UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas
(Bioquímica)

LUCAS BOENO OLIVEIRA

Vias de transdução de sinal e polimorfismo de
***Toll-like Receptors* na carcinogênese por HPV**

Versão Corrigida da Tese
Conforme Resolução CoPGr 5890

A versão original encontra-se disponível na
Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do depósito na SPG
09/09/2016

LUCAS BOENO OLIVEIRA

**Vias de transdução de sinal e polimorfismo de
Toll-like Receptors na carcinogênese por HPV**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luisa Lina Villa

São Paulo
2016

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Oliveira, Lucas Boeno

O48v Vias de transdução de sinal e polimorfismo de *Toll-like Receptors*
na carcinogênese por HPV / Lucas Boeno Oliveira. -- São Paulo,
2016.
120p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Bioquímica
Orientador: Villa, Luisa Lina

1. Proteínas : Interação molecular : Bioquímica 2. Virologia
molecular I. T. II. Villa, Luisa Lina, orientador.

574.19245 CDD

A Deus e aos que caminham ao meu lado

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, meu guia, socorro presente nas horas de angústia e companheiro nos momentos de glória.

À minha orientadora, Dra. Luisa Lina Villa, pela paciência na orientação, pelo grande aprendizado, exemplo de profissionalismo e incentivo que tornaram possível a conclusão deste trabalho.

Ao Dr. Enrique Boccardo, Dra. Ana Paula Lepique e Dr. Paul Lambert pela colaboração fundamental para o desenvolvimento desta tese e pelos ensinamentos.

A todos do Centro Translacional em Oncologia – CTO e Centro de Medicina Nuclear - CMN, que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, seja com as discussões enriquecedoras ou com conselhos e incentivos valiosos, em especial aos amigos do grupo de Biologia Molecular e demais grupos associados.

Aos meus amigos "da BQI 2006", Fernanda, Thales e Zaira, presentes em todas as fases da minha vida acadêmica. Aos amigos Filipe e Camila pela agradável companhia e grande auxílio em momento de necessidade.

À minha família, por sua capacidade de acreditar e investir em mim. Especialmente, aos meus pais Iolanda e Getúlio, que fizeram tudo ser possível, e aos meus primos Thairone e Mateus pelos incentivos e torcida. À minha segunda família Rosa, Jaür, Pamela, Ian, Iuri e Cristiano pela torcida, incentivo e orações. À minha tia Juca e toda sua família pelo cuidado e carinho dados a mim.

À Paola, minha esposa, que contribuiu ativamente neste trabalho, me auxiliando de inúmeras maneiras. Além de transmitir, de uma forma especial, força e coragem. Seu carinho, paciência e capacidade de me trazer paz na correria entre os experimentos fizeram essa caminhada menos árdua.

Às agências financiadora Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico, e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelos auxílios financeiros e concessão de minha bolsa de doutorado. Além do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, Instituto de Química da USP e University of Wisconsin pela estrutura fornecida e auxílios financeiros.

*Se o machado está cego e sua lâmina não foi afiada,
é preciso golpear com mais força;
agir com sabedoria assegura o sucesso.*

(Eclesiastes - NVI)

RESUMO

OLIVEIRA, L. B. **Vias de transdução de sinal e polimorfismo de *Toll-like Receptors* na carcinogênese por HPV**. 2016. 108p. Tese - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Seres humanos dependem incessantemente de um sistema de reconhecimento efetivo contra infecções para sobreviver. Dentre as diversas proteínas que compõem a resposta imune inata estão os receptores do tipo *Toll* (TLR – *Toll-like Receptors*), que possuem a função de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos e dar início a uma resposta imune adequada. O carcinoma do colo uterino é uma das principais causas de morte de mulheres por câncer mundialmente, sendo o terceiro tipo de câncer mais comum entre mulheres. Este tipo de neoplasia é vinculada etiológicamente à infecção pelo Papilomavírus humano (HPV). Dentre as principais proteínas virais, E6 e E7 são responsáveis pela manipulação dos processos celulares para promover ciclo viral, sendo essenciais no processo de transformação celular. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi investigar a importância da via de sinalização de TLRs sobre a infecção por HPV. O polimorfismo rs5743836, na região promotora de *TLR9*, capaz de alterar a expressão deste receptor, foi estudado quanto à influência sobre a história natural da infecção por HPV em uma coorte de mulheres brasileiras; nenhuma associação relevante foi encontrada, indicando que este polimorfismo não interfere significativamente na resposta à infecção e risco de desenvolvimento de lesões no colo do útero causadas por HPV. Proteínas componentes da via de TLRs demonstraram serem alvos de interação com E6 de HPV16; dentre elas, o notável adaptador MyD88 e IKK ϵ , enzima ativadora de importantes transdutores do sistema imune. Estas interações foram aqui estudadas. A interação de E6 com MyD88 resultou em estabilização da proteína viral, o que parece não depender do sítio LxxLL presente em MyD88, como ocorre com outros parceiros moleculares de E6. O sítio de interação de E6 com IKK ϵ coincide com a região onde se localiza o sítio catalítico desta enzima, sugerindo a ação de E6 na ativação de proteínas alvo de IKK ϵ . Esta interação foi observada em queratinócitos, células alvo das infecções por HPV. A produção de citocinas foi afetada por E6 de HPV16, resultando num aumento da quantidade de IL-8 e IL-6; a indução desta citocina poderia ser explicada pela ativação de IKK ϵ . Estes resultados apontam para a capacidade do HPV16 de interferir com o sistema imune, contribuindo para o processo de carcinogênese.

Palavras chave: Papilomavírus humano (HPV); Receptores do tipo *Toll* (TLR); interação de proteínas.

ABSTRACT

OLIVEIRA, L. B. **Toll-like Receptors signaling pathway and polymorphism on the HPV carcinogenesis**. 2016. 108p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo

Humans constantly rely on an effective recognition system against infections in order to survive. Among various proteins that compose the innate immune response, Toll-like Receptors (TLRs) have the role to recognize pathogen associated molecular patterns and initiate a proper immune response. The cervical cancer is one of the main causes of women death worldwide, being the third most common cancer type among women. This type of neoplasia is etiologically associated with the Human papillomavirus (HPV) infection. E6 and E7, two main viral proteins, are responsible for manipulating the cellular processes to promote the virus' life-cycle, being essential to the cellular transformation process. In the context, the objective of this work was to investigate the relevance of the TLR signaling pathway on the HPV infection. The rs5743836 polymorphism, in the *TLR9* promoter region, capable of altering this receptor's expression, was studied regarding its influence on the natural history of HPV infection in a Brazilian women cohort; no relevant association was found, indicating that this polymorphism does not interfere significantly in the infection response and risk of developing cervix lesions caused by HPV. Component proteins of TLR pathway were shown to be interaction targets of HPV16 E6; among them, the notable adaptor MyD88 and IKK ϵ , enzyme that activates important immune system transactors. These interactions were studied in this work. The interaction of E6 with MyD88 resulted in the stabilization of the viral protein, which seems independent of the LxxLL site present on MyD88, as in other E6 molecular partners. The interaction site on IKK ϵ with E6 matches with the region containing the enzyme's catalytic site, suggesting an influence of E6 in the activation of IKK ϵ target proteins. This interaction was observed in keratinocytes, natural targets of HPV infections. The cytokines production was altered by HPV16 E6, resulting in an increase of IL-8 and IL-6 concentration; the induction of the latter could be explained by the activation of IKK ϵ . These results point to the ability of HPV16 of interfering with the immune system, contributing to the carcinogenesis process.

Keywords: Human papillomavirus (HPV); Toll-like Receptor (TLR); protein interactions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Via de sinalização de TLR em mamíferos.....	15
Figura 2: Representação do genoma de um Alphapapillomavirus de alto risco	19
Figura 3: Evolução da doença na infecção por HPV	20
Figura 4: Historia natural da infecção por HPV	21
Figura 5: PCR bidimensional para amplificação de alelos específicos.....	31
Figura 6: Esquema dos fragmentos produzidos da região codificadora de IKK ϵ	41
Figura 7: Exemplo de transfecção transiente de GFP	46
Figura 8: Avaliação da transfecção com GFP	47
Figura 9: Avaliação da transfecção com GFP	48
Figura 10: Expressão heteróloga em células HTE	49
Figura 11: Exemplo de resultado da reação de Bi-PASA.....	53
Figura 12: Sequenciamento de amostras.....	54
Figura 13: Eliminação do HPV (de qualquer tipo) e os genótipos de TLR9 (homozigoto selvagem (TT), heterozigoto (TC) ou homozigoto mutante (CC)) na análise Kaplan-Meier.....	56
Figura 14: Coimunoprecipitação de E6 e MyD88	61
Figura 15: Coimunoprecipitação de IKK ϵ e E6	62
Figura 16: Coimunoprecipitação de E6 e membros da família IKK	63
Figura 17: Western-Blot da proteína selvagem e das proteínas mutantes de MyD88.....	64
Figura 18: Expressão de MyD88 e E6.....	65
Figura 19: Expressão de MyD88 e E6.....	65
Figura 20: Amplificação de fragmentos da região codificante de IKK ϵ	66
Figura 21: Western-Blot das proteínas truncadas de IKK ϵ	67
Figura 22: Coimunoprecipitação de IKK ϵ e E6	68
Figura 23: Coimunoprecipitação em células HeLa	70
Figura 24: Coimunoprecipitação de E6, utilizando anti-MyD88.....	71

Figura 25: Expressão endógena de IKK ϵ e MyD88	72
Figura 26: Quantificação da expressão endógena de MyD88	73
Figura 27: Quantificação da expressão endógena de IKK ϵ	73
Figura 28: Western-Blot de extratos nucleares de células HTE	75
Figura 29: Concentração de IL-8 em células HTE mediante o tratamento com TNF e LPS	77
Figura 30: Concentração de IL-8 em células HTE mediante o tratamento com LPS e ODN	77
Figura 31: Concentração de IL-8 em células HTE mediante expressão heteróloga de componentes da via de TLR	78
Figura 32: Concentração de TNF em células HTE mediante o tratamento com LPS	79
Figura 33: Concentração de IL-6 em células HTE mediante o tratamento com TNF e LPS	80
Figura 34: Concentração de IL-6 em células HTE mediante o tratamento com LPS e ODN	80
Figura 35: Concentração de IL-6 em células HTE mediante expressão heteróloga de componentes da via de TLR	81
Figura 36: Via de sinalização de TLR com destaque para interferências de E6 de HPV16	92
Figura S1: Citocinas expressas por culturas de células HTE	109

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1: Proteínas que interagem com E6 de HPV de alto risco.....	22
Quadro 2: Descrição dos <i>primers</i> empregados nos experimentos de BiPASA	32
Quadro 3: Primers utilizados na clonagem de proteínas truncadas de IKK ϵ	41
Tabela 1: Risco acumulado de infecção por tipos específicos de HPV	57
Tabela 2: Índice de probabilidade (odds ratio-OR), ajustada por idade, de risco acumulado de infecção por HPV de acordo com o fenótipo de TLR9.....	58
Tabela 3: Eliminação tipos específicos de HPV e genótipos de TLR9 usando duas definições de eliminação	59
Tabela S1: Detalhamento da análise estatística das figuras 29, 32 e 33	110
Tabela S2: Detalhamento da análise estatística das figuras 30 e 34	112
Tabela S3: Detalhamento da análise estatística das figuras 31 e 35	117

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1.	Sistema imune inato e Receptores do tipo <i>Toll</i>	13
1.2.	Papilomavírus humano (HPV).....	17
1.3.	Imunologia das infecções por HPV	23
1.4.	Fator de diferenciação mieloide 88 (MyD88).....	26
1.5.	I κ B quinase ϵ (IKK ϵ)	27
2	OBJETIVOS	29
2.1.	Objetivo geral	29
2.2.	Objetivos específicos	29
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1.	Amostras de DNA genômico de esfregaços cervicais.....	30
3.2.	PCR bidimensional para amplificação de alelos específicos (Bi-PASA)	30
3.3.	Sequenciamento de amostras.....	32
3.4.	Análises estatísticas.....	33
3.5.	Plasmídeos	34
3.6.	Cultivo de células humanas	34
3.7.	Clonagens gênicas.....	38
3.7.1.	Mutagênese sítio-dirigida de MyD88	38
3.7.2.	Mapeamento do domínio de interação de IKK ϵ	40
3.8.	Transfecção de células HEK293T e extração de proteínas	42
3.9.	Transfecção de queratinócitos humanos.....	43
3.10.	Imunoensaios.....	50
3.11.	Avaliação da expressão de citocinas	51

4	RESULTADOS	53
4.1.	Polimorfismo rs5743836 e a história natural da infecção por HPV (Oliveira <i>et al.</i> , 2013; Anexo B).....	53
4.2.	Estudo da interação entre E6 de HPV16 e proteínas da Via de Sinalização de Receptores do tipo Toll	60
4.2.1.	Interação entre E6 de HPV16 e proteínas celulares MyD88 e IKK ϵ em células HEK293T	60
4.2.2.	Mapeamento do sítio de interação entre HPV16 e as proteínas MyD88 e IKK ϵ	63
4.2.3.	Estudo da interação protéica em queratinócitos	70
4.3.	Consequências da presença de oncoproteínas virais sobre efetores da resposta antiviral	72
4.3.1.	Análise da expressão de MyD88 e IKK ϵ mediante à presença de oncoproteínas do HPV	72
4.3.2.	Ação das oncoproteínas sobre a ativação de transfatores de resposta à infecção.....	74
4.3.3.	Ação das oncoproteínas de HPV16 sobre a produção de citocinas.....	75
5	DISCUSSÃO	82
6	CONCLUSÕES	94
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
	APÊNDICES.....	108
	LISTA DE ANEXOS	120

1 INTRODUÇÃO

1.1. Sistema imune inato e Receptores do tipo *Toll*

Seres humanos dependem incessantemente de um sistema de reconhecimento efetivo contra infecções para sobreviver. Vivemos cercados por microrganismos em todo o ambiente e para combatê-los nosso organismo dispõe de diversos mecanismos celulares e bioquímicos, que constituem o sistema imunológico. Alguns destes mecanismos se constituem desde a formação do feto e se mostram plenamente funcionais a partir do nascimento dos indivíduos (saudáveis), não dependendo de estímulos externos, nem se modificando ou adaptando mediante aos eventos ocorridos durante a vida do indivíduo. Tal conjunto de mecanismos de reconhecimento se classifica como o sistema imune inato, também chamado imunidade natural ou nativa (Travis, 2009; Hoffmann & Akira, 2013).

Diferente da resposta imune adaptativa, os componentes da resposta inata não são modulados ou adquiridos ao decorrer da vida do indivíduo, mas foram selecionados no decorrer do desenvolvimento da espécie humana e contém processos defensivos que o organismo deve executar de maneira constante e imediata a estímulos predeterminados. O sistema imune inato constitui a primeira linha de resposta contra invasões microbianas, atuando para impedir a entrada de microrganismos no interior do hospedeiro, detectando precocemente e alertando quanto à presença daqueles, regulando a inflamação, ativando a resposta adaptativa, combatendo ativamente a infecção e mantendo a homeostase (Travis, 2009; Hoffmann & Akira, 2013).

Apesar de possuir menor plasticidade, quando comparada à resposta adaptativa, a imunidade inata exerce um papel essencial no combate inicial da infecção até a elaboração de uma resposta adaptativa eficiente. Estudos revelam

que no caso de infecções por Papilomavírus humanos (HPV), por exemplo, a resposta adaptativa pode demorar meses para se estabelecer (Stanley, 2006); em casos como este, os componentes do sistema imune inato podem ter papel decisivo no desfecho da infecção, pois constituem uma resposta rápida e plenamente capaz de mediar o combate à presença de invasores (Amador-Molina *et al.*, 2013).

