. Por outro lado, um aumento nos níveis de RNAm não significa obrigatoriamente que os níveis da proteína *p21* tenham aumentado. Assim, foram analisados os níveis desta proteína nas linhagens em estudo quando tratadas com TNF- α (figura 10). Os resultados mostram uma indução marginal da proteína *p21* em linhagens sensíveis ao TNF- α . Isto não foi observado nas linhagens resistentes. A ausência de significado estatístico para a indução nas linhagens sensíveis poderia ser devida à grande variação existente entre experimentos independentes, entretanto, em todos foi observada indução. Além disso diversos estudos mostraram a importância de pequenas alterações nos níveis da proteína *p21* uma vez que a estequiometria deste fator nos complexos *p21*/ciclina/CDK é fundamental na regulação da atividade dos mesmos (revisado por Ball, 1997; Gartel *et al.*, 1999).

Figura 9 – Níveis relativos de RNAm de p21 e p16 em queratinócitos normais ou imortalizados por HPV 16 ou 18 após tratamento com 2 nM de TNF- α . Os níveis de RNAm foram determinados por *Northern blot* e normalizados em função dos níveis de RNAm para GAPDH. (*) valores com diferenças significativas entre células tratadas e controles ($P \leq 0,05$).

O aumento dos níveis da proteína p21 em queratinócitos normais e na linhagem 698 poderia ser a causa da sua sensibilidade ao TNF- α . Nossos dados não permitem determinar se o aumento de p21 está relacionado à atividade de p53. No entanto, o aumento de p21 em resposta ao TNF- α poderia ocorrer por vias independentes de p53 (Shiohara *et al.*, 1996; Yoshida *et al.* 1996). Recentemente, foram observados níveis menores de p21 em células de carcinoma cervical em relação às células normais (Kim *et al.*, 1998). Este fato, junto aos dados aqui apresentados, ressalta a importância do gene p21 na resposta ao TNF- α em células que expressam genes de HPV. Gaiotti e cols. (2000) observaram que o aumento da expressão dos genes E6/E7 de HPV e da atividade das quinases dependentes de ciclinas CDK-2 e cdc2, promovido pelo TNF- α em queratinócitos humanos imortalizados com HPV, na ausência de fatores de crescimento, estaria relacionado à diminuição dos níveis de p21.

Figura 10 - Efeitos do $\text{TNF-}\alpha$ sobre a expressão de *p21* em queratinócitos normais ou imortalizados por HPV 16 ou 18 após tratamento com 2 nM de $\text{TNF-}\alpha$ por 60 horas. (A) esquema da proteína *p21* mostrando os domínios de interação com fatores celulares tais como ciclinas (C1 e C2), CDKs e PCNA e com a proteína E7 de HPV. Os níveis de RNAm e de proteína *p21* foram determinados por *Northern blot* (B) e *Western blot* (C), respectivamente.

Foi também realizado o estudo da expressão de um outro gene que codifica para um inibidor de quinases dependentes de ciclinas, o *p16*. Os resultados obtidos mostram que os níveis de RNAm nas linhagens estudadas não se alteraram após o tratamento com TNF- α (figuras 9 e 11). Por outro lado, verificou-se que as linhagens que apresentam HPV possuem níveis maiores de RNAm para *p16* que os queratinócitos normais. Como o observado para *p21*, nas células 18.42 foram detectados os maiores níveis de mRNA para *p16*.

Nakao e cols. (1997), descreveram a indução de *p16* em células imortalizadas por HPV 16 e HPV 18, mas não em células transformadas por esses vírus. A análise dos níveis da proteína *p16* revelou que estes não se alteraram após o tratamento com TNF- α , sendo que os QPH apresentaram níveis baixos desta proteína (figura 11). Sugeriu-se que *p16* não exerce um papel importante no desenvolvimento do câncer cervical (Kim *et al.*, 1998; Munirajan *et al.*, 1998). Por outro lado, existem evidências do envolvimento de alterações nos níveis de *p16* na carcinogênese cervical e da associação destas alterações com o tipo de HPV presente (Kim *et al.*, 1998; Sano *et al.*, 1998; Park *et al.* 1999). Mais ainda têm sido descritas associações entre HPV, níveis de *p16* e carcinomas orais (Saito *et al.*, 1999).

A

B

C

Figura 11- Efeitos do TNF- α sobre a expressão de *p16* em queratinócitos normais ou imortalizados por HPV 16 ou 18 após tratamento com 2 nM de TNF- α por 60 horas. (A) esquema da via de regulação da atividade da proteína *p16*. Os níveis de RNAm e de proteína *p16* foram determinados por *Northern blot* (B) e *Western blot* (C), respectivamente.

3.3.2. p27

O produto do gene p27 é um inibidor (CKI) de quinases dependentes de ciclinas (CDKs) sendo responsável, quando expresso, pela parada do ciclo celular na fase G1. Esta proteína inibe a progressão entre as fases G1/S do ciclo celular por interação com os complexos ciclina D1-CDK 4/CDK 6, ciclina E/CDK 2 (revisado por Sgambato *et al.*, 2000).

O estudo da expressão do inibidor de CDKs, p27, em QPH e em linhagens de queratinócitos imortalizados por HPV 16 (698) e por HPV 18 (18Nco, HF-18 e 18.42) mostrou que esta proteína não é detectada em extratos proteicos obtidos a partir de culturas em monocamada de QPH e da linhagem 698 (sensíveis ao TNF- α) e que é expressa em baixos níveis nas linhagens 18Nco, HF-18 e 18.42 (resistentes ao TNF- α ; figura 12). Nos epitélios normais e em culturas organotípicas obtidas a partir de queratinócitos que expressam genes de HPV 16 ou 18 esta proteína é expressa nas camadas suprabasais (mais diferenciadas) (Figuras 25, 26 e 27). Isto indica que a expressão deste fator varia com o grau de diferenciação da célula epitelial e explica o fato não ter sido detectado em culturas em monocama de QPH. Os efeitos do TNF- α sobre a expressão de p27 parecem depender do tipo celular estudado. Por exemplo, enquanto o TNF- α ativa a expressão de p27 em macrófagos da medula óssea (Okahashi *et al.*, 2001) existem estudos indicando que, na ausência de fatores de crescimento, o TNF- α estimula a proliferação de linhagens de queratinócitos imortalizados por HPV (Woodworth *et al.*, 1995) e que este efeito estaria mediado, em parte, pela diminuição nos níveis de p27 (Gaiotti *et al.*, 2000).

A importância da diminuição dos níveis da proteína p27 na patogênese por HPV tem sido mostrada por diferentes estudos de amostras de carcinoma cervical (Skomedal *et al.*, 1999; Saito *et al.* 1999; Kim *et al.*, 2000). No presente trabalho, não foram observadas alterações nos níveis de p27 após tratamento com TNF- α . Mais ainda, as linhagens resistentes aos efeitos desta citocina apresentaram

níveis maiores de p27 (figura 12). O fato que as três linhagens que apresentaram níveis detectáveis de p27 são imortalizadas por HPV 18 sugere que isto poderia ser um efeito que depende do tipo de HPV presente nas células. Por tanto, torna-se necessário o estudo de outras linhagens imortalizadas por HPV 16 para esclarecer este ponto.

Figura 12 – Efeito do TNF- α nos níveis de p27. O nível de expressão desta proteína foi determinado por *Western blot* utilizando extratos proteicos totais de queratinócitos imortalizados por HPV 18 após tratamento com 2 nM de TNF- α por 60 horas.

3.3.3 Ciclinas e CDKs

Os níveis de outras proteínas reguladoras do ciclo celular (ciclinas A, D1, E e CDK 4 e 6) foram determinados por *Western blot*. A determinação dos níveis destas proteínas é relevante, já que tem sido observado que a proteína E7 dos HPV se associam aos complexos ciclina A-CDK-2 e ciclina E-CDK-2 tornando-os resistentes à inibição por p21 e, dessa forma, levando à progressão da fase S (Ruesch e Laimins, 1997). Além disso, a proteína E7 parece regular positivamente a expressão da ciclina E, um fator fundamental para a transição entre as fases G1 e S do ciclo celular (Vogt *et al.*, 1999). Em estudos recentes foi observado que o complexo ciclina E-CDK-2 é fundamental para a replicação do DNA do HPV e que o gene da ciclina E encontra-se super-expresso em carcinomas cervicais e em linhagens celulares que expressam E7 (Martin *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2000). Finalmente, tem sido mostrado que a estabilização da proteína p21

induzida pela oncoproteína E7 de HPV 18 é mediada pela formação de complexos ciclina E/CDK2/p21 inativos (Noya *et al.*, 2001). No presente estudo, não foram detectadas alterações nos níveis da ciclina E após tratamento com TNF- α . No caso da ciclina A, observamos uma redução dos níveis desta proteína na linhagem 698 após o tratamento com TNF- α (figura 13). Isto não foi observado nas linhagens resistentes ao TNF- α confirmando observações prévias feitas em nosso laboratório (Vieira *et al.*, 1996). A diminuição dos níveis de ciclina A em células sensíveis ao TNF- α poderia estar diretamente envolvida na inibição da proliferação mediada por esta citocina, uma vez que esta ciclina é fundamental para a entrada das células na fase S (revisado por Hamel e Hanley-Hyde, 1997).