Grande parte da resposta imune inata é mediada por proteínas que interagem e reconhecem componentes específicos de microrganismos. Tais componentes são denominados padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs – *pathogen-associated molecular patterns*) e estão presentes de maneira conservada em espécies variadas de microrganismos. Diversas proteínas possuem a função de reconhecer PAMPs e dar início a uma resposta imune adequada, dentre eles podemos destacar os Receptores do tipo *Toll* (TLR – *Toll-like Receptors*) (Kawai & Akira, 2010).

Os TLRs são proteínas do tipo transmembrana cuja principal função é detectar a presença de PAMPs no organismo. Até o momento, tem-se conhecimento de onze proteínas humanas nesta família de receptores (TLR1 a 11). Estes receptores se encontram em forma de dímeros (homodímeros, em sua maioria) e, ao detectar um PAMP, iniciam uma cascata de eventos moleculares que resulta na modificação da expressão de genes responsivos. Moléculas como lipopolissacarídeos bacterianos, flagelina, RNA dupla-fita e DNA não metilado são exemplos de PAMPs reconhecidos pelos TLRs. A via de sinalização iniciada por TLR envolve diversas proteínas intracelulares, culminando na ativação de transfatores como NF- κ B, AP-1, IRF3 e IRF7 (O'Neill *et al.*, 2013; Joosten *et al.*, 2016), conforme apresentado na figura 1.

Figura 1: Via de sinalização de TLR em mamíferos. Na superfície da célula TLR5, TLR11 e os heterodímeros de TLR2-TLR1 ou TLR2-TLR6 detectam seus ligantes respectivos, ao passo que TLR3, TLR7 TLR8, TLR9 e TLR13 localizam-se nos endossomos, onde eles são capazes de detectar ácidos nucleicos provenientes de invasores. TLR4 localiza-se tanto na membrana plasmática quanto nos endossomos. TLR sinalização é iniciada pela dimerização dos receptores, induzida pelo ligante. Em seguida, o domínio TIR (*Toll-IL-1-resistance*) do receptor acopla-se às proteínas adaptadoras contendo o domínio TIR, MyD88 (Fator de diferenciação mieloide 88, também chamada *Myeloid differentiation primary response protein*) e MAL (*MYD88-adaptor-like protein*, também chamada TIRAP - *Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adapter protein*) ou TRIF (*TIR domain-containing adaptor protein inducing IFN β* , também chamada TCAM1 - *TIR domain-containing adapter molecule 1*) e TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*, também chamada TICAM2 - *TIR domain-containing adapter molecule 2*). O acoplamento das moléculas adaptadoras estimula vias de sinalização a jusante que envolvem interações entre as quinases associadas a IL-1R (IRAKs) e os fatores associados ao receptor de TNF (TRAFs). Posteriormente, são ativadas a quinase aminoterminal JUN (JNK), p38 e I κ B quinases (IKKs), que regulam importantes fatores de transcrição. TBK1: quinase ligante a TANK 1; TAK: quinase ativada por TGF β ; TAB: proteína ligante de TAK1; MKK: quinase de MAP quinase; CREB: Proteína responsiva ao AMP cíclico ligante a elemento; AP1: proteína ativadora 1; NF- κ B: fator nuclear κ B; IRF: fator regulador de interferon; IFN: interferon; LPS: lipopolissacarídeo; dsRNA: ácido ribonucleico dupla-fita; ssRNA: ácido ribonucleico simples fita; CpG-DNA: ácido desoxiribonucleico rico em guaninas e citosinas; DNA: ácido desoxiribonucleico. Adaptada de O'Neill *et al.* (2013).

Como mencionado, os componentes da resposta imune inata não são modulados ao longo da vida dos indivíduos, mas a resposta pode variar de indivíduo para indivíduo, devido às diferenças genéticas entre eles. Vários polimorfismos gênicos (*single nuclear polymorphisms* - SNPs) em TLRs e moléculas envolvidas em suas vias de resposta foram identificados e alguns estão ligados a progressão de doenças (Carpenter & O'Neill, 2007). É importante lembrar que qualquer mutação com um efeito deletério na imunidade inata enfrentaria uma forte pressão de seleção negativa no processo evolutivo (Sabroe *et al.*, 2008). Por outro lado, polimorfismos que levam à alteração da ligação entre os agonistas dos receptores tipo *Toll*, com efeitos sobre sua atividade, e polimorfismos em regiões promotoras que podem alterar os níveis de expressão destes receptores nas células têm sido associados à susceptibilidade a infecções e câncer (Misch & Hawn, 2008).

Um polimorfismo na região promotora de *TLR9*, rs187084, foi associado à maior suscetibilidade ao desenvolvimento de câncer do colo uterino em uma população de mulheres chinesas (Chen *et al.*, 2012). Outro SNP na região promotora de *TLR9*, o rs5743836, mostrou-se relacionado a alterações pré-malignas no epitélio gástrico causadas por *Helicobacter pylori* (Ng *et al.*, 2010), susceptibilidade a eczema atópico (Novak *et al.*, 2007), doença renal crônica (Lu *et al.*, 2011), susceptibilidade a asma em americanos caucasianos, mas não em americanos afrodescendentes (Lazarus *et al.*, 2003). Análises *in-silico* desta sequência promotora mostram que a variação T/C na posição -1237 deste SNP cria um potencial sítio de ligação a NF- κ B, que teoricamente aumentaria a atividade transcricional do gene em resposta a este transfator (Ng *et al.*, 2010); outros estudos mostram que a atividade basal do promotor selvagem (alelo T/T) é maior que a atividade dos outros alelos (Novak *et al.*, 2007).

Baseado nos estudos de polimorfismos nos TLR e susceptibilidade a infecções fúngicas (Carvalho *et al.*, 2008), empreendemos o estudo do polimorfismo rs5743836 de TLR9 na alteração do reconhecimento/resposta imune à infecção por HPV. Isto foi feito no contexto do estudo de coorte Ludwig-McGill envolvendo séries grandes de mulheres sem e com doença atribuível ao HPV (Franco *et al.*, 1999). Dado que o genoma de HPV apresenta diversos sítios putativos para ligação a TLR9 (Takeuchi & Akira, 2009), é possível que diferenças na expressão deste receptor influenciem na história natural da infecção por HPV entre as mulheres da coorte. A estrutura longitudinal do estudo nos permite inferir se diferentes genótipos ocasionaram desfechos clínicos distintos para as mulheres acompanhadas.

1.2. Papilomavírus humano (HPV)

O carcinoma do colo uterino é uma das principais causas de morte de mulheres por câncer mundialmente, sendo o quarto tipo de câncer mais comum entre mulheres. Mundialmente, estima-se que, todo ano, 530.000 novos casos são diagnosticados e 270.000 mulheres vêm a óbito devida a esta doença, 86,6% destas moravam em regiões menos desenvolvidas. No Brasil, são cerca de 18.500 novos casos e 8.400 óbitos por ano, sendo o carcinoma cervical o segundo tipo de câncer mais comum entre as mulheres no país (Bruni *et al.*, 2016). Este tipo de neoplasia é vinculada etiologicamente à infecção por alguns tipos de HPV, vírus de DNA dupla-fita, epiteliotrópicos e espécie-específicos. Além do carcinoma de colo uterino, o HPV pode causar neoplasias na região anal, vulvar, vaginal, peniana e da orofaringe, além de verrugas em diversos sítios anatômicos.

Tais vírus constituem o gênero *Alphapapillomavirus*, da família *Papillomaviridae*, e são classificados em diferentes espécies ou em tipos, sendo esta última a maneira mais tradicional e usual de fazê-lo. Um tipo distinto de HPV é estabelecido quando a

sequência de DNA de um dos quadros abertos de leitura (ORFs) de seu genoma (que codifica para a proteína L1) difere dos demais vírus em pelo menos 10% (De Villiers, 2013). A classificação dos HPV por tipo é muito bem aceita pela comunidade científica devido à eficácia em agrupar vírus com características semelhantes, especialmente em relação à história natural da infecção e carcinogênese. O HPV16 é o tipo mais comum de HPV dentre os casos de carcinoma causados por este gênero de microrganismos, estando presente em aproximadamente 55% de todos os casos de carcinoma causados por HPV; em segundo lugar, temos o HPV18, presente em aproximadamente 15% dos casos (Bruni *et al.*, 2016). Devido ao seu comprovado potencial de transformação celular, HPV16 e HPV18 são classificados como tipos de alto risco, ou oncogênicos, juntamente com HPV31, HPV33, HPV35, HPV39, HPV45, HPV51, HPV52, HPV56, HPV58, HPV59, HPV66, HPV68 e HPV73 (Munoz *et al.*, 2003).

Os HPV possuem genoma composto por uma DNA dupla-fita única, circular covalentemente fechada e de aproximadamente oito mil pares de nucleotídeos (figura 2). Não possuem envelope lipídico e seu capsídeo proteico possui forma icosaédrica. O HPV16, objeto de estudo desta tese, possui nove ORFs, entretanto, o número de produtos gênicos é maior que nove devido a um complexo uso de sítios de *splicing* de RNA mensageiros (Schwartz, 2008). Dentre as proteínas virais principais, E1, E2 e E4 participam do processo de manutenção do genoma viral, replicação genômica e montagem das partículas virais (Bergvall *et al.*, 2013; Doorbar, 2013; McBride, 2013). As proteínas E5, E6 e E7 são responsáveis pela manipulação dos processos celulares para promover ciclo viral (Dimaio & Petti, 2013; Roman & Munger, 2013; Vande Pol & Klingelutz, 2013), sendo E6 e E7 proteínas essenciais no processo de transformação celular (Munger *et al.*, 1989), discutidas

posteriormente em maiores detalhes. Por fim, as proteínas L1 e L2, expressas mais tardiamente no processo de infecção viral, compõem o capsídeo que envolve as novas cópias do DNA viral para formar novos vírions (Buck *et al.*, 2013; Wang & Roden, 2013).

Figura 2: Representação do genoma de um Alphapapillomavirus de alto risco. Em cores, ORFs estão representadas externamente. No círculo interno, a posição das bases nucleotídicas convencionadas. Adaptado de Doorbar *et al.* (2015).

A biologia do HPV está relacionada ao programa de diferenciação dos epitélios estratificados, expressando proteínas virais específicas para cada região do epitélio ao longo do ciclo reprodutivo viral (figura 3). O vírus infecta primeiramente os queratinócitos da camada basal do epitélio; o acesso a este sítio depende da ocorrência de um microtrauma no tecido, que expõe as células basais. Nestes compartimentos proliferativos do epitélio, há uma fase de manutenção episomal do genoma do vírus, as células se replicam simultaneamente e a carga viral é mantida em torno de 50 – 100 cópias por célula. Para os vírus oncogênicos em particular, a expressão gênica viral é muito controlada durante esta fase, na qual os oncogenes E6 e E7 são expressos em níveis baixos. Durante seu processo de diferenciação, os queratinócitos param de se dividir, iniciam a expressão de marcadores de

diferenciação terminal e se movem suprabasalmente (Koster, 2009); durante este processo, o vírus altera a expressão de seus genes e aumenta, em cada célula, o número de cópias do genoma viral para milhares. Nas camadas superiores do epitélio, os genes virais que codificam para as proteínas L1 e L2 são expressos e os genomas virais são encapsulados. Ao final do processo natural de diferenciação celular, a célula entra em senescência e as partículas virais são liberadas junto com a descamação celular (Doorbar *et al.*, 2015).

Figura 3: Evolução da doença na infecção por HPV. A infecção por HPV de alto risco pode levar a uma infecção assintomática (ou “silenciosa”), na qual genomas virais persistem na camada basal sem desenvolver a doença. Alternativamente (ou, posteriormente), desenvolve-se uma lesão produtiva, também chamada CIN1 (neoplasia cervical intraepitelial). Em alguns casos, a infecção pode evoluir para neoplasias de graus mais elevados, sendo classificados como CIN2 ou CIN3, consideradas lesões precursoras do câncer. A neoplasia é classificada como CIN1 quando está confinada a menos de um terço do epitélio, CIN2 quando ocupa até 2/3 do epitélio, CIN3 quando se estende por mais de 2/3 do tecido. As setas, e suas respectivas cores, representam a expressão de proteínas virais e a replicação do genoma do HPV em diferentes estágios e locais. Adaptado de Doorbar *et al.* (2015).

A persistência do HPV é um evento chave na história natural da infecção para o estabelecimento do carcinoma do colo uterino (figura 4), sendo dependente da habilidade viral de superar o sistema imune do hospedeiro; mulheres com infecção persistente de HPV de alto risco (tipos com alto potencial carcinogênico) apresentam

um risco cem vezes maior de desenvolver câncer cervical (Schlecht *et al.*, 2001). Ao longo deste processo, o genoma viral pode se integrar ao genoma da célula humana. Por ser circular, o DNA do HPV precisa se romper antes de se integrar e frequentemente encontramos, em amostras tumorais, quebras na região do gene E2 e, ocasionalmente, no gene E1. O produto do gene E2 é um regulador negativo da transcrição dos genes precoces de HPV e sua ausência leva a um aumento da expressão das proteínas E6 e E7, as principais oncoproteínas de HPV (Mcmurray *et al.*, 2001).

Figura 4: História natural da infecção por HPV. Proporção do desfecho dos casos de infecção por HPV ao longo do tempo. Adaptado de Moscicki *et al.* (2012).

E6 exerce um papel essencial na transformação celular, pois esta proteína tem capacidade de interagir com uma grande variedade de proteínas do hospedeiro (quadro 1) e, através destas interações, modificar vários processos celulares. A interferência de E6 já foi verificada na modulação da sobrevivência celular, transcrição gênica, diferenciação celular, dependência de fatores de crescimento, resposta a danos no DNA e progressão do ciclo celular (Howie *et al.*, 2009; Vande Pol & Klingelutz, 2013; Zanier *et al.*, 2013).

Nome do gene	Nome alternativo	Método de investigação
BAK1	Bak	GST/HA
BARD1	BARD1	Y2H/FL
BRCA1	Brca-1	GST/GPL
CREBBP	CBP	GST/FL/HA/AP-MS
CYLD	CYLD1	HA
DLG1	hDlg	GST/MY
EP300	P300	GST/FL/HA/AP-MS
FADD	FADD	GST/GPL
GOPC	CAL	GST/MT/HA/MS
GPS2	Gps2	Y2H/GST/IP
HERC2	SHEP1	TAP-MS/AP-MS
INADL	PATJ	Y2H/GST/FL/MY
IRF3	IRF3	GST
KAT5	Tip60	GST
MAGI1	MAGI-1	GST/HA/GPL
MAGI2	MAGI-2	GST
MAGI3	MAGI-3	GST
MCM7	Mcm7	Y2G/MBP
MGMT	MGMT	IP
MUPP1	MUPP1	GST
MYC	c-Myc	IP
NFX1	NFX1-91	Y2H/IP
PML	PML	GST
PTPN13	PTPN13	IP
PTPN3	PTPN3	IP/TAP
RCN2	E6-BP/ERC-55	GST/IP
SCRIB	Scribbled	IP/GPL/MS
SIPAIL1	E6TP1	Y2H/GST/GPL
SLC12A8	CCC9	AP-MS
SLC12A8	CCC9	AP-MS
TADA3	Ada3	Y2H/IP/GPL
TERT	TERT	GST/AU1-IP
TP53	P53	GST/IP/AP-MS
TSC2	Tuberin	Y2H/GST
TYK2	Tyk2	GST/FL
UBE3A	E6-AP	IP/AP-MS/GPL/Y2H
USP15	USP15	AP-MS
XRCC1	XRCC1	Y2H/IP
YWHAC	14-3-3zeta	GST/HA

Quadro 1: Proteínas que interagem com E6 de HPV de alto risco. GST: purificação por GST; IP: imunoprecipitação; Y2H: duplo híbrido em levedura; GPL: ensaio de luciferase (*Gaussia princeps*); AP-MS: purificação por espectrometria de massas de afinidade; HA: purificação por etiqueta HA; MY: purificação por etiqueta Myc; FL: purificação por etiqueta FLAG; TAP: purificação por afinidade em tandem; MT: MALDI-TOF; MBP: proteína ligante a maltose. Adaptado de Vande Pol *et al.* (2013).

A interferência mais significativa de E6 é sua ação sobre a proteína p53. Esta proteína é um regulador negativo da proliferação celular, controlando a transição da fase G0/G1 para S do ciclo celular (mitótico). Ela também age como supressora de tumor, interrompendo a proliferação quando há danos no DNA e permitindo a ação das enzimas de reparo ou direcionando a célula para apoptose, caso os danos não sejam reparados; tal ação de p53 lhe rendeu a alcunha de “guardião do genoma”. Quando E6 se liga a p53, esta é degradada na presença da proteína associada a E6

(E6AP), permitindo a progressão desregulada do ciclo celular e conferindo um caráter anti-apoptótico à célula, que sobrevive e prolifera mesmo acumulando alterações sem reparo no genoma (Havre *et al.*, 1995). Outra característica interessante de E6 é sua estabilização mediante a interação com um de seus alvos moleculares, no caso de E6 de HPV16, por exemplo, a proteína é comprovadamente estabilizada pela interação com a proteína E6AP (Tomaic *et al.*, 2009; Ansari *et al.*, 2012).

E7, por sua vez, tem como principal alvo a proteína do retinoblastoma, pRB. Esta inibe reguladores positivos do ciclo celular, como o transfator E2F, que promove a entrada na fase S do ciclo. pRB também induz apoptose celular em células com dano no DNA. Quando E7 se liga à forma hipofosforilada de pRB, E2F (que estava ligado à pRB e, conseqüentemente, inativo) é liberado e promove a progressão do processo de mitose celular (Pagano *et al.*, 1992; Roman & Munger, 2013).

A expressão desregulada de E7 estimula primordialmente a proliferação celular, enquanto que a expressão aumentada de E6 contribui para o acúmulo de mutações no genoma do hospedeiro. Quando continuamente executado, observa-se transformação celular (Munger *et al.*, 1989).

1.3. Imunologia das infecções por HPV

A habilidade do vírus HPV em evadir o sistema imune é crucial para seu estabelecimento em longo prazo. Como mencionado previamente, o ciclo natural desta infecção confere ao HPV melhor escape do sistema imune; o vírus não causa lise celular e não se espalha para outros sítios anatômicos a partir do local original de infecção (Einstein *et al.*, 2009). Entretanto, grande parte das infecções por HPV são eliminadas com sucesso pelo sistema imune, principalmente através da resposta

imune adaptativa celular. Os tipos HPV16 e HPV18 persistem por mais tempo que os demais tipos de alto risco, o que explica, em parte, a discrepante prevalência destes tipos em carcinomas (Koshiol & Kovacic, 2012).

Queratinócitos podem expressar diversos TLRs em sua superfície celular ou interior de endossomos (Lebre *et al.*, 2007; Nasu & Narahara, 2010). A expressão de oncoproteínas de HPV de alto risco, mas não de HPV de tipos com baixo potencial carcinogênico, inibiram a ativação de TLR9 e reduziram a transcrição deste gene em queratinócitos (Hasan *et al.*, 2007; Hasan *et al.*, 2013). Em outro estudo que relaciona a expressão de mRNA de TLRs e a infecção por HPV, foi observado que as infecções por HPV16 que regrediram foram significativamente associadas com um aumento da expressão de TLR2, TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9, fato não observado para HPV51, um tipo de baixo risco (Daud *et al.*, 2011). Isto sugere que a modulação da resposta imune deflagrada por TLR9 e demais TLRs possuem papel importante no combate ao HPV e podem ser determinantes para a persistência ou remoção do vírus.

Citocinas pró-inflamatórias, como intérférons do tipo I, não são detectadas em muitos casos de infecção por HPV, resultando na ausência de ativação, migração ou recrutamento de células imunes. Após integração do genoma HPV no DNA do hospedeiro, eliminação das formas epissomais do vírus e consequente alteração na expressão dos oncogenes virais, foi observado em cultivo de células um aumento da expressão endógena de genes de resposta antiviral, através da via de sinalização por intérferon tipo I (Pett *et al.*, 2006). Embora ainda não seja um consenso, muitos pesquisadores da área entendem que, após a integração do DNA viral ao genoma do hospedeiro, algumas ações do sistema imune favorecem a carcinogênese, eliminando a forma epissomal do vírus que codifica E2, inibidor da expressão das

oncoproteínas virais (Stanley *et al.*, 2007). Tindle *et al.* (2002) declara que o HPV evade o sistema imune ao invés de inibi-lo completamente.

Oncoproteínas virais desregulam a migração e adesão de células apresentadores de antígeno através da inibição da expressão de uma importante proteína de adesão, E-caderina (Fahey *et al.*, 2009). Também inibem a expressão de CCL20, uma importante quimiocina, MCP-1, IL-18 e genes responsivos a intérférons. Estudos mostram que os efeitos do TNF também são combatidos pelas oncoproteínas; enquanto E6 está associada à resistência contra apoptose mediada por TNF, a presença de E7 associa-se à resistência ao efeito antiproliferativo de TNF (Boccardo *et al.*, 2010; Stanley, 2012; Amador-Molina *et al.*, 2013; Nakahara & Kiyono, 2016). Por outro lado, foi observado a capacidade das proteínas E1 e E2 de HPV16 em potencializar a ação dos transfatores de ação pró-inflamatória NF- κ B e STAT3 (Prabhavathy *et al.*, 2014; Nakahara & Kiyono, 2016).

Através destes conhecimentos sobre interação proteica, este projeto pretende investigar como o HPV age sobre a cascata de sinais de TLRs. Nosso grupo de pesquisa recentemente descobriu que oncoproteínas E6 e E7 de HPV16 podem interagir com diversas proteínas da cascata de sinais de TLRs (dados ainda não publicados do pós-doutorado de Ismar R. Haga, FAPESP proc. nº 2008/53012-8). Dentre elas estão o Fator de Diferenciação Mieloide 88 (MyD88) e I κ B kinase ϵ (IKK ϵ), estudadas mais profundamente neste trabalho. Transfatores regulados pela via de sinalização de TLRs também são alvo de interferência por oncoproteínas virais. IRF-3 tem sua atividade transcricional inibida mediante interação com E6 (Ronco *et al.*, 1998).

O interesse clínico sobre TLRs em terapias contra o câncer é crescente e a relação entre TLRs e câncer vem sendo estudada por vários grupos de pesquisa (So

& Ouchi, 2010; Zhu & Mohan, 2010; Öhlschläger *et al.*, 2011). Drogas que ativam TLRs podem ter grande potencial em tratamentos de câncer, normalmente combinados com outras terapias, para auxiliar a ativação de processos imunes de combate às células tumorais. Similarmente, a inibição de certos TLRs pode ser útil em terapias contra tumores associados à inflamação (O'Neill, 2008). Diversos trabalhos estudam o uso de tratamentos para melhorar a resposta imune inata para combater a infecção por HPV (Amador-Molina *et al.*, 2013); dentre os tratamentos testados estão oligodesoxinucleotídeos (ODNs, agonistas de TLR9) (Kim *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004; Krieg, 2006), agonistas de TLR8 e TLR7 (Fahey *et al.*, 2009), lipopolissacarídeo (LPS, agonista de TLR4) e agonistas de TLR3 (Chen *et al.*, 2010).

1.4. Fator de diferenciação mieloide 88 (MyD88)

MyD88 é uma proteína adaptadora central na resposta imune adaptativa e inata. É integrante essencial da via de sinalização do receptor de interleucina 1 (IL-1R) e vários TLRs, sendo canonicamente a primeira etapa da via de sinalização de todos os TLR conhecidos, com exceção do TLR3 e TLR4 nos endossomos. Esta proteína contém um domínio chamada domínio de morte (*death domain*) em sua porção aminoterminal e um domínio TIR (*Toll* IL-1R) em sua porção carboxiterminal. O domínio TIR interage com os receptores citados, enquanto que o domínio de morte interage com as quinases IRAK, a jusante da via de sinalização (Wesche *et al.*, 1997; Medzhitov *et al.*, 1998; Muzio *et al.*, 1999; Kawai *et al.*, 1999). Mediante a tamanha importância de MyD88 para a resposta imune contra infecções, alguns microrganismos desenvolveram estratégias direcionadas a esta proteína para evadir o sistema imune. O Vírus da Hepatite C possui uma proteína (NS5A) que se liga à MyD88 e impede a sinalização por esta; por sua vez, o Herpesvírus associado ao

Sarcoma de Kaposi induz a degradação de MyD88 através da proteína RTA (Abe *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2015).

Apesar de sua importância na resposta imune para a proteção do organismo, MyD88 pode ter papel pró-tumoral por estar envolvida no processo de inflamação, sendo assim contribui para carcinogênese de pele, fígado, pâncreas e cólon (Swann *et al.*, 2008; Salcedo *et al.*, 2013; Kfoury *et al.*, 2014). Uma vez que a resposta imune e a inflamação têm papel significativo no processo de carcinogênese pelos Papilomavírus (Boccardo *et al.*, 2010), é possível que MyD88 esteja envolvido na progressão da doença causada por HPV.

Ao analisarmos a sequência codificadora da proteína MyD88, pudemos notar que esta possui em sua estrutura primária uma pequena sequência de cinco aminoácidos LLELL (leucina, leucina, ácido glutâmico, leucina, leucina). Sítios compostos por cinco resíduos de aminoácidos LxxLL (sendo “x” um aminoácido qualquer), normalmente contendo um aminoácido negativamente carregado na terceira posição, são sítios comuns de interação com a proteína E6 de HPV16. Dentre as proteínas que interagem com E6 através deste motivo está UBE3A, também conhecida como Proteína Associada à E6 (E6AP), que participa diretamente da ação mais conhecida de E6, a ubiquitinação de p53. Portanto, o papel que E6 exerce no processo de carcinogênese depende de sua interação com o motivo LxxLL (Vande Pol & Klingelutz, 2013).

1.5. IκB quinase ε (IKKε)

As quinases de inibidores de κB (IκB), chamadas IKKs, exercem importante função na resposta inata, ativando transdutores efetores da resposta imune. As enzimas chamadas canônicas IκB quinase α (IKKα) e IκB quinase β (IKKβ) têm importante função na ativação dos transdutores NF-κB. A IκB quinase ε (IKKε) e a

proteína TBK1 são conhecidas como quinases não canônicas relacionadas a IKKs; apesar de serem capazes de fosforilar I κ B, sua principal função na resposta imune é ativar os fatores reguladores de interferon (IRFs), em especial IRF3 e IRF7 (Sankar *et al.*, 2006). Acredita-se também que IKK ϵ também influencia a atividade de NF- κ B a jusante da fosforilação de I κ B (Verhelst *et al.*, 2013).

IKK ϵ participa em etapas posteriores da via de sinalização de TLR e ativação de NF- κ B e IRF3, sendo essencial na resposta antiviral. Observou-se que esta proteína funciona como oncogene em câncer de mama (Boehm *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2010; Qin & Cheng, 2010), coordena chave de invasão e metástase em câncer de ovário (Hsu *et al.*, 2012) e estimula proliferação e invasão em gliomas (Li *et al.*, 2012). Estudos mostram que IKK ϵ também pode funcionar como protetor contra morte celular por dano ao DNA (Renner *et al.*, 2010).

Pelo exposto, IKK ϵ vem se tornando um potencial alvo terapêutico para doenças autoimunes e certos tipos de câncer (Verhelst *et al.*, 2013). Adicionalmente, têm-se evidências que esta quinase desempenha papel importante em processos de carcinogênese causadas por vírus (Kaukinen *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013).

Pretende-se caracterizar o sítio de interação destas proteínas humanas com a oncoproteína E6 de HPV16 para compreender melhor o papel destas interações proteicas na progressão da doença causada por HPV. Nossa hipótese é que a interação de E6 com IKK ϵ e/ou MyD88 promova a progressão do processo de transformação tumoral e/ou a evasão do sistema imune das células infectadas por HPV.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Analisar a relação entre a resposta imune inata exercida pelos receptores do tipo *Toll* e o processo de infecção e carcinogênese pelo Papilomavírus humano.

2.2. Objetivos específicos

- Investigar a correlação do polimorfismo rs5743836 do promotor de *TLR9* com susceptibilidade ou resistência a infecções persistentes por HPV e neoplasias cervicais de mulheres pertencentes a um estudo epidemiológico de história natural de infecções por HPV e risco de neoplasia na cérvix uterina.
- Estudar a interação de E6 de HPV16 com proteínas humanas em vias de sinalização dependentes de
 - Dependentes de MyD88
 - Independente de MyD88, via IKK ϵ e TBK1.
 - Definir o sítio de interação entre E6 e as proteínas IKK ϵ e MyD88.
- Estudar a ação das oncoproteínas de HPV16 sobre transfatores e citocinas relacionadas à resposta mediada por TLRs.

3 MATERIAL E MÉTODOS

POLIMORFISMO DO PROMOTOR DE TLR9

3.1. Amostras de DNA genômico de esfregaços cervicais

As amostras biológicas foram obtidas de um estudo epidemiológico de história natural de HPV e risco de neoplasia na cérvix uterina realizado por nosso grupo de pesquisa, sendo conduzido respeitando as normas éticas dos termos da Declaração de Helsinki. Desde 1993, mulheres envolvidas em um programa de rastreio de câncer para famílias de baixa renda em São Paulo têm sido acompanhadas. As visitas foram programadas como uma a cada quatro meses no primeiro ano pós-matrícula e posteriormente uma visita a cada seis meses. Em cada uma dessas visitas, amostras cervicais foram coletadas para testes citológicos e de HPV (Franco *et al.*, 1999). Esta coorte gerou diversas publicações quanto às variáveis relativas ao HPV e ao hospedeiro e suas influências na história natural da infecção (Villa *et al.*, 1992; Rabachini *et al.*, 2010).

O DNA genômico foi extraído utilizando-se colunas de troca iônica *Glass Max DNA Isolation Spin Cartridge System* (Gibco/BRL), conforme Rabachini *et al.* (2010).

3.2. PCR bidimensional para amplificação de alelos específicos (Bi-PASA)

Bi-PASA usa uma combinação de quatro *primers* (figura 5), dois *primers* externos (chamados F e R) e dois *primers* internos específicos para cada alelo (chamados M e W). Estes possuem uma cauda 5' composta de 10 nucleotídeos G+C, o que aumenta a taxa de amplificação dos fragmentos previamente amplificados em relação ao DNA genômico, aumentando a eficiência da reação;

além disso, previne *megaprinting*, definido como a amplificação a partir de um fragmento previamente amplificado que passa ser *primer* para outra reação.

O fragmento FR, resultante da amplificação dos nucleotídeos entre os *primers* F e R, é sempre produzido e serve como controle positivo da reação. O fragmento MR (amplificação entre *primers* M e R) só é produzido em indivíduos que contém a mutação estudada, sendo observada em homozigotos mutantes e heterozigotos. O fragmento FW (amplificação entre *primers* F e W) só é produzido em indivíduos que não contem a mutação estudada, sendo observada em homozigotos normais e heterozigotos.

Figura 5: PCR bidimensional para amplificação de alelos específicos. Adaptado de Liu *et al.* (1997).

Os *primers* foram desenhados segundo recomendações de Liu *et al.* (1997) e as sequências usadas são específicas para detectar a mutação (rs5743836) no promotor de TLR9 (Carvalho *et al.*, 2008). A concentração dos *primers* foi otimizada experimentalmente neste projeto (quadro 2).

Sigla	Sequência (5' → 3')	Concentração (μM)
F	TCATTCAGCCTTCACTCAGA	0,4
R	CACATTCAGCCCCTAGAGGG	0,4
M	ggcgggcgggggccTGCTGTTCCCTCTGCCTGA	0,1
W	gggccgggggccATGAGACTTGGGGGAGTTTC	0,05

Quadro 2: Descrição dos *primers* empregados nos experimentos de BiPASA. Nas sequências nucleotídicas, letras maiúsculas representam segmento complementar à região promotora de TLR9; as letras minúsculas presentes nos *primers* M e W são caudas 5' não complementares ricas em C+G.