Finalmente, não foram observadas diferenças nos níveis da ciclina D1 e das CDKs 4 e 6 após tratamento com TNF- α (figura 13). Estas proteínas, importantes na progressão através da fase G1 do ciclo celular, são alvo de inibição pela proteína p16 (Kim *et al.*, 1998; Munirajan *et al.*, 1998). Os complexos ciclina D1 CDK4 ou 6 fosforilam a proteína pRb tornando-a inativa e produzindo a liberação do fator E2F. Este fator é capaz de ativar a expressão dos genes das ciclinas A, D e E induzindo a progressão do ciclo celular (Martin *et al.*, 1998). Os possíveis efeitos destas proteínas na proliferação de células imortalizadas por HPV, na presença ou na ausência de TNF- α , poderiam ser resultado da relação entre os níveis destas proteínas, os níveis de p16 e os níveis relativos de E7. No entanto, no presente estudo não foi determinada a atividade de CDK4 ou CDK6. Este fato é importante uma vez que o tratamento com TNF- α poderia alterar a atividade destes fatores sem ter efeito sobre os níveis celulares dos mesmos.

Figura 13- Efeito do TNF- α na expressão das ciclinas A, E, D1 e CDK-4, CDK-6. Os níveis destas proteínas foi determinado por *Western blot* utilizando extratos proteicos totais de queratinócitos imortalizados por HPV 16 ou 18 após tratamento com 2 nM de TNF- α por 60 horas.

3.4. Ativação do NF- κ B pelo TNF- α

Neste estudo, foram analisados os efeitos do TNF- α na ativação do fator NF- κ B em queratinócitos primários humanos (QPHs) e em queratinócitos imortalizados ou transformados por HPV 16 e HPV 18. Culturas de QPHs e das linhagens 698, 18Nco, SiHa, CasKi, HeLa e SW756 com 45% a 50% de confluência foram tratadas com 2 nM de TNF- α humano recombinante por 1 hora. Os extratos proteicos nucleares obtidos a partir destas culturas foram submetidos ao ensaio de retardamento em gel. Interessantemente, os QPHs e as células da linhagem 698 apresentaram uma clara ativação do fator NF- κ B evidenciada pelo aumento da concentração deste fator no núcleo das células após o tratamento (Figura 14). Por outro lado, não foi observado um aumento da concentração do fator NF- κ B nos extratos nucleares nas linhagens celulares 18Nco, SiHa, CasKi, HeLa e SW756 (que são resistentes ao efeito antiproliferativo do TNF- α , figura 15). Estes dados indicam a presença de uma alteração na via de ativação do NF- κ B nas linhagens resistentes ao TNF- α . Esta alteração aliada à falta de indução do inibidor de quinases p21 descrita anteriormente, poderia explicar a resistência destas linhagens aos efeitos antiproliferativos do TNF- α . Além disso, Fontaine e cols. (2000) tem mostrado a existência de um sítio de ligação ao NF- κ B na LCR do HPV 16. Estes autores mostraram que a atividade da LCR de HPV 16 é inibida quando a proteína p65 (Rel A) é superexpressa. Mais ainda, existem estudos que mostram que alterações na ativação do NF- κ B ou de genes regulados por este fator poderiam estar associadas à patogênese exercida pelo HPV (Kaltschmidt *et al.*, 1999; Nees *et al.*, 2001). Por outro lado, existem estudos que mostram a forte ativação do NF- κ B em células HeLa após tratamento com TNF- α (Bachman *et al.*, 2001). Esta diferença poderia dever-se às diferentes concentrações da citocina utilizadas uma vez que no estudo realizado por Bachman e cols. (2001) a concentração de TNF- α utilizada foi pelo menos três vezes maior à utilizada no presente trabalho.

Visando determinar o papel das oncoproteínas E6 e E7 na alteração da ativação do NF- κ B foram realizados ensaios de retardamento em gel utilizando extratos nucleares de culturas de QPHs transduzidos com vetores retrovirais que expressam as oncoproteínas de HPV 16 e 18. Na Figura 16 são apresentados os resultados destes ensaios. Em todos os casos foi observada ativação do NF- κ B após o tratamento com TNF- α . Isto indica que, pelo menos no caso da expressão aguda, as oncoproteínas E6 e/ou E7 não alterariam a ativação do NF- κ B. Porém, o fato que a expressão destas oncoproteínas é dirigida pelo promotor autólogo de HPV deve ser levado em conta uma vez que a atividade do mesmo depende estritamente do programa de diferenciação dos queratinócitos. Este fato, considerando as condições de cultura em monocamada, que tendem a minimizar a diferenciação dos queratinócitos poderia ter como resultado um baixo nível desta proteínas. No presente estudo foi também utilizado um vetor que expressa a proteína E7 a partir do promotor retroviral que é independente da diferenciação dos queratinócitos. Mesmo nestas condições não foram observadas alterações na ativação do NF- κ B pelo TNF- α . Portanto, torna-se necessário realizar uma análise na que se atinjam níveis maiores da oncoproteína E6 em forma independente ou em combinação com E7. Além disso, a utilização de inibidores específicos para este fator nas linhagens acima descritas e em queratinócitos que expressem diferentes genes de HPV 16 ou 18 poderia contribuir na compreensão do papel deste fator na oncogênese mediada pelo HPV.

Figura 14 – Efeito diferencial do TNF- α na ativação do fator NF- κ B em queratinócitos normais e imortalizados de HPV 16 ou HPV 18 após tratamento com 2 nM de TNF- α por 45 minutos. (♦) Competição com oligonucleotídeo mutado (não reconhecido pelo NF- κ B). (♣) Competição com 50X de oligonucleotídeo frio.

Figura 15 – Efeito diferencial do TNF- α na ativação do NF- κ B em linhagens celulares transformadas por HPV 16 ou HPV 18 após tratamento com 2 nM de TNF- α por 45 minutos. (♦) Competição com 50X de oligonucleotídeo frio. (♣) Competição com oligonucleotídeo mutado (não reconhecido pelo NF- κ B).

Figura 16 – Efeito do $\text{TNF-}\alpha$ na ativação do $\text{NF-}\kappa\text{B}$ em QPHs transduzidos com vetores retrovirais que expressam a proteínas E6 e/ou E7 de HPV 16 e 18 após tratamento com 2 nM de $\text{TNF-}\alpha$ por 45 minutos. (♦) Competição com 50X de oligonucleotídeo frio. (♣) Competição com oligonucleotídeo mutado (não reconhecido pelo $\text{NF-}\kappa\text{B}$).

3.4.1. p65

A proteína p65 (Rel A) é um dos principais componentes do fator NF- κ B uma vez que a sua capacidade de ativação da transcrição é uma das maiores dentre as proteínas da família Rel (revisado por Karin e Ben-Neriah, 2000). Observamos que os níveis desta proteína em QPHs e nas linhagens imortalizadas por HPV 16 ou 18 não foram alteradas pelo tratamento com TNF- α (figura 17). Isto era esperado, uma vez que a regulação da atividade do fator NF- κ B acontece principalmente pela união a proteínas inibitórias específicas (I κ B) no citoplasma celular.

Figura 17 – Efeitos do TNF- α na expressão de p65. O nível de expressão desta proteína foi determinado por *Western blot* utilizando extratos proteicos totais de queratinócitos normais ou imortalizados por HPV 16 ou 18.após tratamento com 2 nM de TNF- α por 60 horas.

3.5. Efeitos do TNF- α em culturas organotípicas de queratinócitos normais e portadores de genes de HPV 16 ou 18

O sistema convencional de cultura de queratinócitos em monocamada seleciona aquelas células capazes de proliferar. Nestas condições os queratinócitos apresentam capacidade limitada de diferenciação. Por outro lado, o sistema de cultura organotípica (*raft*) permite a proliferação e a diferenciação celular de maneira semelhante à observada nos epitélios escamosos conforme esquematizado na figura 18 (revisado por Chow e Broker, 1997). Assim, o sistema de cultura organotípica é um sistema ideal para o estudo da história natural de células que contêm DNA do HPV uma vez que a expressão dos genes deste vírus depende estritamente de fatores celulares que são expressos em diferentes etapas do programa de diferenciação dos queratinócitos (Delvenne, *et al.* 2001; Flores *et al.*, 2000; revisado por Howley, 1996; zur Hausen, 1996).

Para estudar os efeitos do TNF- α em queratinócitos que expressam genes de HPV em um sistema capaz de reproduzir o ciclo de vida destas células em uma estrutura semelhante ao tecido epitelial natural foram utilizadas culturas organotípicas de QPHs normais ou transduzidos com retrovírus que expressam os genes E6 e/ou E7 de HPV 16 ou 18 a partir da LCR correspondente. Além disso foram utilizadas culturas organotípicas de QPHs transduzidos com retrovírus que expressam a oncoproteína E7 de HPV 18 a partir da LTR (*Long Terminal Repeat*), e culturas organotípicas de QPHs transfectados com o genoma completo de HPV 16 ou 18. Estas culturas foram tratadas com 2nM de TNF- α humano recombinante por 72 horas. Na figura 19 é apresentado um exemplo das alterações morfológicas produzidas pelo tratamento com TNF- α . Observa-se a alteração morfológica do tecido epitelial produzida pela expressão das proteínas virais em comparação com a estrutura do tecido produzido pelos QPHs normais. Os *rafts* transduzidos com os genes virais apresentam um alargamento das camadas espinosa e de transição. Mais ainda, os núcleos celulares são maiores e observa-se um arredondamento das células da camada granular. Após o tratamento com TNF- α os *rafts*

apresentaram uma morfologia mais achatada nas células da camada basal. Este achatamento foi mais evidente nos *rafts* derivados de queratinócitos normais mas é claramente observado também, nos *rafts* de queratinócitos transduzidos com os genes E7 ou E6/E7 de HPV 18. Estas alterações morfológicas induzidas pelo TNF- α foram consistentemente observadas (com variações entre experimentos) em todos os *rafts* analisados. Por outro lado, as alterações morfológicas induzidas pelos genes de HPV 16 ou 18 transduzidos foram mais evidentes quando o gene E7 encontrava-se presente (figuras 19c-f, 20c-f, 21e-f, 22e-h).