As PCRs foram executadas com a enzima *Taq GOLD DNA Polymerase* (Invitrogen), segundo as especificações do fabricante. Os fragmentos obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, corados com corante GelRed™.

3.3. Sequenciamento de amostras

Foram escolhidas amostras com diferentes resultados segundo Bi-PASA para serem confirmadas por sequenciamento. A região promotora de TLR9 foi amplificada por PCR utilizando os *primers* F e R descritos acima, nenhum *primer* interno foi utilizado.

Os fragmentos foram sequenciados utilizando o sequenciador ABI PRISM® 3100 GeneticAnalyzer / HITACHI, utilizando como fluoróforo o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), segundo especificações do fabricante. Após reação com o fluoróforo, as amostras (de volume final 15 µL) foram precipitadas com 25 µL solução de NaOAc pH 5,2 (110 mM) e glicogênio (35 µg/mL) em etanol 100% gelado. Após vórtex, foram incubadas por 15 min no gelo e, em seguida, centrifugadas a 4000 rpm por 20 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 50 µL de etanol 70%, sendo este retirado posteriormente por 10 min de centrifugação a 4000 rpm. Em seguida foram secas com incubação por 1 min à 95°C, ao abrigo de luz, e foram encaminhadas para sequenciamento (Serviço de Sequenciamento de DNA, Instituto de Química USP).

3.4. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas usando Stata 12.1 (STATA Corp. College Station, TX). Foram comparadas as taxas de positividade (número de casos positivos) para os diferentes genótipos de TLR9 entre os casos. Calculou-se o índice de probabilidade, ajustado por idade, e os respectivos intervalos de confiança (CI) de 95% usando regressão logística para medir a magnitude da associação entre o genótipo de TLR9 e o risco de infecção por HPV. Para estimar a associação entre genótipo de TLR9 e infecção, indivíduos que atestaram positivamente para a presença de um alelo de TLR9 foram comparados com aqueles que não possuem este alelo. Isto resultou em dois modelos para atribuir o fenótipo: dominante, definido como homozigoto mutante e heterozigoto contra homozigoto selvagem (CC + TC x

TT), e recessivo, definido como homozigoto selvagem e heterozigoto contra homozigoto mutante (TT + TC x CC). A análise estatística foi realizada pelo grupo do Dr. Eduardo Franco, chefe do Departamento de Oncologia da *McGill University*, Montreal, Canadá.

AÇÃO DE E6 de HPV16 SOBRE AS VIAS DE SINALIZAÇÃO DE TLR

3.5. Plasmídeos

Os plasmídeos que codificam para MyD88 (contendo etiqueta AU1), IKK ϵ (contendo etiqueta FLAG) e TBK1 (contendo etiqueta FLAG) foram gentilmente doados pelo *Trinity College* (Dublin, Irlanda). O plasmídeo que codifica para E6 de HPV16 (contendo etiqueta HA) foi gentilmente cedido pelo *International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology* (Trieste, Itália). Plasmídeos codificando para IKK α ou IKK β (contendo etiqueta FLAG) foram doados pelo *McArdle Laboratory for Cancer Research* (Madison-WI, E.U.A.).

3.6. Cultivo de células humanas

As seguintes células foram utilizadas durante este projeto:

- **Células HEK293T (ou 293T):** derivadas de tecido embrionário de rim humano. São células sabidamente fáceis de transfectar e contêm o antígeno T do vírus SV40. A presença da proteína antígeno T torna as células competentes em replicar vetores contendo a origem de replicação de SV40, intensificando a capacidade de expressão heteróloga de proteínas quando se utiliza plasmídeos com este recurso. Cultivadas em meio DMEM com 10% (v/v) de soro fetal bovino. Adquiridas da empresa ATCC®.

- **Células CaSki:** oriundas de câncer escamoso da cérvix uterina, encontradas em uma metástase no mesentériode uma paciente caucasiana, na época com quarenta anos de idade. As células possuem 200-400 cópias do genoma de HPV16 integrado. Estas células expressam as oncoproteínas E6 e E7 de HPV16. Cultivadas em meio DMEM com 10% (v/v) de soro fetal bovino. Adquiridas da empresa ATCC®.
- **Células HeLa:** células cervicais originadas de um adenocarcinoma causado por HPV18 em uma mulher negra de 31 anos de idade. Contêm 20-40 cópias do genoma de HPV18 integrado em seu DNA e expressam constitutivamente as oncoproteínas deste. Cultivadas em meio MEM com 10% (v/v) de soro fetal bovino. Adquiridas da empresa ATCC®.
- **Células SiHa:** células cervicais originadas de um carcinoma causado por HPV16 em uma mulher asiática de 55 anos de idade. Contêm 1-2 cópias do genoma de HPV16 integrado em seu DNA e expressam constitutivamente as oncoproteínas deste. Cultivadas em meio MEM com 10% (v/v) de soro fetal bovino. Adquiridas da empresa ATCC®.
- **Células PHK:** queratinócitos humanos primários, livres da presença de quaisquer HPV ou outro parasita. Cultivadas em meio KSFM, meio livre de soro, específico para queratinócitos. Adquiridas da empresa Lonza®.
- **Células HTE:** células epiteliais de tonsila humana; imortalizadas por transdução (e consequente expressão) estável do gene da telomerase humana (hTERT), e silenciamento do gene do supressor de tumor p16, por *shRNA*. Cultivadas em meio KSFM, meio livre de soro, específico para queratinócitos. Cedidas gentilmente pelo Dr. Paul F. Lambert (*McArdle Laboratory for Cancer Research*).

- **Células HTE-Ø (ou HTEv):** Células HTE transduzidas estavelmente com o plasmídeo pLXSN vazio, um vetor retroviral que possibilita a integração do gene exógeno no genoma celular.
- **Células HTE-E6:** Células HTE transduzidas estavelmente com o plasmídeo pLXSN contendo a região codificadora de E6 de HPV16.
- **Células HTE-E7:** Células HTE transduzidas estavelmente com o plasmídeo pLXSN contendo a região codificadora de E7 de HPV16.
- **Células HTE-E6E7:** Células HTE transduzidas estavelmente com o plasmídeo pLXSN contendo a região codificadora de E6 e E7 de HPV16.
- **Células C33 (ou C-33A):** linhagem de células cervicais, originadas de um câncer cervical em uma paciente de sessenta e seis anos, caucasiana. Não contém DNA, RNA ou expressão de oncoproteínas de HPV. Possui mutações nos genes de p53 e pRB. p53 possui uma mutação pontual no códon 273, substituindo o resíduo de arginina original para um resíduo de cisteína. A proteína pRB está presente, porém mutada devido a alterações no *splicing* de seu mRNA. Cultivadas em meio MEM com 10% (v/v) de soro fetal bovino. Adquiridas da empresa ATCC®.
- **Células HFK/SV40:** Queratinócitos humanos de prepúcio de recém-nascido, imortalizadas com o vírus SV40. A presença da proteína antígeno T torna as células competentes em replicar vetores contendo a origem de replicação de SV40, intensificando a capacidade de expressão heteróloga de proteínas quando se utiliza plasmídeos com este recurso. Não apresenta DNA, RNA ou proteínas de HPV. Cultivadas em meio de cultura F completo na presença de células 3T3-J2. Cedidas gentilmente pelo Dr. Paul F. Lambert (*McArdle Laboratory for Cancer Research*).

- **Células NIKS:** Queratinócitos humanos, isolados de prepúcio de recém-nascido, espontaneamente imortalizados. Não apresenta DNA, RNA ou proteínas de HPV. Cultivadas em meio de cultura F completo na presença de células 3T3-J2. Cedidas gentilmente pelo Dr. Paul F. Lambert (*McArdle Laboratory for Cancer Research*).
- **Células NOKS:** Queratinócitos orais humanos normais; imortalizados por transdução (e consequente expressão) estável do gene da telomerase humana (hTERT). Não apresenta DNA, RNA ou proteínas de HPV. Cultivadas em meio de cultura F completo na presença de células 3T3-J2 ou em meio KSFM. Cedidas gentilmente pelo Dr. Paul F. Lambert (*McArdle Laboratory for Cancer Research*).
- **Células HaCaT:** queratinócitos espontaneamente imortalizados, originados de um homem caucasiano de sessenta e dois anos. Não apresenta DNA, RNA ou proteínas de HPV. Cultivadas em meio DMEM com 10% (v/v) de soro fetal bovino. Adquiridas da empresa ATCC®.
- **Células Jurkat:** linhagem celular estabelecida a partir de linfócitos T de um garoto de catorze anos com leucemia linfoblástica aguda. Estas células são sugeridas pelos fabricantes de anticorpos anti-MyD88 e anti-IKK ϵ (abcam) como controle positivo para expressão das proteínas MyD88 e IKK ϵ utilizadas neste projeto; desta forma, o extrato proteico de células desta cultura foram utilizados algumas vezes como controle positivo em experimentos deste projeto. Cultivadas em meio RPMI com 10% (v/v) de soro fetal bovino. Cedidas gentilmente pelo Dr. Paul F. Lambert (*McArdle Laboratory for Cancer Research*), oriundas da empresa ATCC®.
- **Células 3T3-J2:** fibroblastos embrionários de camundongo, utilizados como cultura alimentadora (*feeders*), também chamada “camada de sustentação”, para

certos tipos celulares. Cultivadas em meio de cultura F completo ou em meio DMEM com 10% (v/v) de soro fetal bovino. Cedidas gentilmente pelo Dr. Paul F. Lambert (*McArdle Laboratory for Cancer Research*), oriundas da empresa ATCC®.

As linhagens de queratinócitos que necessitam do cocultivo de fibroblastos 3T3 foram cultivadas de acordo com as recomendações de Lambert *et al.* (2005), assim como os meios de cultura e demais reagentes utilizados para as mesmas.

3.7. Clonagens gênicas

3.7.1. Mutagênese sítio-dirigida de MyD88

A região codificadora do gene MyD88 foi clonada no vetor pcDNA3 segundo Fitzgerald *et al.* (2001) e a nós cedido gentilmente. A construção foi confirmada por sequenciamento e utilizada para experimentos de mutagênese sítio-dirigida.

Foi descoberto por nossos pesquisadores que E6 de HPV16 forma um complexo proteico com MyD88 (dados não publicados do pós-doutorado de Ismar R. Haga, FAPESP proc. nº 2008/53012-8). Uma vez que esta possui em sua sequência primária o motivo LxxLL, conhecido motivo conservado de interação da proteína E6 com proteínas humanas, um experimento de mutagênese sítio-dirigida foi realizado para investigar se este é o sítio desta interação proteica.

A mutagênese foi executada com o kit GeneArt® *Site-Directed Mutagenesis System* (Invitrogen), segundo as orientações do fabricante, utilizando a enzima polimerase AccuPrime Pfx (Applied Biosystems). Cinco pares de *primers* foram desenhados para a obtenção de cinco mutantes diferentes para este motivo de cinco resíduos de aminoácidos, LLELL na proteína selvagem. 5' gtaggccgactgctcgagctgtctactaccaagctgggccgcgacgacg 3' e 5'

cgctgctcgggcccagcttggttagacagctcgagcagtcggcctac 3' para trocar o motivo selvagem por LLELS; 5' cctggcgcctctgtaggccgagcggccgagctgcttaccaagctgggccc 3' e 5' ggcccagcttggttaagcagctcggccgctcggcctacagaggcgccagg 3' para trocar o motivo selvagem por AAELL; 5' gtagggcgactgctcgaggcggctaccaagctgggcccgcgacg 3' e 5' cgctcgggcccqgcttggttagccgcctcgagcagtcggcctac 3' para se obter LLEAA; 5' ggcgccctctgtaggccgagcggccgcggcggtaccaagctgggcccgcgacg 3' e 5' cgctcgggcccagcttggttagccgcggccgctcggcctacagaggcgcc 3' para se obter AAAAA; 5' cgccctctgtaggccgactgctccagctgcttaccaagctgggcccgcg 3' e 5' cgcgggcccagcttggttaagcagctggagcagtcggcctacagaggcg 3' para se obter LLQLL.

Nestes experimentos, os plasmídeos são primeiramente submetidos à metilação e em seguida amplificados usando os *primers* que contém as mutações na sequência. Uma vez que a enzima DNA Metilase é desnaturada na primeira etapa da reação de PCR, os plasmídeos produzidos por amplificação não serão metilados. Esta reação é utilizada para transformar bactérias *E. coli* DH5 α TM-T1^R (genótipo: F- ϕ 80/*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r_k^- , m_k^+) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA*), que circulariza o DNA mutado (não-metilado) e digere o DNA molde metilado, que não contém mutações, pela ação da endonuclease *McrBC*, deixando apenas o produto mutado não-metilado.

Após as reações, foram obtidos os primeiros possíveis clones transformantes em meio seletivo sólido. Posteriormente, os clones foram crescidos separadamente, seu DNA plasmidial foi extraído e submetido à sequenciamento para confirmação da mutação (Serviço de Sequenciamento de DNA, Instituto de Química USP). Os mutantes foram obtidos com sucesso e confirmados por sequenciamento. Os plasmídeos foram transfectados em cultura de células humanas HEK293T e a

expressão proteica foi analisada por Western-Blot utilizando o anticorpo anti-AU1, etiqueta molecular expressa juntamente com estas proteínas.

3.7.2. Mapeamento do domínio de interação de IKK ϵ

A região codificadora do gene IKK ϵ foi clonada em um vetor plasmidial por Peters *et al.* (2000) e cedida ao nosso grupo de pesquisa. Para se mapear o local da interação entre esta proteína humana e a oncoproteína E6 de HPV16 (observação do nosso grupo de pesquisa; dados ainda não publicados), foram desenhados *primers* para construção de proteínas truncadas. Estes *primers* contêm sítios de restrição para *Bam*HI (*primers forward*) ou *Xba*I (*primers reverse*) para clonagem no vetor pCDNA3 (Invitrogen) para expressão em queratinócitos humanos.

Objetivou-se construir proteínas truncadas em diferentes regiões de IKK ϵ , mantendo os limites dos domínios proteicos conhecidos e possibilitando o estudo de diferentes regiões da proteína. As construções foram nomeadas de acordo com as regiões codificadas, como representado na figura 6. A construção denominada 1-1 é constituída pelo 1º ao 160º aminoácido da proteína selvagem (também denominada “IKK ϵ Nterm” em alguns experimentos); a construção denominada 1-2 é constituída pelo 1º ao 315º aminoácido da proteína selvagem, até o final do domínio quinase (UniProt: a hub for protein information, 2014); a construção denominada 1-3 é constituída pelo 1º ao 569º aminoácido da proteína selvagem; a construção denominada 1-4 representa a proteína selvagem (1º ao 717º aminoácido); a construção denominada 2-3 é constituída pelo 315º ao 569º aminoácido da proteína selvagem; a construção denominada 2-3 é constituída pelo 315º ao 717º aminoácido da proteína selvagem.

Figura 6: Esquema dos fragmentos produzidos da região codificadora de IKKε. Domínios conhecidos estão destacados em tons de cinza; nas extremidades, o número da base onde o fragmento foi interrompido. Cada barra representa uma construção gênica, nomeada à esquerda. Acima das barras, posição original dos aminoácidos (aa) que delimitam as construções.

Os *primers* utilizados na clonagem estão listados no quadro abaixo:

<i>Primer</i>	Local de anelamento (5')	Sequência (5' → 3')
<i>Foward 1</i>	1º nucleotídeo	agctcaggatccatgcagagcacagccaattac
<i>Foward 2</i>	945º nucleotídeo	atgctaggatccgttgtcgtccatgtcttctcc
<i>Reverse 1</i>	480º nucleotídeo	atgcattctagatcaagcgccgaagtctgtcag
<i>Reverse 2</i>	945º nucleotídeo	aggcaatctagatcaggagaagacatggacgacaac
<i>Reverse 3</i>	1707º nucleotídeo	atgcactctagatcagttgtagccaagccctg
<i>Reverse 4</i>	2151º nucleotídeo	tcgagttctagatcatcagacatcaggaggtgctg

Quadro 3: *Primers* utilizados na clonagem de proteínas truncadas de IKKε.

Os fragmentos contendo segmentos específicos da região codificadora de IKKε foram amplificados com sucesso por PCR e inseridos no vetor pcDNA3. Todas as seis construções foram confirmadas por sequenciamento (Serviço de

Sequenciamento de DNA, Instituto de Química USP). Estas construções codificam também para a etiqueta molecular FLAG, à montante do segmento de *IKKε*.

As proteínas truncadas de *IKKε* foram analisadas quanto à interação com E6 por ensaios de coimunoprecipitação de proteínas. Cada uma das construções foram transfectadas individualmente ou em conjunto com E6 de HPV16. Os extratos foram incubados com resina anti-FLAG e as proteínas eluídas foram analisadas por Western-Blot, utilizando anti-HA.

3.8. Transfecção de células HEK293T e extração de proteínas

Células HEK293T foram transfectadas com os diferentes plasmídeos gerados. Quando atingiram 60-80% de confluência, transfectou-se 1 µg de DNA em cada poço, de placas de seis poços (2 mL de meio de cultura por poço), usando o reagente FuGENE[®] HD (Promega), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Para placas de 100 mm de diâmetro foram utilizados 4 µg de DNA. Posteriormente, nosso grupo adquiriu o reagente FuGENE[®] 6 (Promega) e este se mostrou ainda mais eficiente para transfectar células HEK293T, pois possui menor toxicidade e permite utilização de uma quantidade maior de DNA por transfecção. Quando transfectadas com FuGENE[®] 6, foram utilizados 3 µg de DNA em cada poço de uma placa de seis poços, 6 µg de DNA em placas de 60 mm de diâmetro e 18 µg de DNA em placas de 100 mm de diâmetro. Para cada 1 µg de DNA, foram utilizados 3 µL do reagente de transfecção (proporção 3:1).

Após o tempo de indução (quando não especificado, 24 horas), o meio foi retirado e as células foram cuidadosamente lavadas com tampão PBS. Em cada poço (das placas de seis poços), foram adicionados 150 µL do tampão de lise, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA e 1% (v/v) TRITON X-100, acrescido de

inibidores de protease *cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail* (Roche); em seguida, as células foram raspadas vigorosamente; para placas de 100 mm de diâmetro, foram utilizado 500 µL de tampão por placa e para placas de 60 mm de diâmetro, foram utilizados 400 µL. O conteúdo foi transferido para um microtubo e mantido no gelo por 20 minutos, em seguida agitadas em vórtex por 30 segundos. As amostras foram centrifugadas a 16000 xg por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante foi reservado. Os extratos proteicos foram utilizados em experimentos Western-Blot.

Para experimentos de coimunoprecipitação, o protocolo de extração foi modificado para evitar que as interações proteicas fossem desfeitas. Após a remoção do meio de cultura, as células foram lavadas com tampão PBS posteriormente tratadas com tripsina. Após se desprenderem da placa, foi adicionado meio de cultura contendo soro fetal bovino para inativar a tripsina e as células foram centrifugadas a 2000 rpm por 2 minutos, o sobrenadante foi removido e em seguida as células foram ressuspensas no tampão de lise, de acordo com os volumes descritos no parágrafo anterior. As amostras foram incubadas no gelo por 20 minutos, sob leve agitação, e centrifugadas, em seguida, a 16000 xg por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante foi reservado.

3.9. Transfecção de queratinócitos humanos

Queratinócitos humanos, tanto primários quanto imortalizados, não apresentam a mesma facilidade em expressar proteínas heterólogas por meio de transfecção transiente. Estudos prévios de nosso grupo de pesquisa demonstraram que o reagente de transfecção FuGENE® HD (Promega) foi o mais eficiente para a expressão heteróloga nestas culturas (Mirian Morale, projeto Doutorado FAPESP, número 2011/14416-9).

As linhagens que necessitam da presença de cultura alimentadora (NIKS, NOKS e HFK/SV40) foram crescidas em meio F completo com baixa concentração de Cálcio (*Low-calcium F medium*), sem a presença de uma cultura alimentadora; as demais culturas foram crescidas em seus respectivos meios de cultura recomendados.

Três quantidades distintas de células foram plaqueadas em placas de doze poços: 2×10^3 células, 2×10^4 células e 2×10^5 células. As células foram transfectadas com duas quantidades distintas de DNA plasmidial, 250 ng e 500 ng, e quatro razões distintas de reagente de transfecção: 1 μ L reagente / 1 μ g DNA (1:1), 2 μ L reagente / 1 μ g DNA (2:1), 3 μ L reagente / 1 μ g DNA (3:1), 5 μ L reagente / 1 μ g DNA (5:1). Todas as combinações possíveis das condições descritas foram avaliadas em células NIKS, NOKS, HFK/SV40, HaCaT e HTE-Ø, utilizando o plasmídeo pEGFP-N1 (Clontech), para expressão da proteína fluorescente verde (GFP).

A eficiência e a toxicidade da transfecção foram avaliadas visualmente em microscópios que utilizam uma fonte de luz convencional (branca) e lâmpadas com filamentos de halogênio (para observação da proteína GFP). A melhor condição de expressão e toxicidade foi utilizada em transfecções subsequentes, com plasmídeos para expressão de E6 de HPV16, MyD88 e IKK ϵ . Para placas de 100 mm de diâmetro, a quantidade de DNA e FuGENE[®] HD utilizados foi multiplicada por oito vezes (em relação às quantidades utilizadas para placas de doze poços).

A expressão de E6, IKK ϵ e MyD88 foi avaliada por Western-Blot, utilizando anticorpos contra a proteína ou a etiqueta molecular nelas contida (HA, FLAG e AU1, respectivamente).

Posteriormente, mediante a ineficiência de expressão heteróloga das proteínas de interesse nas diferentes linhagens de queratinócitos imortalizados,

células HeLa e C33 foram utilizadas em testes de transfecção. Inicialmente, foram testados dois reagentes de transfecção diferentes (FuGENE[®] HD e FuGENE[®] 6), em duas razões reagente/DNA (3µL:1µg e 5µL:1µg) e três quantidades de DNA (1, 2 e 3 µg) pEGFP-N1. Este teste inicial foi realizado em placas de seis poços. A expressão heteróloga da proteína GFP foi avaliada por citometria de fluxo no citômetro Attune[®] Acoustic Focusing Cytometer (primeira geração; Applied Biosystems). As melhores condições foram testadas em placas de 100 mm, assim como células HEK293T, HTE-Ø e HTE-E7, para comparação. As células foram transfectadas com pEGFP-N1 e avaliadas em citometria de fluxo, simultaneamente, as mesmas linhagens foram transfectadas com plasmídeo contendo E6 de HPV16, nas mesmas condições e avaliados por Western-Blot.

Os resultados obtidos por citometria foram avaliados por três parâmetros. Primeiramente são contadas quantas das células analisadas expressam GFP (denominado %GFP+). Em seguida, a quantidade de GFP nas células foi avaliada multiplicando a intensidade média de fluorescência (MFI) lida com o filtro BL1-A (somatório dos valores de fluorescência lidos dividido pelo número de células analisadas) pela concentração das células expressando GFP (células por volume), o resultado desta multiplicação é o somatório da fluorescência (diretamente proporcional à quantidade de GFP presente) dividida pelo volume (constante entre as amostras). Este valor foi preferido ao invés de MFI somente porque diferentes culturas e métodos de transfecção alteram a quantidade de células no final do experimento, resultando em extratos com quantidades diferentes de proteína total; ao multiplicarmos pela concentração de células, amostras com mais células (e consequentemente mais proteínas heterólogas produzidas) são favorecidas.

Queratinócitos HTE foram submetidas a várias condições de transfecção (figura 7). A melhor eficiência de transfecção foi obtida utilizando 500 ng de DNA e 5 μ L de FuGENE[®] HD para cada 1 μ g de DNA plasmidial (5:1); porém esta condição é altamente tóxica para as células após 48h, sendo ideal a extração das proteínas 24h após transfecção. Para experimentos de longa duração, a melhor condição de transfecção foi utilizando 250 ng de DNA e FuGENE[®] HD na razão 5:1.

Figura 7: Exemplo de transfecção transiente de GFP. A: Células HTE-Ø transfectadas com pEGFP-N1 (luz branca à esquerda; fluorescência à direita). As células foram crescidas em placas de 10 cm de diâmetro e transfectadas com 4 μ g de GFP e FuGENE[®] HD na razão 5:1. As células foram transfectadas 24h após plaqueamento e as imagens foram obtidas 24h após transfecção. O número de células eficientemente transfectadas foi de 10–20%. A toxicidade observada foi baixa. **B:** exemplo de transfecção de células HEK293T transfectada com o mesmo plasmídeo (sobreposição de luz branca e fluorescência), alcançando uma taxa de transfecção acima de 90% das células.

Entretanto, a expressão heteróloga de proteínas de interesse deste projeto não foi verificada em Western-Blot, indicando que a transfecção não foi

suficientemente eficaz. A eficiência da transfecção por GFP foi a partir de então analisada por citometria de fluxo (figura 8). Podemos observar que a porcentagem de células HTE-Ø transfectadas não é tão baixa, mas a quantidade relativa de GFP produzido por estas é muito inferior à quantidade de GFP produzida por células da linhagem HEK293T. Este resultado poderia explicar a ausência de proteínas heterólogas nos ensaios de Western-Blot, mesmo quando o número de células transfectadas (medidas pela porcentagem de células GFP+) era satisfatório.

Figura 8: Avaliação da transfecção com GFP. Células HTE-Ø e HEK293T transfectadas com pEGFP-N1 utilizando FuGENE® 6 ou FuGENE® HD. As células foram crescidas em placas de 100 mm de diâmetro. O gráfico da esquerda indica a porcentagem de células/eventos e a porcentagem de células expressando GFP. O gráfico da direita representa a quantidade relativa de GFP em cada amostra (GFP relativo). Barras de erro representam o desvio padrão calculado.

Diante deste cenário, foram realizados experimentos utilizando as linhagens HeLa e C33 em experimentos de expressão heteróloga avaliados por citometria. Estas células foram avaliadas quanto ao método de transfecção mais eficiente. Esta otimização foi executada em placas de seis poços. Células HeLa foram transfectadas de maneira mais eficiente quando se utilizou 1 µg de DNA plasmidial e

3 μ L de FuGENE[®] HD, tal como foi observado anteriormente para células HTE. Células C33 tiveram melhor eficiência quando transfectadas com 3 μ g de DNA e 9 μ L de FuGENE[®] 6, semelhante às células HEK293T (dados não mostrados).

Um novo experimento foi realizado para comparar a transfecção de células HeLa e C33 mediante as células HTE e HEK293T (figura 9). Nenhuma linhagem alcançou níveis de expressão de GFP similares à HEK293T, porém, HeLa apresentou expressão três vezes superior à HTE-Ø.

Figura 9: Avaliação da transfecção com GFP. Células transfectadas com pEGFP-N1 utilizando FuGENE[®] 6 ou FuGENE[®] HD. As células foram crescidas em placas de 100 mm de diâmetro. O gráfico da esquerda indica a porcentagem de células/eventos e a porcentagem de células expressando GFP. O gráfico da direita representa a quantidade relativa de GFP em cada amostra (GFP relativo). Barras de erro representam o desvio padrão calculado.

Para finalizar a análise da eficiência de transfecção, as linhagens estudadas foram transfectadas com plasmídeo codificando a proteína E6, etiquetada com HA. Após Western-Blot, podíamos observar que HeLa e C33 eram capazes de expressar a proteína heteróloga, mas não células da linhagem HTE. O protocolo de transfecção de células HTE foi então modificado até que atingíssemos a eficiência desejada. Foi descoberto que é necessário trocar o meio de cultura (KSFM) das

células 6 a 12 horas antes da transfecção para que a expressão heteróloga seja mais eficiente (figura 10). Porém o nível de expressão heteróloga permaneceu aquém dos encontrados em células HEK293T.

Figura 10: Expressão heteróloga em células HTE. 10% do extrato proteico obtido de células HTE-Ø transfectadas com plasmídeos que codificam para IKKε ou MyD88. Membranas incubadas com anticorpos anti-FLAG (etiqueta molecular de IKKε), anti-AU1 (etiqueta molecular de MyD88) e anti-tubulina. **Ctrl(+):** controle positivo, extrato proteico de HEK293T contendo IKKε ou MyD88. **1:** Extratos proteicos de HTE-Ø transfectadas transientemente sem que o meio de cultura tenha sido trocado. **2:** Extratos proteicos de HTE-Ø transfectadas transientemente 12h após o meio de cultura ser trocado.

Ao realizar experimentos de coimunoprecipitação de IKKε e E6 em células HeLa, para compensar a disparidade entre a quantidade de proteínas heterólogas produzidas em HEK293T e HeLa, o experimento em células HeLa foi realizado simultaneamente em cinco placas de cultura (de 100 mm de diâmetro) ao invés de uma só. As cinco placas foram transfectadas igualmente com os devidos plasmídeos e os extratos proteicos foram unidos para compor um extrato único (*"pool"*) com quantidades equivalentes de FLAG-IKKε e HA-16E6 em relação às quantidades de proteínas heterólogas produzidas em HEK293T. A imunoprecipitação se seguiu como descrito anteriormente.

3.10. Imunoensaios

A coimunoprecipitação realizada com Anti-FLAG M2 *Affinity Gel* (Sigma-Aldrich, cat n°A2220) e Anti-HA *Agarose Conjugate* (Sigma-Aldrich, cat n°A2095), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante para a resina Anti-FLAG e foi utilizada para estudar a interação entre a oncoproteína viral E6 de HPV16 e as proteínas humanas IKK ϵ e MyD88, e suas respectivas construções de proteínas truncadas ou mutadas. As proteínas foram eluídas com o tampão de amostra de SDS-PAGE e submetidas à eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e Western-Blot em seguida.

As demais coimunoprecipitações foram feitas com anticorpos não ligados previamente a resinas. Nestes casos, 1 μ g do extrato proteico foi incubado com 50 μ L de Proteína A-Sefarose por 4 horas a 4°C sob leve agitação, num processo de *pre-clear*, para eliminar interações inespecíficas com a Proteína A ou com a resina. As amostras foram centrifugadas a 6000 $\times g$ por 2 minutos a 4°C e o sobrenadante foi reservado. Foram adicionados 3 μ g do anticorpo específico para a proteína alvo ou um anticorpo irrelevante (como controle negativo) e as amostras foram incubadas durante a noite (aproximadamente 16 horas) a 4°C sob leve agitação. Após a incubação com o anticorpo, foram adicionados 30 μ L de Proteína A-Sefarose e as amostras incubadas por mais 4 horas a 4°C sob leve agitação. Depois deste período, as amostras foram centrifugadas a 6000 $\times g$ por 2 min a 4°C e seu sobrenadante foi removido (e reservado para análise; denominado fração não ligada). O precipitado foi lavado duas vezes com TBS (137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,5) e por fim as proteínas ligadas à resina foram eluídas com 20 μ L do tampão de amostra de SDS-PAGE e submetidas à eletroforese em condições desnaturantes, seguida de Western-Blot.

Ensaaios de Western-Blot foram realizados utilizando TBS-Tween 0,1% pH 7,4 para diluição dos anticorpos e nas etapas de bloqueio e lavagem da membrana. Os anticorpos primários utilizados foram: anti-AU1 (BioLegend, cat n° 901903) diluído 1:1000, anti-FLAG (Sigma-Aldrich, cat n° F1804) diluído 1:5000, anti-HA (Sigma-Aldrich, cat n° H6908) diluído 1:4000, anti-IKK ϵ (abcam, cat n° ab7891) diluído 1:1000, anti-MyD88 (abcam, cat n° ab2064) diluído 1:1000, anti-tubulina (Sigma-Aldrich, cat n° T9026) diluído 1:10000 ou anti-E6 de HPV16 (ArborVita, n° de série AVC#1006) diluído 1:1000; a incubação com anticorpos primários foi feita durante a noite (aproximadamente 16 horas) a 4°C, sob constante agitação. Os anticorpos secundários, anti-mouse (Sigma-Aldrich, cat n° A4416) e anti-rabbit (Sigma-Aldrich, cat n° A0545), foram utilizados diluídos 1:5000 e incubados por 2 horas à temperatura ambiente.