Figura 18 – Imagem de um corte transversal de uma cultura organotípica de QPH mostrando a correspondência com as diferentes camadas da epiderme. As pontas de setas indicam a membrana basal.

Os efeitos do TNF- α sobre a proliferação dos queratinócitos nas culturas organotípicas foram avaliados pela incorporação de 5-bromodesoxiuridina (BrdU). Os *rafts* de queratinócitos normais apresentaram uma marcada inibição da proliferação após tratamento com TNF- α . Isto é indicado pela diminuição no número de células da camada basal que incorporaram BrdU (figuras 20b, 21b e 22b). No entanto, a incorporação de BrdU nos *rafts* derivados de células transfectadas com o genoma completo do HPV 18 não foi afetada pelo tratamento com esta citocina. Estes *rafts* apresentaram incorporação de BrdU em todas as camadas do tecido epitelial. Vários estudos tem mostrado que a síntese de DNA nas camadas de células pos-mitóticas e em queratinócitos diferenciados é induzida pelo gene E7 de HPV 16 ou 18 (Cheng *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 1997; Ruesch e Laimins, 1997; Flores *et al.*, 2000). Mais ainda, os *rafts* derivados de queratinócitos transduzidos com retrovírus que expressam os genes E6/E7 de HPV 16, E6/E7 ou E7 de HPV 18 também apresentaram incorporação de BrdU nas camadas suprabasais do tecido epitelial. Entretanto, nestes casos a incorporação de BrdU foi parcialmente inibida pelo tratamento com TNF- α indicando que estes genes virais conferem aos queratinócitos uma resistência ao TNF- α , que não é observada em queratinócitos normais. Estudos recentes mostram, de fato, que a proteína E7 de HPV 16 é capaz de conferir resistência ao TNF- α em diferentes tipos celulares (Basile *et al.*, 2001; Thompson *et al.*, 2001).

Um efeito muito particular foi observado nos *rafts* obtidos com queratinócitos transfectados com o genoma completo do HPV 16 protótipo. O genoma de HPV 16 utilizado para realizar a transfecção apresenta uma mutação *nonsense* no gene E1, tornando-o inativo. O produto deste gene tem atividade de helicase e é indispensável para replicação viral (revisado por zur Hausen, 1996). Nestes *rafts*, a incorporação de BrdU também foi observada nas camadas suprabasais. No entanto, e contrariamente ao observado para o HPV 18, a síntese de DNA foi claramente inibida pelo TNF- α . Estes dados indicam que o controle da replicação viral poderia ser um fator importante na resistência ao TNF- α . Portanto, torna-se necessário repetir estes experimentos utilizando o genoma do HPV 16 com o gene

E1 intacto. Além disso, a realização de experimentos com o genoma completo do HPV 18 com uma mutação semelhante no gene E1 poderia contribuir ao esclarecimento do papel da replicação viral na resistência ao TNF- α .

Os *rafts* de queratinócitos transduzidos com retrovírus que expressam apenas o gene E6 de HPV 16 o 18 apresentaram incorporação de BrdU apenas em células da camada basal. A incorporação de BrdU não foi inibida pelo TNF- α . Isto indica que a expressão do gene E6 nas células da camada basal poderia conferir resistência ao TNF- α . Esta é uma observação interessante uma vez que, geralmente, baixos níveis de RNAm viral são observados nas camadas basais. Por outro lado, a transcrição viral aumenta nas camadas de células diferenciadas (Dürst *et al.*, 1992; Steenbergen *et al.*, 1998).

Estas observações sugerem que várias propriedades virais poderiam estar contribuindo na resistência aos efeitos antiproliferativos do TNF- α em queratinócitos. O produto do gene E7 seria importante na indução da replicação do DNA em células diferenciadas mesmo na presença de sinais inibitórios. Além disso, a proteína E6 (provavelmente junto à proteína E7) poderia contribuir na manutenção da proliferação celular na camada basal após tratamento com TNF- α . Mais ainda, a replicação viral poderia ter um papel importante neste fenômeno. Finalmente, o fato que os *rafts* de queratinócitos transfectados com o genoma completo do HPV 18 foram os menos afetados pelo TNF- α , em comparação aos que apresentavam apenas os genes E6 e/ou E7, sugere que outros genes virais poderiam estar envolvidos na aquisição de resistência a esta citocina.

Figura 19 - Imagens de cortes transversais de rafts de QPH e queratinócitos transduzidos com genes de HPV 18 após coloração com Hematoxilina e Eosina. Notar as alterações morfológicas induzidas pelos genes virais e aquelas resultantes do tratamento com TNF- α . As pontas de setas indicam a membrana basal.

Figura 20 – Efeitos do TNF- α na proliferação celular em rafts de QPH e queratinócitos transfectados com o genoma completo de HPV 16 ou 18. As setas indicam células que incorporaram BrdU, detectadas por IHQ. As pontas de setas indicam a membrana basal.

Figura 21 – Efeitos do TNF- α na proliferação celular em rafts de QPH e queratinócitos transduzidos com genes de HPV 16. As setas indicam células que incorporaram BrdU, detectadas por IHQ. As pontas de setas indicam a membrana basal.

Figura 22 – Efeitos do TNF- α na proliferação celular em rafts de QPH e queratinócitos transduzidos com genes de HPV 18. As setas indicam células que incorporaram BrdU, detectadas por IHQ. As pontas de setas indicam a membrana basal.

3.6. Expressão de genes reguladores do ciclo celular

Visando identificar no nível molecular, características dos *rafts* utilizados que pudessem explicar as diferentes respostas ao TNF- α , foram analisados os níveis de expressão de vários genes reguladores do ciclo celular. Os níveis relativos das proteínas p16, p21, p27, p65, ciclina A, PCNA e ciclina E foram determinados por *western blot*. Além disso, a distribuição nas diferentes camadas do epitélio dos inibidores de quinase p21 e p27 foi determinada por imunofluorescência dupla junto com BrdU.

3.6.1. p21 e p27

Como descrito anteriormente os genes p21 e p27 são inibidores (CKI) de quinases dependentes de ciclinas (CDKs) sendo responsáveis, quando expressos, pela parada do ciclo celular na fase G1. As proteínas codificadas por estes genes apresentam homologia na sequência de aminoácidos principalmente na região aminoterminal. Nesta região, encontra-se o sítio de união às ciclinas, fundamental na atividade inibitória destes fatores. Estas proteínas inibem a progressão entre as fases G1/S do ciclo celular por interação com os complexos ciclina D1-CDK 4/CDK 6, ciclina E/CDK 2. Além disso, a proteína p21 pode ligar-se e inativar o produto do gene PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), um fator importante na atividade da DNA polimerase δ (revisado por Kato, 1999; Gartel *et al.*, 1996; Graña e Reddy, 1995). A proteína p21 é expressa em níveis basais em queratinócitos normais mas é induzida em queratinócitos que expressam o gene E7 de HPV 18 inibindo a síntese de DNA induzida pela oncoproteína viral (Jian *et al.*, 1998; Jian *et al.* 1999; Noya *et al.*, 2001). No presente estudo não foi observada a indução de p21 em *rafts* de queratinócitos normais ou que expressam a proteína E6 de HPV 16 ou 18. No entanto, *rafts* de queratinócitos que transduzidos com os genes E7 ou E6/E7 de HPV 18 ou transfectados com o genoma completo do HPV 16 ou 18

apresentaram um claro aumento nos níveis desta proteína nas camadas suprabasais. Em nenhum dos casos, os níveis de p21 foram alterados pelo tratamento com TNF- α indicando que este fator não estaria envolvido nos efeitos causados por esta citocina (figuras 23 e 24). Uma observação a ser destacada é a indução marginal de p21 em *rafts* de queratinócitos transduzidos com os genes E6/E7 de HPV 16 quando comparada à obtida com os mesmos genes de HPV 18. Isto poderia ser consequência de uma menor atividade da LCR do HPV 16 (ver abaixo) pela qual seriam produzidas quantidades menores da proteína E7. Mais ainda, a indução de p21 obtida pelo genoma completo de HPV 16 mesmo sendo evidente, foi menor que a ocasionada pelo genoma completo de HPV 18. É razoável supor que o defeito na replicação do HPV 16, pela alteração no gene E1 descrita acima, tenha como consequência a presença de níveis menores da proteína E7 (e de outras proteínas virais) podendo explicar a menor indução de p21 observada. Novamente, torna-se necessária a realização de experimentos utilizando o genoma completo do HPV 16 visando esclarecer este ponto.

O estudo da expressão do inibidor de CDKs p27 mostrou que esta proteína é expressa nas camadas suprabasais tanto de *rafts* obtidos a partir de queratinócitos normais quanto dos obtidos a partir de queratinócitos que expressam genes de HPV 16 ou 18 (figuras 25, 26 e 27). Os níveis assim como sua distribuição, não foram alterados pelo TNF- α indicando que os efeitos da citocina seriam independentes de p27. Os efeitos do TNF- α sobre a expressão de p27 parecem depender do tipo celular estudado. Por exemplo, enquanto o TNF- α ativa a expressão de p27 em macrófagos da medula óssea (Okahashi *et al.*, 2001) existem estudos indicando que, na ausência de fatores de crescimento, o TNF- α estimula a proliferação de linhagens de queratinócitos imortalizados por HPV (Woodworth *et al.*, 1995) e que este efeito estaria mediado, em parte, pela diminuição nos níveis de p27 (Gaiotti *et al.*, 2000).