As membranas foram analisadas por quimioluminescência no aparelho ImageQuant LAS (GE Healthcare), utilizando os reagentes de detecção *Amersham ECL Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare, cat n° RPN2106). Os sinais foram quantificados usando o software ImageQuant TL (GE Healthcare). Para análises de expressão proteica, até sete experimentos foram utilizados para obter um valor médio de expressão, normalizado pela expressão de tubulina; as médias foram comparadas por Teste t pareado bicaudal.

3.11. Avaliação da expressão de citocinas

A produção de citocinas pelas culturas celulares foi avaliada por dois métodos distintos. Inicialmente, foi realizado um ensaio múltiplo de ELISA avaliando a expressão doze citocinas induzidas por vírus com o kit *Viral-induced Multi-Analyte ELISArray* (Qiagen, cat n° MEH-007A).

Foram utilizadas células HTE-E6 e HTE-Ø, transfectadas com IKK ϵ , MyD88 ou GFP (controle negativo e de transfecção, simultaneamente) 24 horas antes da análise. As células foram tratadas com 5 μ g/mL LPS para ativar as vias de TLR (principalmente TLR4 e TLR3) por 48 horas e o sobrenadante da cultura celular foi coletado para quantificação das citocinas. O sobrenadante coletado foi imediatamente analisado segundo o protocolo do fabricante.

Posteriormente, utilizamos o kit CBA (*Cytokine Bead Array*) Flex Set (BD Biosciences, cat n° 558264), para uma análise quantitativa e personalizada. As citocinas analisadas foram IL-1 β (cat n° 558279), TNF (cat n° 560112), RANTES (cat n° 558324), IP-10 (cat n° 558280), IL-12p70 (cat n° 558283), IL-6 (cat n° 558276), IL-10 (cat n° 558274), IFN- α (cat n° 560379), MCP-1 (cat n° 558287) e IL-8 (cat n° 558277).

Foram utilizadas células HTE-Ø, HTE-E7, HTE-E6 e HTE-E6E7. As células foram tratadas com 5 μ g/mL de LPS por 48 horas ou 25 ng/mL de TNF por 24 horas; foram também utilizadas células não tratadas. O sobrenadante da cultura celular foi coletado e imediatamente analisado segundo o protocolo do fabricante para quantificação das citocinas. O ensaio foi executado no citômetro de fluxo BD FACSCanto II (BD Biosciences) e os resultados foram analisados no software FCAP Array (BD Biosciences). As médias foram analisadas estatisticamente por ANOVA, utilizando o Teste de Bonferroni para comparações múltiplas.

4 RESULTADOS

4.1. Polimorfismo rs5743836 e a história natural da infecção por HPV (Oliveira *et al.*, 2013; Anexo B)

A reação de PCR bidimensional para amplificação de alelos específicos (Bi-PASA) foi padronizada, possibilitando análises claras e reprodutíveis quanto ao conteúdo gênico das amostras estudadas.

Figura 11: Exemplo de resultado da reação de Bi-PASA. M: marcador de peso molecular 100 bp; A, E, H: amostras selvagens; C, D, G: amostras heterozigotas; B, F: amostras mutantes; I: controle negativo.

Para validar os resultados obtidos com Bi-PASA seguido de eletroforese (figura 11), foi feito o sequenciamento de algumas amostras, que confirmaram os resultados previamente obtidos (figura 12).

Figura 12: Sequenciamento de amostras. Amostras com diferentes resultados na PCR Bi-PASA foram submetidos a sequenciamento para confirmação do genótipo encontrado pelo experimento com PCR. A letra destacada indica a posição onde ocorre mutação (-1237). **A, T, G ou C:** bases nucleotídicas; **N:** nucleotídeo duvidoso, que ocorre devido à presença de duas variantes (alelos) na sequência. Os resultados foram todos concordantes.

A genotipagem foi realizada em 1470 espécimes pertencentes à coorte Ludwig-McGill, amplo estudo prospectivo da história natural das infecções por HPV e risco de neoplasia executado nas décadas de 1990 e 2000. Dentre os indivíduos analisados, 894 (60,8%) eram homozigotos selvagem (T/T), 508 (34,5%) eram heterozigotos e 68 (4,6%) eram homozigotos mutante.

O risco cumulativo de infecção por tipos específicos de HPV de acordo com os genótipos de TLR9 está mostrado na tabela 1. Dentre os 500 casos ao menos uma vez positivos para HPV, os seguintes tipos foram os mais comuns: HPV16 (22,8%), HPV53 (15,2%), HPV51 (11,4%) e HPV84 (11,0%). A espécie *Alphapapillomavirus 9* (46,4%) foi a mais comum, seguida pelas espécies *Alphapapillomavirus 3* (27,4%) e *Alphapapillomavirus 7* (26,6%).

A tabela 2 mostra a relação, ajustada por idade, de risco cumulativo de infecção por HPV de acordo com os genótipos de TLR9, comparando as mulheres nas quais o HPV foi detectado (ao menos em uma visita de acompanhamento) em comparação com o grupo controle (mulheres com esfregaços cérvico-uterinos HPV negativos e controlados por outras variáveis como indicado na tabela). Houveram aumentos significativos de risco para HPV tipos 6/11, 35 e 89 com o modelo dominante, no qual os indivíduos com genótipos heterozigoto (TC) e homozigoto mutante (CC) foram comparados contra os indivíduos homozigotos selvagens (TT). Com o modelo recessivo, no qual indivíduos homozigotos mutantes (CC) são comparados contra indivíduos heterozigotos (TC) e homozigotos selvagens (TT), o único resultado significativo foi observado com HPV61. O único tipo cujo risco foi reduzido foi HPV73, observado com precisão suficiente apenas no modelo dominante. A magnitude das associações não mudou muito quando comparado com um grupo controle mais restrito (com acompanhamento maior e consequentemente mais oportunidades de detecção de HPV). Entre as espécies, observou-se que o risco de *Alphapapillomavirus 10* é significativamente maior mediante a presença do alelo mutante (modelo dominante).

Outra maneira de avaliar a o papel do polimorfismo de TLR9 seria verificar se o tempo para eliminação do vírus é influenciado pelo genótipo deste SNP. A tabela 3 mostra a eliminação dos tipos específicos de HPV pelo genótipo de TLR9, de acordo com dois níveis diferentes de estrigência, definição 1: uma visita de acompanhamento na qual não foi detectado HPV (HPV-) após uma visita na qual se detectou HPV (HPV+); definição 2: duas visitas negativas sem detecção do HPV após uma visita na qual o vírus foi detectado. No modelo dominante, o único resultado significativo foi observado usando o nível maior de estrigência para

HPV59. No modelo recessivo, um aumento significativo de eliminação viral foi observado nos dois níveis de estringência para HPV51. Com apenas um evento, HPV56 e HPV58 exibiram uma eliminação maior no modelo recessivo. Não foi observada nenhuma associação significativa entre as espécies de HPV. A eliminação do HPV (de qualquer tipo) e os genótipos de TLR9 estão mostrados na figura 13, não há influência estatisticamente significativa dos genótipos de TLR9.

Figura 13: Eliminação do HPV (de qualquer tipo) e os genótipos de TLR9 (homozigoto selvagem (TT), heterozigoto (TC) ou homozigoto mutante (CC)) na análise Kaplan-Meier.

Tabela 1: Risco acumulado de infecção por tipos específicos de HPV

Genótipo HPV	Positividade em toda coorte (%) (n=2462)	Positividade e entre os casos (%) (n=500)	Positividade por genótipo de TLR9 (%)			
			TT (%) (n=307)	TC (%) (n=165)	CC (%) (n=17)	NA (%) (n=11)
6/11	109 (4,43)	46 (9,2)	22 (7,2)	21 (12,7)	3 (17,7)	0
16	286 (11,6)	114 (22,8)	72 (23,5)	35 (21,2)	5 (29,4)	2 (18,2)
18	90 (3,7)	35 (7,0)	25 (8,1)	10 (6,1)	0	0
26	19 (0,8)	6 (1,2)	2 (0,7)	3 (1,8)	1 (5,9)	0
31	106 (4,3)	37 (7,4)	23 (7,5)	13 (7,9)	0	1 (9,1)
32	10 (0,4)	2 (0,4)	1 (0,3)	1 (0,6)	0	0
33	52 (2,1)	21 (4,2)	10 (3,3)	9 (5,5)	2 (11,8)	0
34	2 (0,1)	0	0	0	0	0
35	82 (3,3)	30 (6,0)	12 (3,9)	16 (9,7)	1 (5,9)	1 (9,1)
39	49 (2,0)	18 (3,6)	10 (3,3)	8 (4,9)	0	0
40	44 (1,8)	20 (4,0)	12 (3,9)	8 (4,9)	0	0
42	32 (1,3)	13 (2,6)	7 (2,3)	6 (3,6)	0	0
44	11 (0,5)	4 (0,8)	2 (0,7)	1 (0,6)	1 (5,9)	0
45	85 (3,5)	34 (6,8)	21 (6,8)	9 (5,5)	3 (17,7)	1 (9,1)
51	161 (6,5)	57 (11,4)	36 (11,7)	17 (10,3)	3 (17,7)	1 (9,1)
52	115 (4,7)	47 (9,4)	30 (9,8)	13 (7,9)	2 (11,8)	2 (18,2)
53	184 (7,5)	76 (15,2)	43 (14,0)	28 (17,0)	1 (5,9)	4 (36,4)
54	76 (3,1)	37 (7,4)	19 (6,2)	17 (10,3)	1 (5,9)	0
55	94 (3,8)	38 (7,6)	19 (6,2)	16 (9,7)	3 (17,7)	0
56	71 (2,9)	27 (5,4)	12 (3,9)	14 (8,5)	1 (5,9)	0
57	6 (0,2)	4 (0,8)	1 (0,3)	3 (1,8)	0	0
58	119 (4,8)	43 (8,6)	29 (9,5)	13 (7,9)	1 (5,9)	0
59	69 (2,8)	26 (5,2)	13 (4,2)	10 (6,1)	1 (5,9)	2 (18,2)
61	65 (2,6)	26 (5,2)	19 (6,2)	3 (1,8)	4 (23,5)	0
62	55 (2,2)	23 (4,6)	11 (3,6)	11 (6,7)	1 (5,9)	0
64	2 (0,1)	1 (0,2)	0	1 (0,6)	0	0
66	64 (2,6)	22 (4,4)	11 (3,6)	9 (5,5)	1 (5,9)	1 (9,1)
67	9 (0,4)	5 (1,0)	5 (1,6)	0	0	0
68	73 (3,0)	27 (5,4)	13 (4,2)	10 (6,1)	3 (17,7)	1 (9,1)
69	6 (0,2)	3 (0,6)	2 (0,7)	1 (0,6)	0	0
70	46 (1,9)	19 (3,8)	12 (3,9)	6 (3,6)	1 (5,9)	0
71	40 (1,6)	18 (3,6)	14 (4,6)	4 (2,4)	0	0
72	17 (0,7)	9 (1,8)	4 (1,3)	4 (2,4)	0	1 (9,1)
73	62 (2,5)	29 (5,8)	23 (7,5)	5 (3,0)	0	1 (9,1)
81	39 (1,6)	20 (4,0)	11 (3,6)	8 (4,9)	1 (5,9)	0
82	17 (0,7)	4 (0,8)	4 (1,3)	0	0	0
83	54 (2,2)	20 (4,0)	11 (3,6)	9 (5,5)	0	0
84	122 (5,0)	55 (11,0)	30 (9,8)	21 (12,7)	3 (17,7)	1 (9,1)
89	25 (1,0)	8 (1,6)	2 (0,7)	5 (3,0)	1 (5,9)	0
Qualquer HPV	1194 (48,5)	489 (97,8)	299 (97,4)	162 (98,2)	17(100)	11 (100)
Espécies de <i>Alphapapillomavirus</i>*						
espécie 3	322 (13,1)	137 (27,4)	80 (26,1)	48 (29,1)	7 (41,2)	2 (18,2)
espécie 5	194 (7,9)	68 (13,6)	42 (13,7)	21 (12,7)	4 (23,5)	1 (9,1)
espécie 6	287 (11,7)	114 (22,8)	62 (20,2)	44 (26,7)	3 (17,7)	5 (45,5)
espécie 7	341 (13,9)	133 (26,6)	76 (24,8)	47 (28,5)	6 (35,3)	4 (36,4)
espécie 9	586 (23,8)	232 (46,4)	143 (46,6)	73 (44,2)	10 (58,8)	6 (54,6)
espécie 10	199 (8,1)	81 (16,2)	41 (13,4)	35 (21,2)	5 (29,4)	0

* Espécie 3 (HPV61,72,62,81,83,84,89); Espécie 5 (HPV82,26,69,51); Espécie 6 (HPV82,26,69,51); Espécie 7 (HPV18,39,45,59,68,70); Espécie 9 (HPV16,31,33,35,52,58,67); Espécie 10 (HPV6,11,44,55)

Tabela 2: Índice de probabilidade (*odds ratio*-OR), ajustada por idade, de risco acumulado de infecção por HPV de acordo com o fenótipo de TLR9

Genótipo HPV	HPV+ contra amostra HPV- qualquer		HPV+ contra indivíduo HPV- com ao menos 10 visitas	
	Modelo dominante ^a OR (95% CI)	Modelo recessivo ^b OR (95% CI)	Modelo dominante ^a OR (95% CI)	Modelo recessivo ^b OR (95% CI)
6/11	1,82 (0,99-3,32)	1,53 (0,44-5,27)	1,88 (1,02-3,44)	1,59 (0,46-5,56)
16	0,88 (0,58-1,34)	1,02 (0,38-2,71)	0,87 (0,57-1,33)	1,05 (0,39-2,84)
18	0,63 (0,30-1,34)	...	0,63 (0,30-1,34)	...
31	0,89 (0,44-1,79)	...	0,92 (0,45-1,86)	...
35	2,38 (1,12-5,06)	0,77 (0,10-5,88)	2,37 (1,11-5,04)	0,79 (0,10-6,06)
45	0,91 (0,44-1,88)	2,26 (0,65-7,89)	0,92 (0,44-1,92)	2,35 (0,67-8,31)
51	0,89 (0,50-1,56)	1,24 (0,36-4,23)	0,89 (0,50-1,57)	1,29 (0,37-4,42)
52	0,79 (0,42-1,51)	1,01 (0,23-4,36)	0,79 (0,42-1,51)	1,03 (0,24-4,53)
53	1,11 (0,68-1,83)	0,29 (0,04-2,17)	1,09 (0,66-1,79)	0,30 (0,04-2,21)
54	1,58 (0,82-3,07)	0,60 (0,08-4,55)	1,55 (0,80-3,01)	0,62 (0,08-4,66)
55	1,56 (0,86-3,20)	1,96 (0,57-6,75)	1,66 (0,86-3,20)	2,03 (0,58-7,05)
56	2,10 (0,97-4,55)	0,85 (0,11-6,47)	2,05 (0,95-4,46)	0,87 (0,11-6,65)
58	0,77 (0,40-1,48)	0,50 (0,07-3,78)	0,76 (0,40-1,47)	0,51 (0,07-3,89)
59	1,37 (0,60-3,10)	0,92 (0,12-7,06)	1,40 (0,61-3,17)	0,95 (0,12-7,33)
61	0,59 (0,24-1,42)	4,43 (1,43-13,72)	0,58 (0,24-1,40)	4,60 (1,48-14,36)
68	1,66 (0,76-3,62)	3,07 (0,87-10,80)	1,63 (0,75-3,58)	3,17 (0,89-11,24)
73	0,34 (0,13-0,91)	...	0,34 (0,13-0,89)	...
84	1,33 (0,76-2,33)	1,34 (0,40-4,54)	1,30 (0,75-2,28)	1,38 (0,40-4,70)
89	4,90 (0,98-24,48)	3,14 (0,37-26,41)	4,96 (0,99-24,78)	3,24 (0,38-27,36)
Qualquer HPV	0,94 (0,70-1,27)	0,63 (0,31-1,27)	0,87 (0,63-1,20)	0,62 (0,29-1,32)
<i>Espécies de Alphapapillomavirus ^c</i>				
espécie 3	1,15 (0,79-1,68)	1,27 (0,54-2,99)	1,12 (0,77-1,65)	1,32 (0,55-3,14)
espécie 7	1,16 (0,78-1,70)	1,08 (0,43-2,68)	1,15 (0,78-1,71)	1,11 (0,44-2,81)
espécie 9	0,92 (0,67-1,27)	1,02 (0,48-2,20)	0,90 (0,65-1,25)	1,06 (0,48-2,34)
espécie 10	1,67 (1,05-2,66)	1,50 (0,56-4,02)	1,69 (1,06-2,71)	1,56 (0,57-4,26)