A importância da diminuição dos níveis da proteína p27 na patogênese por HPV tem sido mostrada por diferentes estudos de amostras de carcinoma cervical

(Skomedal *et al.*, 1999; Saito *et al.* 1999; Kim *et al.*, 2000). No presente trabalho, não foram observadas alterações nos níveis de p27 apesar da presença de genes de HPVs de alto risco. Isto poderia ser explicado pelas diferentes alterações sofridas pelos queratinócitos presentes nas lesões produzidas pelos HPVs indicando que a diminuição dos níveis de p27 poderia ser um evento tardio na evolução das mesmas. Neste caso, a diminuição de p27 não seria observada nas culturas utilizadas uma vez que os queratinócitos utilizados estiveram pouco tempo (15 a 20 dias) em contato com os oncogenes virais.

Os níveis das proteínas p21 e p27 também foram analisados por *Western blot* de extratos proteicos obtidos a partir de culturas organotípicas. Os resultados obtidos estão de acordo com os descritos acima (figura 28a e 28c).

3.6.2. p16, p65, PCNA, ciclinas A e E

Foi também realizado o estudo da expressão de outros genes envolvidos na regulação da proliferação celular. A proteína p16 pertence à família INK4 de inibidores específicos de CDK4 e CDK6 (revisado por Graña e Reddy, 1995). Os resultados gerados mostram que os *rafts* obtidos a partir de QPHs não apresentam níveis detectáveis desta proteína (figura 28). Por outro lado, os *rafts* de queratinócitos com os genoma completos de HPV 16 ou 18 apresentaram altos níveis desta proteína. A importância deste fator nos mecanismos de oncogênese mediados por HPV foi discutida na seção 3.3.1.

Nossos dados indicam que a regulação positiva de p16 é um evento que acontece rapidamente após a infecção pelo vírus e está de acordo com o observado em lesões produzidas por HPVs de alto risco (Klaes *et al.*, 2001). Além disso, foi observada uma diminuição dos níveis de p16 após o tratamento com TNF- α . O mecanismo pelo qual o TNF- α inibe a expressão de p16 não é conhecido, mas as implicações podem ser importantes uma vez que foi mostrado que fatores da

família INK4 inibem a atividade do fator NF- κ B, um importante mediador do efeito antiproliferativo do TNF- α em queratinócitos (Seitz *et al.*, 1998; Wolff e Naumann, 1999; Chaturvedi *et al.*, 1999; van Hogerlinden *et al.*, 1999; Komine *et al.*, 2000; Seitz *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2001).

Também foram analisados os níveis da proteína p65 (Rel A), um dos principais componentes do fator NF- κ B. Observamos que os níveis desta proteína foram semelhantes tanto em *rafts* derivados de QPHs quanto nos derivados de queratinócitos transfectados com os genomas completos de HPV 16 ou 18, mesmo após tratamento com TNF- α . Isto era esperado, uma vez que a regulação da atividade do fator NF- κ B acontece principalmente pela união a proteínas inibitórias específicas (I κ B) no citoplasma celular.

Os níveis de outras proteínas reguladoras do ciclo celular (ciclina A, E e PCNA) foram determinados por *Western blot* (figura 28). A análise de extratos proteicos de *rafts* obtidos a partir de queratinócitos normais ou transfectados com o genoma completo de HPV 16 ou 18 mostrou que os níveis de ciclina E não foram alterados pelo tratamento com TNF- α . Estes dados estão de acordo com o observado em culturas em monocamada de QPH e queratinócitos imortalizados pelo HPV 16 ou 18 (ver seção 3.3.3).

No caso da ciclina A e do PCNA, dois marcadores de proliferação, observamos uma redução dos níveis destas proteínas apenas em *rafts* derivados de queratinócitos normais ou transfectados com o genoma completo do HPV 16 (mas que apresenta uma alteração no gene E1) após o tratamento com TNF- α . A redução nos níveis de PCNA também foi observada em extratos proteicos de *rafts* de queratinócitos transduzidos com LCRE6 ou LCRE6E7 de HPV 16. Isto não foi observado em extratos de *rafts* que expressam os mesmos genes precoces, porém do HPV 18. Conforme descrito anteriormente, a LCR do HPV 18 é 10 a 50 vezes mais ativa que a LCR do HPV 16 (Villa e Schlegel, 1991; Romanczuk *et al.*, 1991). A resistência diferencial dos queratinócitos que expressam genes de HPV

16 e HPV 18 ao TNF- α poderia dever-se à diferença existente entre as atividades das LCR destes vírus que poderia resultar na expressão diferencial das oncoproteínas virais.

Figura 23 – Efeitos do TNF- α na proliferação celular e na expressão de p21 em *rafts* de QPH e queratinócitos que expressam genes de HPV 16. Os núcleos das células que incorporaram BrdU aparecem em verde. As setas indicam células que expressam p21 (vermelho), detectadas por IF. As pontas de setas indicam a membrana basal.

Figura 24 – Efeitos do TNF- α na proliferação celular e na expressão de p21 em *rafts* de QPH e queratinócitos que expressam genes de HPV 18. Os núcleos das células que incorporaram BrdU aparecem em verde. As setas indicam células que expressam p21 (vermelho), detectadas por IF. As pontas de setas indicam a membrana basal.

Figura 25 – Efeitos do TNF- α na proliferação celular e na expressão de p27 em *rafts* de QPH e queratinócitos transfectados com o genoma completo de HPV 16. Os núcleos das células que incorporaram BrdU aparecem em verde. As setas indicam células que expressam p27 (vermelho), detectadas por IF. As pontas de setas indicam a membrana basal.

Figura 26 – Efeitos do TNF- α na proliferação celular e na expressão de p27 em *rafts* de QPH e queratinócitos transduzidos com oncogenes de HPV 16. Os núcleos das células que incorporaram BrdU aparecem em verde. As setas indicam células que expressam p27 (vermelho), detectadas por IF. As pontas de setas indicam a membrana basal.

Figura 27 – Efeitos do TNF- α na proliferação celular e na expressão de p27 em *rafts* de QPH e queratinócitos que expressam genes de HPV 18. Os núcleos das células que incorporaram BrdU aparecem em verde. As setas indicam células que expressam p27 (vermelho), detectadas por IF. As pontas de setas indicam a membrana basal.

Figura 28- Efeitos do TNF- α sobre os níveis de proteínas reguladoras do ciclo celular em rafts de queratinócitos normais e portadores de genes de HPV 16 ou 18 após tratamento com 2 nM de TNF- α por 72 horas. Os níveis destas proteínas foram determinados por *Western blot* utilizando extratos proteicos totais obtidos a partir das culturas organotípicas.

4. Conclusões

- Queratinócitos humanos normais e imortalizados por HPV 16 tratados com TNF- α acumulam-se na fase G1 do ciclo celular. Isto não foi observado em linhagens imortalizados por HPV 18 ou transformados por HPV 16 ou 18.
- Contrariamente ao observado em linhagens resistentes ao TNF- α , as linhagens sensíveis apresentaram aumento dos níveis de p21, diminuição dos níveis de ciclina A e ativação do fator NF- κ B.
- O TNF- α é capaz de inibir a proliferação de queratinócitos primários normais em culturas organotípicas. Esta inibição não é ocasionada pela alteração dos níveis dos CKI p21 e/ou p27.
- Culturas organotípicas de queratinócitos transduzidos com o genoma completo do HPV 18 são resistentes ao efeito antiproliferativo do TNF- α .
- Culturas organotípicas de queratinócitos transduzidos com vetores retrovirais que apresentam o gene E7 apresentam resistência moderada ao TNF- α sugerindo que esta proteína desempenha um papel na resistência a esta citocina.

5. Referências Bibliográficas

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. The major histocompatibility complex: cellular and molecular immunology 3rd ed. Philadelphia: W B Saunders; 1997.
- Abraham E. NF- κ B activation. **Crit Care Med**, **28**(4): N100-N104, 2000.
- Adams PD, Kaelin WG Jr. The cellular effects of E2F overexpression. **Curr Top Microbiol Immunol**, **208**:79-93, 1996.
- Aguilar-Lemarroy A, Gariglio P, Whitaker NJ, Eichhorst ST, zur Hausen H, Krammer PH, Rosl F. Restoration of p53 expression sensitizes human papillomavirus type 16 immortalized human keratinocytes to CD95-mediated apoptosis. **Oncogene**, **21**:165-175, 2002.
- Akerman GS, Tolleson WH, Brown KL, Zyzak LL, Mourateva E, Engin TS, Basaraba A, Coker AL, Creek KE, Pirisi L. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 cooperate to increase epidermal growth factor receptor (EGFR) mRNA levels, overcoming mechanisms by which excessive EGFR signaling shortens the life span of normal human keratinocytes. **Cancer Res**, **61**:3837-43, 2001.
- Baker SJ, Reddy EP. Modulation of life and death by the TNF receptor family. **Oncogene**, **17**:3261-3270, 1998.
- Baldwin AS Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. **Annu Rev Immunol**, **14**:649-683, 1996.
- Ball KL. p21: structure and functions associated with cyclin-CDK binding. In: Progress in Cell Cycle Research, Meijer L, Guidet S, Philippe M (eds). Plenum Press, New York, USA.
- Barnard P, McMillan NAJ. The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon- α . **Virol**, **259**:305-313, 1999.
- Barbosa MS, Edmonds C, Fisher C, Schiller JT, Lowy DR, Vousden KH. The region of the HPV E7 oncoprotein homologous to adenovirus E1a and Sv40 large T antigen contains separate domains for Rb binding and casein kinase II phosphorylation. **EMBO J**, **9**:153-160, 1990.
- Barbosa M. S., Schlegel R. The E6 and E7 genes of HPV-18 are sufficient for inducing two-stage in vitro transformation of human keratinocytes. **Oncogene**, **4**:1529-1532, 1989.

- Barnard P, Payne E, McMillan NA. The human papillomavirus E7 protein is able to inhibit the antiviral and anti-growth functions of interferon-alpha. **Virol**, **277**:411-419, 2000.
- Basile JR, Zacny V, Munger K. 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.**, **276**(25):22522-22528, 2001.
- Bauknecht T, Shi Y. Overexpression of C/EBP β represses human papillomavirus type 18 upstream regulatory region activity in HeLa cells by interfering with the binding of TATA-binding protein. **J Virol**, **72**:2113-2124, 1998.
- Bem-Bassat H, Rosenbaum-Mitrani S, Hartzstark Z, Shlomai Z, Kleinberger-Doron N, Gazit A, Plowman G, Levitzki R, Tsvieli R, Levitzki A. Inhibitors of epidermal growth factor receptor kinase and cyclin-dependent kinase 2 activation induce growth arrest, differentiation, and apoptosis of human papillomavirus 16-immortalized human keratinocytes. **Cancer Res**, **57**:3741-3750, 1997.
- Berezutskaya E, Bagchi S. The human papillomavirus E7 oncoprotein functionally interacts with the S4 subunit of the 26 S proteasome. **J Biol Chem**, **272**:30135-30140, 1997.
- Beutler BA, Cerami A. The biology of cachectin/TNF: a primary mediator of the host response. **Annu Rev Immunol**, **7**:625-656, 1989.
- Bornstein J, Lahat N, Kinarty A, Revel M, Abramovici H, Shapiro S. Interferon- β and - γ , but not tumor necrosis factor- α , demonstrate immunoregulatory effects on carcinoma cell lines infected with human papillomavirus. **Cancer**, **79**: 924-934, 1997.
- Brehm A, Kouzarides T. Retinoblastoma protein meets chromatin. **Trends Biochem Sci**, **24**(4):142-145, 1999.
- Bunney MH, Benton C, Cubie HA. Viral warts. 2nd ed. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 1992.
- Butz K, Whitaker N, Denk C, Ullmann A, Geisen C, Hoppe-Seyler F. Induction of the p53-target gene GADD45 in HPV-positive cancer cells. **Oncogene**, **18**:2381-2386, 1999.
- Butz K, Shahabeddin L, Geisen C, Spitkovsky D, Ullmann A, Hoppe-Seyler F. Functional p53 protein in human papillomavirus-positive cancer cells. **Oncogene**, **10**:927-936, 1995.

- Cai Z, Capoulade C, Moyret-Lalle C, Aamoor-Gueret M, Feunteun J, Larsen AK, Bressac-de Paillerets, Chouaib S. Resistance of MCF7 human breast carcinoma cells to TNF-induce cell death is associated with lost of p53 function. **Oncogene**, **15**:2817-2826, 1997.
- Chaturvedi V, Qin JZ, Denning MF, Choubey D, Diaz MO, Nickoloff BJ. Apoptosis in proliferating, senescent, and immortalized keratinocytes. **J Biol Chem**, **274**(33):23358-23367, 1999.
- Chen JJ, Reid CE, Band V, Androphy EJ. Interaction of papillomavirus E6 oncoproteins with a putative calcium-binding protein. **Science**, **269**:529-31, 1995.
- Cheng S, Schmidt-Grimminger DC, Murant T, Broker TR, Chow LT. Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. **Genes Dev**, **9**(19):2335-49, 1995.
- Chow LT, Broker TR. 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**, **15**:217-227, 1997.
- Crook T, Tidy JA, Vousden KH. Degradation of p53 can be targeted by HPV E6 sequences distinct from those required for p53 binding and trans-activation. **Cell**, **67**:547-556, 1991.
- De Bruijn MLH, Schuurhuis DH, Vierboom MPM, Vermeulen H, de Cock AJ, Ooms ME, Rensing ME, Toebes M, Franken KLMC, Drijfhout JW, Ottenhoff THM, Offringa R, M CJM. Immunization with human papillomavirus type 16 (HPV16) oncoprotein-loaded dendritic cells as well as protein in adjuvant induces MHC class I-restricted protection to HPV16-induced tumor cells. **Cancer Res**, **58**:724-731, 1998.
- Delvenne P, Hubert P, Jacobs N, Giannini SL, Havard L, Renard I, Saboulard D, Boniver J. The organotypic culture of HPV-transformed keratinocytes: an effective in vitro model for the development of new immunotherapeutic approaches for mucosal (pre)neoplastic lesions. **Vaccine**, **19**(17-19):2557-64, 2001.
- Delvenne P, Al-Saleh W, Gilles C, Thiry A, Boniver J. Inhibition of growth of normal and human papillomavirus-transformed keratinocytes in monolayer and organotypic cultures by interferon- γ and tumor necrosis factor- α . **Am J Pathol**, **146**:589-598, 1995.
- Denis M, Chadee K, Matlashewski GJ. Macrophage killing of human papillomavirus type-16 transformed cells. **Virol**, **170**:342-345, 1989.

- Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, Peacocke M, Campisi J. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. **Proc Natl Acad Sci USA**, **92**(20):9363-7, 1995.
- Dragovich T, Rudin CM, Thompson CB. Signal transduction pathways that regulate cell survival and cell death. **Oncogene**, **17**:3207-3213, 1998.
- Duensing S, Lee LY, Duensing A, Basile J, Piboonniyom S, Gonzalez S, Crum CP, Munger K. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. **Proc Natl Acad Sci USA**, **97**:10002-10007, 2000.
- Dürst M, Glitz D, Schneider A, zur Hausen H. Human papillomavirus type 16 (HPV 16) gene expression and DNA replication in cervical neoplasia: analysis by in situ hybridization. **Virology**, **189**(1):132-140, 1992.
- Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. **Science**, **243**:934-937, 1989.
- Elledge SJ. Cell Cycle Checkpoints: preventing an identity crisis. **Science**, **274**:1664-1671, 1996.
- Favre M, Ramoz N, Orth G. Human papillomaviruses: general features. **Clin Dermat**, **15**:181-198, 1997.
- Finzer P, Soto U, Delius H, Patzelt A, Coy JF, Poustka A, zur Hausen H, Rösl F. Differential transcriptional regulation of the monocyte-chemoattractant protein-1 (MCP-1) gene in tumorigenic and non-tumorigenic HPV 18 positive cells: the role of the chromatin structure and AP-1 composition. **Oncogene**, **19**:3235-44, 2000.
- Flores ER, Allen-Hoffmann BL, Lee D, Lambert PF. The human papillomavirus type 16 E7 oncogene is required for the productive stage of the viral life cycle. **J Virol**, **74**(14):6622-6631, 2000.
- Fontaine V, van der Meijden E, de Graaf J, ter Schegget J, Struyk L. A functional NF-kappaB binding site in the human papillomavirus type 16 long control region. **Virology**, **272**(1):40-49, 2000.
- Francis DA, Schmid SL, Howley PM. Repression of the integrated papillomavirus E6/E7 promoter is required for growth suppression of cervical cancer cells. **J Virol**, **74**:2679-2686, 2000.

- Franco EL, Villa LL, Ruiz A, Costa MC. Transmission of cervical human papillomavirus infection by sexual activity: differences between low and high oncogenic risk types. **J Infect Dis**, **172**:756-763, 1995.
- Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B, Galloway DA. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with HPV-16 E7 oncoprotein. **Genes & Devel**, **11**:2090-2100, 1997.
- Gaiotti D, Chung J, Iglesias M, Nees M, Baker PD, Evans CH, Woodworth CD. Tumor necrosis factor- α promotes human papillomavirus (HPV) E6/E7 RNA expression and cyclin-dependent kinase activity in HPV-immortalized keratinocytes by a *ras*-dependent pathway. **Mol Carcinog**, **27**:97-109, 2000.
- Gao Q, Srinivasan S, Boyer SN, Wazer DE, Band V. The E6 oncoproteins of high-risk papillomaviruses bind to a novel putative GAP protein, E6TP1, and target it for degradation. **Mol Cell Biol**, **19**: 733-744, 1999.
- Gartel AL, Serfas MS, Tyner AL. p21--negative regulator of the cell cycle. **Proc Soc Exp Biol Med**, **213**(2):138-49, 1996.
- Georgopoulos NT, Proffitt JL, Blair GE. Transcriptional regulation of the major histocompatibility complex (MHC) class I heavy chain, TAP1 and LMP2 genes by the human papillomavirus (HPV) type 6b, 16 and 18 E7 oncoproteins. **Oncogene**, **19**:4930-4935, 2000.
- Giannoudis A, Southern AS, Herrington CS. Induction of numerical chromosomal abnormalities by human papillomavirus in low-grade cervical squamous intraepithelial lesion is not related to the arg/pro p53 polymorphism. In: 17th International Papillomavirus Conference. Charleston, USA, 1999. Abstracts, p. 235.
- Goodwin EC, DiMaio D. Repression of human papillomavirus oncogenes in HeLa cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways. **Proc Natl Acad Sci USA**, **97**(23):12513-8, 2000.
- Graña X, Reddy EP. Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinases inhibitors. **Oncogene**, **11**:211-219, 1995.
- Halbert CL, Demers GW, Galloway DA. The E6 and E7 genes of human papillomavirus type 6 have weak immortalizing activity in human epithelial cells. **J Virol** **66**:2125-2134, 1992.
- Halbert CL, Demers GW, Galloway DA. The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. **J Virol**, **65**:473-8, 1991.