Associações significativas destacadas em negrito^a Modelo dominante: Homozigoto mutante (CC) +heterozigoto (TC) contra homozigoto selvagem (TT)^b Modelo recessivo: Homozigoto selvagem (TT) + heterozigoto (TC) contra homozigoto mutante (CC)^c Espécie 3 (HPV61,72,62,81,83,84,89); Espécie 7 (HPV18,39,45,59,68,70); Espécie 9 (HPV16,31,33,35,52,58,67); Espécie 10 (HPV6,11,44,55)OR=*odds ratio*; CI=Intervalo de confiança; ...=não aplicável;

Tabela 3: Eliminação tipos específicos de HPV e genótipos de TLR9 usando duas definições de eliminação

Tipo de HPV	Definição 1 ^a				Definição 2 ^a			
	Modelo dominante ^b		Modelo recessivo ^c		Modelo dominante ^b		Modelo recessivo ^c	
	Eventos	RR (95% CI)	Eventos	RR (95% CI)	Eventos	RR (95% CI)	Eventos	RR (95% CI)
6/11	24	1,54 (0,79-2,99)	3	1,46 (0,44-4,81)	20	1,42 (0,72-2,78)	2	3,41 (0,74-15,64)
16	37	1,09 (0,71-1,69)	5	1,27 (0,51-3,19)	36	0,99 (0,63-1,55)	5	1,31 (0,52-3,28)
18	8	1,95 (0,82-4,63)	0	...	5	1,47 (0,52-4,14)	0	...
31	10	0,90 (0,39-2,09)	0	...	8	1,07 (0,44-2,59)	0	...
33	9	0,95 (0,34-2,65)	1	0,55 (0,07-4,41)	8	0,92 (0,32-2,63)	1	0,46 (0,06-3,75)
35	16	0,63 (0,28-1,44)	1	1,37 (0,18-10,52)	14	1,05 (0,41-2,71)	1	5,41 (0,60-48,64)
45	9	0,76 (0,33-1,78)	3	0,62 (0,18-2,11)	8	0,83 (0,34-1,99)	3	0,85 (0,24-2,97)
51	17	0,94 (0,49-1,80)	3	5,26 (1,58-17,53)	15	0,77 (0,38-1,56)	3	6,70 (1,75-25,65)
52	14	1,58 (0,75-3,34)	2	1,68 (0,40-7,16)	13	1,41 (0,69-2,89)	2	2,74 (0,62-12,09)
53	9	0,76 (0,33-1,78)	3	0,62 (0,18-2,11)	24	1,33 (0,76-2,34)	1	0,71 (0,10-5,23)
54	17	1,13 (0,55-2,317)	1	1,12 (0,15-8,45)	16	1,11 (0,53-2,31)	1	1,78 (0,23-13,76)
55	16	1,04 (0,50-2,17)	3	0,72 (0,21-2,40)	12	0,84 (0,34-2,10)	2	0,47 (0,10-2,12)
56	15	1,31 (0,57-3,02)	1	2,09 (0,26-16,54)	14	1,39 (0,58-3,35)	1	10,78 (0,97- 119,70)
58	11	1,30 (1,70-229,99)	1	19,79(1,70-230,0)	11	1,56 (0,66-3,65)	1	8,71 (0,92-82,98)
59	10	0,57 (0,21-1,56)	1	4,97 (0,34-72,82)	8	0,32 (0,10-0,98)	0	...
61	7	0,80 (0,30-2,15)	4	1,17 (0,38-3,60)	6	0,90 (0,32-2,54)	3	0,90 (0,26-3,19)
68	11	1,39 (0,58-3,38)	3	1,21 (0,32-4,57)	9	1,29 (0,49-3,40)	3	1,37 (0,36-5,21)
73	3	2,52 (0,64-9,88)	0	...	3	2,67 (0,70-10,22)	0	...
89	4	...	1	0,47 (0,03-6,42)	3	...	1	...
Qualquer HPV	158	0,98 (0,80-1,20)	16	1,18 (0,71-1,94)	133	0,93 (0,75-1,16)	14	1,30 (0,76-2,22)
<i>Espécies de Alphapapillomavirus ^d</i>								
espécie 3	48	1,11 (0,76-1,63)	7	0,78 (0,36-1,68)	40	0,96 (0,64-1,45)	6	0,85 (0,37-1,96)
espécie 7	44	0,91 (0,62-1,34)	6	0,88 (0,38-2,01)	34	0,80 (0,52-1,23)	5	0,65 (0,26-1,63)
espécie 9	74	0,99 (0,73-1,33)	9	1,29 (0,66-2,52)	69	1,09 (0,80-1,50)	9	1,56 (0,79-3,06)
espécie 10	38	1,37 (0,85-2,21)	5	0,96 (0,39-2,41)	31	1,16 (0,69-1,94)	3	0,72 (0,22-2,38)

Associações significativas destacadas em negrito

^a Definição 1: Uma visita de acompanhamento HPV- após uma HPV+; Definição 2: Duas visitas HPV- após uma HPV+

^b Modelo dominante: Homozigoto mutante (CC) +heterozigoto (TC) contra homozigoto selvagem (TT)

^c Modelo recessivo: Homozigoto selvagem (TT) + heterozigoto (TC) contra homozigoto mutante (CC)

^d Espécie 3 (HPV61,72,62,81,83,84,89); Espécie 7 (HPV18,39,45,59,68,70); Espécie 9 (HPV16,31,33,35,52,58,67); Espécie 10 (HPV6,11,44,55)

RR=Risco relativo; CI=Intervalo de confiança; ...=não aplicável

4.2. Estudo da interação entre E6 de HPV16 e proteínas da Via de Sinalização de Receptores do tipo Toll

4.2.1. Interação entre E6 de HPV16 e proteínas celulares MyD88 e IKK ϵ em células HEK293T

A interação entre as proteínas MyD88 e IKK ϵ com E6 de HPV16 fora observada em nosso grupo. A primeira etapa deste presente estudo foi confirmar se estas interações eram observáveis através dos métodos utilizados no presente trabalho.

Inicialmente foram utilizados os anticorpos que se ligam às proteínas IKK ϵ ou MyD88, ou suas respectivas etiquetas moleculares FLAG e AU1, em ensaios de coimunoprecipitação para estudar a inte

ração com E6; utilizando extratos de células HEK293T expressando heterologicamente as proteínas de interesse. Tais experimentos de coimunoprecipitação utilizando anticorpos não ligados previamente a resinas (de sefarose, agarose ou similares) e resinas acopladas à proteína A ou G não foram satisfatórios (como demonstrado na seção 4.2.3). Para contornar este problema, foram adquiridas resinas de agarose previamente acoplada a um anticorpo anti-FLAG (etiqueta molecular ligada às construções de IKK ϵ) ou anti-HA (etiqueta molecular ligada à E6), para estudarmos as interações analisadas neste projeto.

A interação de E6 e MyD88 foi comprovada através de coimunoprecipitação de proteínas, usando a resina anti-HA. Além de demonstrar que E6 e MyD88 podem interagir entre si, foi observado que esta interação não depende apenas da presença destas proteínas no extrato proteico (figura 14).

Figura 14: Coimunoprecipitação de E6 e MyD88. Extratos proteicos foram submetidos à imunoprecipitação (Filippova *et al.*) com resina anti-HA-agarose e depois revelados em *Western-Blot* (IB) com anti-AU1 ou anti-HA. Acima da membrana, o intervalo entre a transfecção das células e a extração das proteínas.

Apesar da presença constante (e até mesmo em quantidade crescente) das proteínas E6 e MyD88 nos extratos, a interação só foi verificada quando as proteínas foram extraídas 12 horas após a transfecção. Este resultado explica em parte a dificuldade de obtenção de resultados, uma vez que a interação protéica revela-se mais complexa e/ou sensível que inicialmente se imaginava.

A interação de E6 com IKK ϵ também foi confirmada. Na figura 15, podemos observar que E6 foi coimunoprecipitada com IKK ϵ . A presença de E6 na fração eluída comprova que esta interagiu com IKK ϵ e foi imunoprecipitada juntamente com esta. Neste experimento, foram feitos dois tipos de tratamentos que combinam as duas proteínas de interesse num mesmo extrato. Em um deles, duas culturas celulares diferentes foram transfectadas separadamente com IKK ϵ ou E6 e, em seguida, os extratos foram unidos no momento da imunoprecipitação; neste método, diminui-se a quantidade de agente de transfecção aplicado sobre as células. Em outra amostra, em uma única placa de cultura celular, as células HEK293T foram cotransfectadas simultaneamente com IKK ϵ e E6, permitindo a interação entre estas

proteínas desde sua tradução. Observa-se que a cotransfecção é mais eficiente para mostrar a interação entre IKK ϵ e E6.

Figura 15: Coimunoprecipitação de IKK ϵ e E6. Extratos proteicos contendo IKK ϵ e/ou E6 foram submetidos à imunoprecipitação com anticorpo anti-FLAG (ligado a IKK ϵ). As proteínas eluídas da imunoprecipitação (IP) e os extratos brutos (50 μ g de proteína total) foram analisados por Western-Blot com anticorpos anti-HA (ligado a E6), anti-FLAG (ligado a IKK ϵ) e anti-tubulina. **Controle negativo (-):** extrato proteico de células não transfectadas. **IKK ϵ + E6 (banda da esquerda):** duas culturas celulares diferentes foram transfectadas separadamente com IKK ϵ ou E6 e, em seguida, os extratos foram unidos no momento da imunoprecipitação. **IKK ϵ + E6 (banda da direita):** em uma única placa de cultura celular, as células HEK293T foram cotransfectadas simultaneamente com IKK ϵ e E6.

Durante o projeto que estudou as interações de E6 com proteínas na via de TLRs (Ismar R. Haga, FAPESP proc. n° 2008/53012-8), verificou-se também que esta proteína viral não interagia com a proteína humana TBK1 (*TANK-binding kinase 1*), que possui 67% de similaridade com IKK ϵ referente à estrutura primária de seus domínios quinase. Para confirmar a especificidade da interação de E6 com IKK ϵ mediante aos outros membros da família I κ B quinases, um experimento de coimunoprecipitação foi realizado nos mesmos moldes do feito com IKK ϵ . Além de IKK ϵ , as proteínas IKK α , IKK β e TBK1 (também etiquetadas com FLAG) foram expressas em HEK293T juntamente com E6 e a interação entre estas proteínas foi analisada (figura 16). Observamos que E6 foi coimunoprecipitado com IKK ϵ e IKK β , mas não com IKK α ou TBK1.

Figura 16: Coimunoprecipitação de E6 e membros da família IKK. Extratos proteicos contendo uma enzima I κ B quinase e/ou E6 foram submetidos à imunoprecipitação com anticorpo anti-FLAG (ligado às quinases). As proteínas eluídas da imunoprecipitação e os extratos brutos (10% do extrato proteico total) foram analisados por Western-Blot com anticorpo anti- E6 de HPV16 e anti-tubulina.

Na figura 16, a quantidade de E6 purificada juntamente com IKK β foi maior que a purificada com IKK ϵ , esta observação, porém, não foi constante durante as repetições deste experimento, impossibilitando-nos de comparar quantitativamente estas interações. Adicionalmente, nota-se que a concentração de E6 no extrato bruto das amostras contendo IKK β e IKK ϵ é maior que a concentração das demais amostras, apesar do fato que as transfecções foram feitas nas mesmas condições para todas as amostras; tal fenômeno pode ser explicado pelo já citado aumento da estabilidade de E6 na presença de uma proteína que esta possa interagir.

4.2.2. Mapeamento do sítio de interação entre HPV16 e as proteínas MyD88 e IKK ϵ

Para estudar a proteína MyD88, um experimento de mutagênese sítio-dirigida foi realizado tendo-se obtido cinco diferentes proteínas mutantes. Ao invés dos resíduos de aminoácidos LLELL na posição 89 a 93, os mutantes possuem os resíduos de aminoácidos LLELS, AAELL, LLEAA, AAAA ou LLQLL, que lhes identificam neste texto.

As construções apresentaram diferentes níveis de expressão proteica (figura 17). Como foi utilizado anti-AU1 ao invés de anti-MyD88, não há interferência das proteínas endógenas no resultado. A proteína selvagem e quatro das proteínas mutantes (LLELS, AAELL, AAAAA e LLQLL) foram expressas satisfatoriamente; um dos mutantes (LLEAA) não foi expresso de maneira satisfatória.

Figura 17: Western-Blot da proteína selvagem e das proteínas mutantes de MyD88. 50 μ g de extratos proteicos de células HEK293T transfectadas com seis diferentes construções de proteínas MyD88 acopladas com a etiqueta molecular AU1. Membrana incubada com anticorpos anti-AU1 e anti-tubulina. **1:** Proteína MyD88 selvagem; **2:** Proteína MyD88 com sítio mutado para LLELS; **3:** Proteína MyD88 com sítio mutado para AAELL; **4:** Proteína MyD88 com sítio mutado para LLEAA; **5:** Proteína MyD88 com sítio mutado para AAAAA; **6:** Proteína MyD88 com sítio mutado para LLQLL. Abaixo, o controle endógeno realizado com anti-tubulina.

Como discutido anteriormente, uma característica conhecida da interação de E6 com outra proteína, é que esta interação estabiliza a proteína viral. Este fenômeno também foi observado em nossos ensaios com MyD88. Quando plasmídeos que codificam para a proteína E6 são cotransfectados com plasmídeos codificando para MyD88, a concentração de E6 nos extratos proteicos é elevada (figura 18).

Figura 18: Expressão de MyD88 e E6. Células HEK293T foram transfectadas com plasmídeos codificando para MyD88 e/ou E6, como listado na parte superior da figura. Extratos proteicos foram analisados em *Western-Blot* com anti-AU1, anti-HA e anti-tubulina.

Quando cotransfectada com plasmídeos codificando para proteínas mutantes de MyD88 (variantes “AAAAA” e “LLQLL”), a concentração de E6 também é aumentada em relação à amostra na qual transfectou-se o vetor pcDNA3 vazio juntamente com o plasmídeo contendo o gene de E6 (figura 19). Mesmo a proteína MyD88 AAAAA, cuja concentração no extrato proteico apresentou-se notavelmente menor que MyD88 selvagem e MyD88 LLQLL, foi capaz de aumentar a concentração de E6 em seu extrato. Estes resultados indicam que a interação de MyD88 com E6 (e consequente estabilização desta) não dependa do sítio LxxLL de MyD88.