- Hayes VM, Hofstra RMW, Buys CHCM, Hollema HH, van der Zee AGJ. Homozygous arginine-72 in wild type p53 and risk of cervical cancer. **The Lancet**, **352**: 1756, 1998.
- Helland A, Langerod A, Johnsen H, Olsen AO, Skovlund E, Borresen-Dale A. p53 polymorphism and risk of cervical cancer. **Nature**, **396**: 530-531, 1998.
- Helt AM, Galloway DA. 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**, **75**:6737-6747, 2001.
- Hickman ES, Bates S, Vousden KH. Perturbation of the p53 response by human papillomavirus type 16 E7. **J Virol**, **71**(5):3710-3718, 1997.
- Hickman ES, Picksley SM, Vousden KH. Cells expressing HPV16 E7 continue cell cycle progression following DNA damage induced p53 activation. **Oncogene**, **9**(8):2177-2181, 1994.
- Hildesheim A, Schiffman M, Brinton LA, Fraumeni Jr J, Herrero R, Bratti C, Schwartz P, Mortel R, Barnes W, Greenberg M, McGowan L, Scott DR, Martin M, Herrera JE, Carrington M. p53 polymorphism and risk of cervical cancer. **Nature**, **396**: 532, 1998.
- Ho G. Y. F, Burk R.D., Klein S., Kadish A.S., Chang C.J., Palan P., Bassu J., Ttachezy R., Lewis R., Romney S. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. **J Natl Cancer Inst**, **87**:1365-1371, 1995.
- Howley PM. Papillomavirinae: The viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM. Fundamental Virology. Third edition. Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds), Lippincott-Raven Publishers, 1996.
- Hu Y, Baud V, Oga T, Kim KI, Yoshida K, Karin M. IKK α controls formation of the epidermis independently of NF- κ B. **Nature**, **410**(6829):710-714, 2001.
- Jian Y, Van Tine BA, Chien WM, Shaw GM, Broker TR, Chow LT. Concordant induction of cyclin E and p21^{cip1} in differentiated keratinocytes by the human papillomavirus E7 protein inhibits cellular and viral DNA synthesis. **Cell Growth Differ**, **10**(2):101-111, 1999.
- Jian Y, Schmidt-Grimminger DC, Chien WM, Wu X, Broker TR, Chow LT. Post-transcriptional induction of p21^{cip1} protein by human papillomavirus E7 inhibits unscheduled DNA synthesis reactivated in differentiated keratinocytes. **Oncogene**, **17**(16):2027-38, 1998.
- Jones DL, Münger K. Analysis of the p53-mediated G1 growth arrest pathway in

- cells expressing the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. **J Virol**, **71**:2905-2912, 1997.
- Jones DL, Alani RM, Münger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. **Genes & Devel**, **11**:2101-2111, 1997.
- Josefsson AG, Magnusson PKE, Ylitalo N, Tubbin PQ, Pontén J, Adami HO, Gyllensten UB. p53 polymorphism and risk of cervical cancer. **Nature**, **396**: 531, 1998.
- Kadish AS, Ho GYF, Burk RD, Wang Y, Romney SL, Ledwidge R, Angeletti RH. Lymphoproliferative responses to human papillomavirus (HPV) type 16 proteins E6 and E7: outcome of HPV infection and associated neoplasia. **J Natl Cancer Inst**, **89**:1285-1293, 1997.
- Kaltschmidt B, Kaltschmidt C, Hehner SP, Droge W, Schmitz ML. Repression of NF-kappaB impairs HeLa cell proliferation by functional interference with cell cycle checkpoint regulators. **Oncogene**, **18**(21):3213-3225, 1999.
- Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. **Nature Rev Cancer**, **2**(4):301-310, 2002.
- Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. **Annu Rev Immunol**, **18**:621-663, 2000.
- Kato J. Induction of S phase by G1 regulatory factors. **Front Biosci**, **4**:D787-92, 1999.
- Kessis TD, Slebos RJ, Nelson WG, Kastan MB, Plunkett BS, Han SM, Lorincz AT, Hedrick L, Cho KR. Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to DNA damage. **Proc Natl Acad Sci USA**, **90**:3988-3992, 1993.
- Kim KY, Blatt L, Taylor MW. The effects of interferon on the expression of human papillomavirus oncogenes. **J Gen Virol**, (Pt 3):695-700, 2000.
- Kim YT, Choi EK, Cho NH, Ko JH, Yang WI, Kim JW, Lee SH. Expression of cyclin E and p27(KIP1) in cervical carcinoma. **Cancer Lett**, **153**:41-50, 2000.
- Kim JW, Namkoong SE, Ryu SW, Kim HS, Shin JW, Lee JM, Kim DH, Kim IK. Absence of p15INK4B and p16INK4A gene alterations in primary cervical carcinoma tissues and cell lines with human papillomavirus infection. **Gynec Oncol**, **70**:75-79, 1998.
- Kim YT, Cho NH, Park SW, Kim JW. Underexpression of cyclin-dependent kinase

(CDK) inhibitors in cervical carcinoma. **Gynec Oncol**, **71**:38-45, 1998.

Klaes R, Ridder R, Schaefer U, Doeberitz M. No evidence for p53 allele-specific predisposition in human papillomavirus-associated cervical cancer. In: 17th International Papillomavirus Conference. Charleston, USA, 1999. Abstracts, p. 233.

Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, Dallenbach-Hellweg G, Schmidt D, von Knebel Doeberitz M. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer*, **92**(2):276-84, 2001.

Kleefstrom J, Arighi E, Littlewood T, Jäättelä M, Saksela E, Evan GI, Alitalo K. Induction of TNF-sensitive cellular phenotype by c-Myc involves p53 and impaired NF- κ B activation. **EMBO J**, **16**:7382-7392, 1997.

Komine M, Rao LS, Kaneko T, Tomic-Canic M, Tamaki K, Freedberg IM, Blumenberg M. 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**, **275**(41):32077-32088, 2000.

Koromilas AE, Li S, Matlashewski G. Control of interferon signaling in human papillomavirus infection. **Cytokine Growth Factor Rev**, **12**:157-170, 2001.

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

Le Buanec H, D'Anna R, Lachgar A, Zagury JF, Bernard J, Ittelé D, d'Alessio, Hallez S, Giannouli C, Burny A, Bizzini B, Gallo RC, Zagury D. HPV-16 E7 but not E6 oncogenic protein triggers both cellular immunosuppression and angiogenic processes. **Biomed & Pharmacother**, **53**:424-431, 1999.

Lechner MS, Mack DH, Finicle AB, Crook T., Vousden KH, Laimins LA. Human papillomavirus E6 proteins bind p53 in vivo and abrogate p53-mediated repression of transcription. **EMBO J**, **11**:3045-3052, 1992.

Levine AJ. P53, the cellular gatekeeper for growth and division. **Cell**, **88**:323-331, 1997.

Lin BY, Ma T, Liu JS, Kuo SR, Jin G, Broker TR, Harper JW, Chow LT. HeLa cells are phenotypically limiting in cyclin E/CDK2 for efficient human papillomavirus DNA replication. **J Biol Chem**, **275**:6167-6174, 2000.

Liu X, Han S, Baluda MA, Park N. HPV-16 oncogenes E6 and E7 are mutagenic in normal human oral keratinocytes. **Oncogene**, **14**:2347-2353, 1997.

- Liu Y, Chen JJ, Gao Q, Dalal S, Hong Y, Mansur CP, Band V, Androphy EJ. Multiple functions of human papillomavirus type 16 E6 contribute to the immortalization of mammary epithelial cells. **J Virol**, **73**:7297-7307, 1999.
- Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating the mammalian biology. **Cell**, **104**:487-501, 2001.
- Madeleine MM, Shera K, Schwartz SM, Daling JR, Galloway DA, McDougall JK. Is the arginine form of the polymorphism at codon 72 in p53 associated with invasive cervical cancer?. In: 17th International Papillomavirus Conference. Charleston, USA, 1999. Abstracts, p. 231.
- Malejczyk M, Józwiak J, Osiecka A, Roszkowski PI, Mazurkiewicz-Smektunowicz W, Rogozinski TT, Walczak L, Jablonska S, Majewski S, Malejczyk J. Serum levels of soluble tumor-necrosis-factor receptors in patients with benign and malignant HPV-associated anogenital lesions. **Int J Cancer**, **73**:16-19, 1997.
- Malejczyk J, Malejczyk M, Majewski S, Breitburd F, Luger TA, Jablonska S, Orth G. Increased tumorigenicity of human keratinocytes harboring human papillomavirus type 16 is associated with resistance to endogenous tumor necrosis factor- α -mediated growth limitation. **Int J Cancer**, **56**:593-598, 1994.
- Malejczyk J, Malejczyk M, Kock A, Urbanski A, Majewski S, Hunzelmann N, Jablonska S, Orth G, Luger TA. Autocrine growth limitation of human papillomavirus type 16-harboring keratinocytes by constitutively released tumor necrosis factor- α . **J Immunol**, **149**:2702-2708, 1992.
- Martin AG, San-Antonio B, Fresno M. 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**, **276**(19):15840-15849, 2001.
- Martin LG, Demers GW, Galloway DA. Disruption of the G1/S transition in human papillomavirus type 16 E7-expressing human cells is associated with altered regulation of cyclin E. **J Virol**, **72**:975-985, 1998.
- Mayo MW, Baldwin AS. The transcription factor NF-kappaB: control of oncogenesis and cancer therapy resistance. **Biochim Biophys Acta**, **1470**(2):M55-M62, 2000.
- McMurray HR, Nguyen D, Westbrook TF, McAnce. Biology of human papillomaviruses. **Int J Exp Path**, **82**:15-33, 2001
- Miller AD, Rosman GJ. Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. **Biotechniques**, **7**(9):980-2, 984-6, 989-90, 1989.
- Minaguchi T, Kanamori Y, Matsushima M, Yoshikawa H, Taketani Y, Nakamura Y.

- No evidence of correlation between polymorphism at codon 72 of p53 and risk of cervical cancer in Japanese patients with human papillomavirus 16/18 infection. **Cancer Res**, **58**: 4585-4586, 1998.
- Morozov A, Shiyanov P, Barr E, Leiden JM, Raychaudhuri P. Accumulation of human papillomavirus type 16 E7 protein bypasses G1arrest induced by serum deprivation and by the cell cycle inhibitor p21. **J Virol**, **71**:3451-3457, 1997.
- Münger K, Pietersen JA, Pittelkow MR, Holt JT, Moses HL. Transforming growth factor beta 1 regulation of c-myc expression, pRB phosphorylation, and cell cycle progression in keratinocytes. **Cell Growth Differ**, **3**:291-8, 1992.
- Münger K, Phelps WC, Bubba V, Howley PM, Schlegel RJ. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. **J Virol**, **63**:4417-4421, 1989.
- Munirajan AK, Kannan K, Bhuvaramurthy V, Ishida I, Fujinaga K, Tsuchida N, Shanmugam G. The status of human papillomavirus and tumor suppressor genes p53 and p16 in carcinomas of the uterine cervix from India. **Gynecol Oncol**, **69**:205-209, 1998.
- Muñoz N, Willemotte R, Herrero R, Almonte M, Guimaraes DP, Haiaut P, Lenoir G, Walboomers JMM. No evidence for an association of homozygous arg-72 p53 with cervical cancer. In: 17th International Papillomavirus Conference. Charleston, USA, 1999. Abstracts, p. 232.
- Murakami M, Gurski KJ, Marincola FM, Ackland J, Steller MA. Induction of specific CD8+ T-lymphocyte responses using a human papillomavirus-16 E6/E7 fusion protein and autologous dendritic cells. **Cancer Res**, **59**:1184-1187, 1999.
- Nagata S. Apoptosis by death factor. **Cell**, **88**:355-365, 1997.
- Nakao Y, Yang X, Yokoyama M, Ferenczy A, Tang S-C, Pater MM, Pater A. Induction of p16 during immortalization by HPV 16 and 18 and not during malignant transformation. **Br J Cancer**, **75**:1410-1416, 1997.
- Nees M, Geoghegan JM, Hyman T, Frank S, Miller L, Woodworth CD. Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation-associated and NF-kappaB-responsive genes in cervical keratinocytes. **J Virol**, **75**(9):4283-4296, 2001.
- Noya F, Chien WM, Broker TR, Chow LT. p21cip1 Degradation in differentiated keratinocytes is abrogated by costabilization with cyclin E induced by human papillomavirus E7. **J Virol**, **75**(13):6121-6134, 2001.

- Okahashi N, Murase Y, Koseki T, Sato T, Yamato K, Nishihara T. Osteoclast differentiation is associated with transient upregulation of cyclin-dependent kinase inhibitors p21(WAF1/CIP1) and p27(KIP1). **J Cell Biochem**, **80**(3):339-345, 2001.
- Palefsky, J M, Minkoff H, Kalish LA, Levine A, Sacks HS, Garcia P, Young M, Melnick S, Miotti P, Burk R. Cervicovaginal human papillomavirus infection in human immunodeficiency virus-1 (HIV)-positive and high-risk HIV-negative women. **J Natl Cancer Inst**, **91**:226-236, 1999.
- Pao CC, Lin C, Yao D, Tseng C. Differential expression of cytokine genes in cervical cancer tissues. **Biochem Biophys Res Commun**, **214**:1146-1151, 1995.
- Park J-S, Kim E-J, Kwon Ho-J, Hwang E-S, Namkoong S-E, Um S-J. Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein. **J Biol Chem**, **275**:6764-6769, 2000.
- Park JS, Dong SM, Kim SH, Lee JY, Um SJ, Park IS, Kim SJ, Namkoong SE. Detection of p16 gene alteration in cervical cancer using tissue microdissection and LOH study. **Cancer Lett**, **136**:101-108, 1999.
- Pattison S, Skalnik DG, Roman A. CCAAT displacement protein, a regulator of differentiation-specific gene expression, binds a negative regulatory element within the 5' end of the human papillomavirus type 6 long control region. **J Virol**, **71**:2013-2022, 1997.
- Peters G. Stifled by inhibitions. **Nature**, **371**:204-205, 1994.
- Pim D, Massimi P, Banks L. Alternative spliced HPV-18 E6* protein inhibits E6 mediated degradation of p53 and suppresses transformed cell growth. **Oncogene**, **15**:257-264, 1997.
- RappL, Chen JJ. The papillomavirus E6 proteins. **Biochim Biophys Acta**, **1378**:F1-19, 1998.
- Rapp L, Liu Y, Hong Y, Androphy EJ, Chen JJ. The bovine papillomavirus type 16 oncoprotein sensitizes cells to tumor necrosis factor-alpha induced apoptosis. **Oncogene**, **18**:607-615, 1999.
- Remmink A.J., Walboomers J.M.M., Helmerhorst T.J.M., Voorhorst F.J., Rozendaal L., Risse E.K.J., Meijer C.J.L.M., Kkenemans P. The presence of persistent high-risk HPV genotypes in dysplastic cervical lesions is associated with progressive disease: natural history up to 36 months. **Int J Cancer**, **61**:306-311, 1995.
- Riou GF, Fogel S, Barrois M, Ahomadegbe JC, Ramoz N, Orth G. Lack of

evidence for the role of p53 polymorphism at codon 72 in the development of invasive cervical carcinomas. In: 17th International Papillomavirus Conference. Charleston, USA, 1999. Abstracts, p. 234.

Romanczuk H, Villa LL, Schlegel R, Howley PM. 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**, **65**:2739-2744, 1991.

Ronco LV, Karpova AY, Vidal M, Howley PM. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. **Genes Dev**, **12**(13):2061-2072, 1998.

Rong W, Coleman N, Stanley M. Different susceptibility of cervical keratinocytes containing human papillomavirus to cell-mediated cytotoxicity. **Chin Med J**, **109**:854-858, 1996.

Rosenthal NA, Ryan A, Al-Jehani RM, Storey A, Harwood CA, Jacobs I. p53 codon 72 polymorphism and risk of cervical cancer in UK. **The Lancet**, **352**: 871-872, 1998.

Rösl F, Lengert M, Albrecht J, Kleine K, Zawatzky R, Schraven B, zur Hausen H. Differential regulation of the JE gene encoding the monocyte chemoattractant protein (MCP-1) in cervical carcinoma cells and derived hybrids. **J Virol**, **68**:2142-2150, 1994.

Paul NL, Ruddle NH. Lymphotoxin. **Annu Rev Immunol**, **6**:407-38, 1988.

Rubin BY, Anderson SL, Sullivan AS, Williamson BD, Carswell EA, Old LJ. Nonhematopoietic cells selected for resistance to tumor necrosis factor produce tumor necrosis factor. **J Exp Med**, **164**:1350-1355, 1986.

Ruesch MN, Laimins LA. Initiation of DNA synthesis by human papillomavirus E7 oncoproteins is resistant to p21-mediated inhibition of cyclin E-cdk2 activity. **J Virol**, **71**:5570-5578, 1997.

Saito T, Nakajima T, Mogi K. Immunohistochemical analysis of cell cycle-associated proteins p16, pRb, p53, p27 and Ki-67 in oral cancer and precancer with special reference to verrucous carcinomas. **J Oral Pathol Med**, **28**:226-32, 1999.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **74**:5463-5467, 1977.

Sano T, Oyama T, Kashiwabara K, Fukuda T, Nakajima T. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. **Am J Pathol**, **153**:1741-1748, 1998.

- Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. **Cell**, **63**:1129-1136, 1990.
- Seitz CS, Deng H, Hinata K, Lin Q, Khavari PA. Nuclear factor kappaB subunits induce epithelial cell growth arrest. **Cancer Res**, **60**(15):4085-4092, 2000.
- Seitz CS, Lin Q, Deng H, Khavari PA. Alterations in NF-kappaB function in transgenic epithelial tissue demonstrate a growth inhibitory role for NF-kappaB. **Proc Natl Acad Sci U S A**, **95**(5):2307-2312, 1998.
- Sgambato A, Cittadini A, Faraglia B, Weinstein IB. Multiple functions of p27Kip1 and its alterations in tumor cells: a review. **J Cell Physiol**, **183**:18-27, 2000.
- Shah KV, Howley PM. Papillomaviruses. Em: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE (eds.), Fields Virology, 3rd ed., vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.
- Sherr CJ, Weber JD. The ARF/p53 pathway. **Curr Opin Genet Dev**, **10**(1):94-99, 2000.
- Shiohara M, Akashi M, Gombart AF, Yang R, Koeffler HP. Tumor necrosis factor α : posttranscriptional stabilization of WAF1 RNA in p53-deficient human leukemic cells. **J Cell Physiol**, **166**:568-576, 1996.
- Skomedal H, Kristensen GB, Lie AK, Holm R. Aberrant expression of the cell cycle associated proteins TP53, MDM2, p21, p27, cdk4, cyclin D1, RB, and EGFR in cervical carcinomas. **Gynecol Oncol**, **73**(2):223-228, 1999.
- Slebos RJ, Lee MH, Plunkett BS, Kessis TD, Williams BO, Jacks T, Hedrick L, Kastan MB, Cho KR. p53-dependent G1 arrest involves pRB-related proteins and is disrupted by the human papillomavirus 16 E7 oncoprotein. **Proc Natl Acad Sci USA**, **91**(12):5320-5324, 1994.
- Sleijfer S, Phuong Le TK, de Jong S, Timmer-Bosscha H, Withoff S, Mulder NH. Combined cytotoxic effects of tumor necrosis factor- α with various cytotoxic agents in tumor cell lines that are drug resistant due to mutated p53. **J Immunother**, **22**:48-53, 1999.
- Smyth MJ, Sedgwick JD. Delayed kinetics of tumor necrosis factor-mediated bystander lysis by peptide-specific CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes. **Eur J Immunol**, **28**:4162-4169, 1998.
- Soto U, Das BC, Lengert M, Finzer P, zur Hausen H, Rösl F. Conversion of HPV 18 positive non-tumorigenic HeLa-fibroblast hybrids to invasive growth

- involves loss of TNF- α mediated repression of viral transcription and modification of the AP-1 transcription complex. **Oncogene**, **18**:3187-3198, 1999.
- Soto U, Denk C, Finzer P, Hutter KJ, zur Hausen H, Rosl F. Genetic complementation to non-tumorigenicity in cervical-carcinoma cells correlates with alterations in AP-1 composition. **Int J Cancer**, **86**:811-817, 2000.
- Steenbergen RD, Parker JN, Isern S, Snijders PJ, Walboomers JM, Meijer CJ, Broker TR, Chow LT. Viral E6-E7 transcription in the basal layer of organotypic cultures without apparent p21cip1 protein precedes immortalization of human papillomavirus type 16- and 18-transfected human keratinocytes. **J Virol**, **72**(1):749-757, 1998.
- Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, Breuer J, Leigh I.M, Matlashewski G, Banks L. Role of a p53 polymorphism in the development of human- papillomavirus-associated cancer. **Nature**, **393**: 229-234, 1998.
- Struyk L, van der Meijden E, Minnaar R, Fontaine V, Meijer I, ter Schegget J. Transcriptional regulation of human papillomavirus type 16 LCR by different C/EBP β isoforms. **Mol Carcinog** **1**:42-50, 2000.
- Szatmáry Z. Tumor necrosis factor- α : molecular-biological aspects minireview. **Neoplasma**, **46**(5):257-266, 1999.
- Talis AL, Huibregtse JM, Howley PM. The role of E6AP in the regulation of p53 protein levels in human papillomavirus (HPV)-positive and HPV-negative cells. **J Biol Chem**, **273**:6439-6445, 1998.
- Tartaglia LA, Rothe M, Hu YF, Goeddel D. Tumor necrosis factor's cytotoxic activity is signaled by the p55 TNF receptor. **Cell**, **73**:213-216, 1993.
- Thomas JT, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins E6 and E7 independently abrogate the mitotic spindle checkpoint. **J Virol**, **72**:1131-1137, 1998.
- Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L, Matlashewski G. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. **Molec Cell Biol**, **19**:1092-1100, 1999.
- Thompson DA, Zacny V, Belinsky GS, Classon M, Jones DL, Schlegel R, Munger K. The HPV E7 oncoprotein inhibits tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis in normal human fibroblasts. **Oncogene**, **20**(28):3629-3640, 2001.
- Thompson DA, Belinsky G, Chang TH-T, Jones DL, Schlegel R, Münger K. The human papillomavirus-16 E6 oncoprotein decreases the vigilance of mitotic

- checkpoints. **Oncogene**, **15**:3025-3035, 1997.
- Tong X, Howley PM. The bovine papillomavirus E6 oncoprotein interacts with paxillin and disrupts the actin cytoskeleton. **Proc Natl Acad Sci U S A**, **94**:4412-4417, 1997.
- Um SJ, Rhyu JW, Kim EJ, Jeon KC, Hwang ES, Park JS. Abrogation of IRF-1 response by high-risk HPV E7 protein in vivo. **Cancer Lett**, **179**:205-12, 2002.
- Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM. Suppression of TNF- α -induced apoptosis by NF-kappaB. **Science**, **274**(5288):787-789, 1996.
- van Hogerlinden M, Rozell BL, Ahrlund-Richter L, Toftgard R. Squamous cell carcinomas and increased apoptosis in skin with inhibited Rel/nuclear factor-kappaB signaling. **Cancer Res**, **59**(14):3299-3303, 1999.
- Vieira KBL, Goldstein DJ, Villa LL. Tumor necrosis factor α interferes with the cell cycle of normal and papillomavirus-immortalized human keratinocytes. **Cancer Res**, **56**:2452-2457, 1996.
- Villa LL. Human papillomavirus and cervical cancer. *Adv Cancer Res*, **71**:321-341, 1997.
- Villa LL, Vieira KBL, Pei X, Schlegel R. Differential effect of tumor necrosis factor on proliferation of primary human keratinocytes and cell lines containing human papillomavirus types 16 and 18. **Molec Carcinog**, **6**:5-9, 1992.
- Villa LL, Schlegel R. Differences in transformation activity between HPV-18 and HPV-16 map to the viral LCR-E6-E7 region. **Virology**, **181**:374-377, 1991.
- Vogt B, Zerfass-Thome K, Schulze A, Botz JW, Zwerschke W, Jansen-Durr P. Regulation of cyclin E gene expression by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. **J Gen Virol**, **80**:2103-2113, 1999.
- Wajant H, Scheurich P. Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2 and its role in TNF signaling. **Int J Biochem & Cell Biol**, **33**:19-32, 2001.
- Walker DR, Bond JP, Tarone RE, Harris CC, Makalowski W, Boguski MS, Greenblatt. Evolutionary conservation and somatic mutation hotspot maps of p53: correlation with p53 protein structural and functional features. **Oncogene**, **19**:211-218, 1999.
- Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanism. **Annu Rev Immunol**, **17**:331-367, 1999.
- Watanabe S, Kanda T, Yoshiike K. Human papillomavirus type 16 transformation

- of primary human embryonic fibroblasts requires expression of open reading frames E6 and E7. **J Virol**, **63**:965-969, 1989.
- Wolff B, Naumann M. INK4 cell cycle inhibitors direct transcriptional inactivation of NF-kappaB. **Oncogene**, **18**(16):2663-2666, 1999.
- Wong GHW, Tartaglia LA, Lee MS, Goeddel D. Antiviral activity of tumor necrosis factor is signaled through the 55-kDa type 1 TNF receptor. **J Immunol**, **149**:3550-3553, 1992.
- Woodworth CD, McMullin E, Iglesias M, Plowman GD. Interleukin 1 α and tumor necrosis factor α stimulate autocrine amphiregulin expression and proliferation of human papillomavirus-immortalized and carcinoma-derived cervical epithelial cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, **92**: 2840-2844, 1995.
- Woodworth CD, Cheng S, Simpson S, Hamacher L, Chow LT, Broker TR, DiPaolo JA. Recombinant retroviruses encoding human papillomavirus type 18 E6 and E7 genes stimulate proliferation and delay differentiation of human keratinocytes early after infection. **Oncogene**, **7**(4):619-26, 1992.
- Yang A, Kaghad M, Caput D, McKeon F. On the shoulders of giants: p63, p73 and the rise of p53. **Trends Genet**, **18**(2):90-5, 2002.
- Yoshida K, Murohashi I, Kunitake H. p53-independent induction of p21 (WAF1/CIP1) during differentiation of HL-60 cells by tumor necrosis factor alpha. **Int J Hematol**, **65**:41-48, 1996.
- Zerfass K, Schulze A, Spitkovsky D, Friedman V, Henglein B, Jansen-Durr P. Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. **J Virol**, **69**:6389-6399, 1995.
- Zhao W, Chow LT, Broker TR. Transcription activities of human papillomavirus type 11 E6 promoter-proximal elements in raft and submerged cultures of foreskin keratinocytes. **J Virol**, **71**:8832-8840, 1997.
- Zur Hausen H. Papillomavirus infections – a major cause of human cancers. **Biochim Biophys Acta**, **1288**:F55-78, 1996.

Curriculum Vitae

Nome: Enrique Mario Boccardo Pierulivo

Local e Data de Nascimento: Montevideú, Uruguai, 30 de Novembro de 1971

Formação Acadêmica:

- 1997** Mestrado em Biología Molecular e Celular. Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), Faculdade de Ciências, Universidad de la República, Montevideú, Uruguai. Título da Dissertação: "Localización de sitios de fractura cromosómica inducidos por endonucleasas y radiaciones ionizantes".
- 1994** Licenciatura em Ciências Biológicas. Área Genética e Biología Celular. Faculdade de Ciências, Universidad de la República, Montevideú, Uruguai.

Publicações:

- Martínez-López W., Boccardo E., Folle G.A., Porro V., Obe G. Intrachromosomal localization of aberration breakpoints induced by neutrons and γ -rays in Chinese hamster ovary cells. *Radiation Research*, 150(5):585-592, 1998.
- Folle G.A., Martínez López W., Boccardo E.M., Obe G. Localization of chromosome breakpoints: implication of the chromatin structure and nuclear architecture. *Mutation Research*, 404(1-2):17-26, 1998.
- Folle G.A., Boccardo E., Obe G. Localization of chromosome breakpoints induced by DNase I in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Chromosoma*, 106:391-399, 1997.
- Drets M. E., Folle G.A., Mendizábal M., Boccardo E.M., Bonomi R. Further Analyses of Subtelomeric and Paracentric Holes Induced in Human and Chinese Hamster Ovary cell Chromosomes. *Biologisches Zentralblatt Vol.* 114, 329 - 338, 1995.