Figura 19: Expressão de MyD88 e E6. Células HEK293T foram transfectadas com plasmídeos codificando para E6 juntamente com MyD88 (*wild-type* ou mutada) ou pcDNA3 vazio, como listado na parte superior da figura. Extratos proteicos foram analisados em *Western-Blot* com anti-AU1, anti-HA e anti-tubulina. Acima da membrana mostrando a proteína E6, a quantificação da oncoproteína (normalizada por tubulina) em comparação à média de expressão dos extratos de células transfectadas com pcDNA3 vazio.

As construções feitas para o estudo da interação entre E6 e IKK ϵ foram obtidas com sucesso (figura 20). Cinco destas construções tiveram sua expressão confirmada em células humanas por meio de transfecção transiente (figura 21). As construções que contêm a extremidade N-terminal (denominadas 1-1, 1-2, 1-3 e 1-4) foram detectadas com o anticorpo anti-FLAG, ao contrário das construções que não contêm o N-terminal de IKK ϵ (denominadas 2-3 e 2-4). O anticorpo anti-IKK ϵ interage com a extremidade C-terminal a proteína, sendo capaz de detectar as construções 1-4 e 2-4; através disto pudemos detectar a proteína truncada 2-4 de maneira mais eficiente. As construções 2-3 e 2-4 foram detectadas pelo anticorpo anti-FLAG apenas em experimentos de imunoprecipitação (figura 22), porém a intensidade dos sinais é consideravelmente mais baixa do que para as construções 1-1, 1-2, 1-3 e 1-4.

Figura 20: Amplificação de fragmentos da região codificante de IKK ϵ . **M1:** marcador de peso molecular 100 bp; **A:** amplificação do 1º ao 480º nucleotídeo; **B:** amplificação do 1º ao 945º nucleotídeo; **C:** amplificação do 1º ao 1707º nucleotídeo; **D:** amplificação do 1º ao 2151º nucleotídeo (região codificante completa); **E:** amplificação do 945º ao 1707º nucleotídeo; **F:** amplificação do 945º ao 2151º nucleotídeo; **G:** controle negativo; **M2:** marcador de peso molecular High Mass.

Figura 21: Western-Blot das proteínas truncadas de IKK ϵ . 50 μ g de extratos proteicos de células HEK293T transfectadas com seis diferentes construções de proteínas IKK ϵ truncadas, acopladas com a etiqueta molecular FLAG. Membrana incubada com anticorpos anti-IKK ϵ , anti-FLAG e anti-tubulina. **1-1**: Proteína codificada pelos nucleotídeos 1 a 480 (revelada com anti-FLAG); **1-2**: Proteína codificada pelos nucleotídeos 1 a 945 (domínio quinase; revelada com anti-FLAG); **1-3**: Proteína codificada pelos nucleotídeos 1 a 1707 (revelada com anti-FLAG); **1-4**: Proteína codificada pelos nucleotídeos 1 a 2151 (proteína inteira; revelada com anti-FLAG); **2-3**: Proteína codificada pelos nucleotídeos 946 a 1707 (não detectada); **2-4**: Proteína codificada pelos nucleotídeos 946 a 2151 (porção C-terminal; revelada com anti-IKK ϵ). Abaixo, o controle endógeno realizado com anti-tubulina. **MW**: peso molecular, em kDa.

As construções aminoterminais (1-1, 1-2, 1-3) e a proteína inteira (1-4) mostraram interação com a proteína E6 através de experimentos de coimunoprecipitação proteica (figura 22). Considerando a sobreposição das construções, podemos supor que a interação ocorre entre os aminoácidos 1 e 160 da proteína selvagem, que constitui a construção 1-1 e está presente nas quatro variantes que apresentaram interação com E6. Nos extratos contendo a proteína heteróloga E6, mas não as proteínas heterólogas IKK ϵ , E6 não foi precipitada a proteína viral, indicando que esta não se liga diretamente à resina ou ao anti-FLAG e só é imunoprecipitada na presença de IKK ϵ selvagem, ou alguma das construções que contêm a extremidade aminoterminal.

Figura 22: Coimunoprecipitação de IKKε e E6. Extratos proteicos contendo IKKε e/ou E6 foram submetidos à imunoprecipitação com anticorpo anti-FLAG (ligado a IKKε). As proteínas do extrato bruto ou eluídas na imunoprecipitação (Filippova *et al.*) foram analisadas por Western-Blot (WB) com os anticorpos designados. **1-1**: Proteína codificada pelos nucleotídeos 1 a 480 (revelada com anti-FLAG); **1-2**: Proteína codificada pelos nucleotídeos 1 a 945 (domínio quinase; revelada com anti-FLAG); **1-3**: Proteína codificada pelos nucleotídeos 1 a 1707 (revelada com anti-FLAG); **1-4**: Proteína codificada pelos nucleotídeos 1 a 2151 (proteína inteira; revelada com anti-FLAG); **2-3**: Proteína codificada pelos nucleotídeos 946 a 1707 (não detectada); **2-4**: Proteína codificada pelos nucleotídeos 946 a 2151 (porção C-terminal; revelada com anti-IKKε).

A construção 1-3 apresentou uma interação menos eficiente com E6 do que as construções 1-1, 1-2 e 1-4. Isto pode ser explicado pelo fato da construção 1-4 corresponder à proteína integral e a construção 1-2 corresponder exatamente ao domínio quinase da enzima. Estes dois polipeptídeos gerados têm enovelamento e funcionamento intactos, enquanto que o polipeptídeo gerado pela construção 1-3 pode sofrer mal dobramento, prejudicando a interação com E6. O polipeptídeo gerado pela construção 1-1 apresentou um nível de interação com E6 similar à proteína IKKε integral, indicando que, apesar de não corresponder exatamente a um domínio ou uma proteína já existente, seu enovelamento proteico foi supostamente correto e E6 pôde interagir normalmente.

Se por um lado pudemos observar a interação de E6 com a extremidade N-terminal de IKK ϵ , não podemos descartar sua interação com regiões carboxiterminais desta. Como citado acima, o anticorpo anti-FLAG não foi capaz de se ligar satisfatoriamente as construções 2-3 e 2-4. Isto é comprovado pela quantidade de proteínas capturada pela imunoprecipitação (figura 22). Após imunoprecipitação com anti-FLAG, as construções 1-1, 1-2, 1-3 e 1-4 encontram-se em altíssima concentração no extrato eluído, as construções 2-3 e 2-4, porém, são fracamente detectáveis após o processo, demonstrando que, apesar de presentes, estas proteínas truncadas não interagem relativamente tão bem com este anticorpo. Por este motivo, não podemos desconsiderar a interação entre as proteínas, pois o resultado negativo pode ser consequência da baixa afinidade da resina anti-FLAG com as proteínas truncadas.

Para a proteína truncada 2-4 de IKK ϵ , que corresponde à proteína desprovida do domínio quinase (e alguns poucos resíduos de aminoácidos na extremidade aminoterminal), foram feitos ensaios de coimunoprecipitação utilizando o anticorpo anti-IKK ϵ . Estes ensaios não foram satisfatórios em nenhuma amostra. Os protocolos tentados não foram capazes de demonstrar nenhuma interação entre E6 e seus possíveis ligantes. Não se obteve sucesso nem mesmo utilizando a proteína IKK ϵ integral (construção 1-4) e E6, uma interação já comprovada com experimentos utilizando a resina anti-FLAG. Podemos concluir que os métodos que utilizaram anticorpos não ligados previamente a resinas não foram eficazes para detectar a interação entre estas proteínas, apesar de grande esforço por parte de nosso grupo e numerosas tentativas de otimização da técnica.

A resina Anti-HA Agarose Conjugate, utilizada para estudar a interação entre MyD88 e E6, não foi eficaz para o estudo da interação entre E6 e IKK ϵ , uma vez que

nem mesmo a proteína inteira (IKK ϵ 1-4) pôde se ligar ao complexo E6:anti-HA agarose (dados não mostrados).

4.2.3. Estudo da interação protéica em queratinócitos

As culturas celulares HEK293T foram transfectadas com sucesso e nestas linhagens foram realizados os ensaios de interação proteica entre a proteína viral E6 e proteínas humanas da via de TLRs. Entretanto, células HEK293T não são os alvos naturais da infecção pelo HPV; por isso, desde o princípio houve a preocupação em reproduzir os resultados observados em HEK293T para queratinócitos humanos. Experimentos de coimunoprecipitação de IKK ϵ e E6 foram então realizados em células HeLa (figura 23). Podemos observar que IKK ϵ e E6 foram expressas heterologicamente nos queratinócitos (HeLa) e que os extratos contêm concentrações expressivas destas proteínas. Entretanto, a concentração de E6 recuperada juntamente com IKK ϵ foi substancialmente menor em HeLa do que em células HEK293T. As razões para a discrepância entre a quantidade de E6 imunoprecipitada em HeLa e HEK293T não pôde ser explicada.

Figura 23: Coimunoprecipitação em células HeLa. Extratos proteicos contendo FLAG-IKK ϵ e/ou HA-E6 foram submetidos à imunoprecipitação com anticorpo anti-FLAG. As proteínas eluídas da imunoprecipitação e o extrato bruto (10% do extrato proteico total) foram analisados por Western-Blot com anticorpos anti-FLAG, anti-HA e anti-tubulina.

A coimunoprecipitação também foi tentada em extratos proteicos de células CaSki, que expressam constitutivamente E6 de HPV16, como método alternativo para verificar as interações proteicas em queratinócitos e, adicionalmente, verificá-las sem recorrer à superexpressão heteróloga das proteínas de interesse. Os resultados iniciais foram animadores, porém foram mais tarde identificados como falsos positivos. As proteínas E6 expressas em CaSki foram capazes de interagir diretamente com a resina de sefarose acoplada à proteína A ou proteína G, tornando o experimento inconclusivo (figura 24). Desta forma, ao serem coimunoprecipitadas utilizando o anticorpo anti-MyD88 (neste caso), não é possível distinguir se a proteína E6 capturada interagiu com MyD88 ou diretamente com a resina.

Figura 24: Coimunoprecipitação de E6, utilizando anti-MyD88. Extratos proteicos de células CaSki foram submetidas a diferentes tipos de imunoprecipitação. **Ctrl**- controle positivo, proteína heteróloga E6 com etiqueta N-terminal HA; **1**- Coimunoprecipitação feita com anti-MyD88 e proteína-A-sefarose, sem realização de *pre-clear*; **2**- Coimunoprecipitação feita com anti-MyD88 e proteína-A-sefarose; **3**- Coimunoprecipitação feita com anti-MyD88 e proteína-G-sefarose; **4**- Coimunoprecipitação feita com anti-FLAG e proteína-A-sefarose; **5**- Coimunoprecipitação feita com anti-FLAG e proteína-G-sefarose; **6**- Extrato bruto; **7**- Coimunoprecipitação feita com proteína-A-sefarose apenas; **8**- Coimunoprecipitação feita com proteína-G-sefarose apenas. Membrana incubada com anti-E6.

A coimunoprecipitação de E6 é drasticamente diminuída pela realização de um *pre-clear* (figura 24, amostras 1 e 2), mostrando que esta oncoproteína se liga diretamente a resina proteína-A-sefarose. Quando se realizou um *pre-clear* (amostras 2 a 5), podemos observar que a utilização do anti-MyD88 enriqueceu a amostra com E6 quando comparado às amostras que utilizaram anti-FLAG (anticorpo inespecífico), especialmente comparando os extratos que utilizam proteína A (amostras 2 e 4). Isto é coerente com a capacidade de MyD88 interagir

com E6, mas mediante a capacidade de E6 também interagir diretamente com as resinas utilizadas, como evidenciado nas amostras 7 e 8, não pudemos comprovar a interação entre MyD88 e E6 em condições próximas às naturais (extratos desprovidos de proteínas superexpressas).

4.3. Consequências da presença de oncoproteínas virais sobre efetores da resposta antiviral

4.3.1. Análise da expressão de MyD88 e IKK ϵ mediante à presença de oncoproteínas do HPV

A primeira forma de interferência exercida pelas oncoproteínas virais sobre a via de TLR estudada foi a concentração endógena das MyD88 e IKK ϵ em extratos proteicos de diversas linhagens celulares de queratinócitos (figuras 25, 26 e 27).

Foi possível confirmar a presença tanto de IKK ϵ quanto de MyD88 em quantidades mensuráveis em vários extratos. Células HEK293 e HEK293T também foram analisadas e apresentaram expressão endógena de MyD88 e IKK ϵ em níveis indetectáveis (dados não mostrados). Não pudemos observar grandes diferenças na expressão de IKK ϵ ou MyD88 devido à presença das oncoproteínas E6 e E7 de HPV16, indicando que a simples presença destas não é suficiente para alterar a concentração intracelular de IKK ϵ ou MyD88 (figuras 26 e 27).

Figura 25: Expressão endógena de IKK ϵ e MyD88. Extratos proteicos de 100 μ g foram submetidos à eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e depois revelados em Western-Blot com anti-IKK ϵ , anti-MyD88, anti-E6 e anti-tubulina (controle). Acima da membrana, as linhagens celulares que originaram cada extrato, descritas na seção Material e Métodos.

Figura 26: Quantificação da expressão endógena de MyD88. Experimentos de *Western-Blot* foram analisados quanto à concentração relativa da proteína MyD88, comparando a intensidade do sinal captado pelo aparato de revelação de membranas de *Western-Blot*. O valor da intensidade do sinal foi normalizado pelo valor da amostra HTE-Ø e a média dos valores obtidos estão representadas no gráfico. Barras representam a média de sete experimentos $\pm$ desvio padrão calculado. * p-valor < 0,05 comparado à média de HTE-Ø.

Figura 27: Quantificação da expressão endógena de IKKε. Experimentos de *Western-Blot* foram analisados quanto à concentração relativa da proteína IKKε, comparando a intensidade do sinal captado pelo aparato de revelação de membranas de *Western-Blot*. O valor da intensidade do sinal foi normalizado pelo valor da amostra HTE-Ø e a média dos valores obtidos estão representadas no gráfico. Barras representam a média de sete experimentos $\pm$ desvio padrão calculado. * p-valor < 0,05 comparado à média de HTE-Ø.

Tal fato é mais evidente quando analisamos os extratos provenientes de células HTE, que diferem entre si apenas pela presença da região codificadora das

oncoproteínas E6 e/ou E7 de HPV16. Outras linhagens celulares divergem quanto à concentração de IKK ϵ ou MyD88, porém sem relação direta com presença do HPV ou o tipo de HPV presente. Estes resultados demonstram que as oncoproteínas de HPV não alteram significativamente a concentração das proteínas IKK ϵ ou MyD88 na célula.

4.3.2. Ação das oncoproteínas sobre a ativação de transfatores de resposta à infecção

Sendo os principais fatores de transcrição da resposta mediada por Receptores do tipo *Toll*, NF- κ B e IRF3 foram analisados quanto a sua presença no extrato nuclear das células, diante da expressão de E6. A figura 28 mostra a concentração destes transfatores no extrato nuclear das células HTE expressando E6 estavelmente e/ou transientemente.

Tanto IRF3 quanto NF- κ B (p65 e p50) têm sua concentração aumentada na presença de E6, seja de forma estável (figura 28, coluna B) ou transiente (coluna C); em células que expressam E6 tanto estavelmente quanto transientemente (coluna D) a concentração destes transfatores no núcleo é ainda maior. Interessantemente, a proteína p105, forma inativa de uma sub-unidade de NF- κ B, também teve sua concentração aumentada na presença de E6, entretanto, a razão entre a forma ativa (p50) e inativa (p105) variou de maneira não-linear entre as amostras. Especula-se que a presença de E6 cause o aumento da concentração de uma das formas (p50 ou p105) no núcleo e a célula responda a este fenômeno deslocando também a outra forma para o núcleo.

Figura 28: Western-Blot de extratos nucleares de células HTE. 100 µg de extrato proteico de células HTE foi analisado com anticorpos anti-IRF3, anti-p65, anti-p50/p105, anti-H3 e anti-tubulina. Os números acima das imagens representam a quantificação da banda, normalizada por H3 e comparada à amostra da coluna A. **A:** Extrato nuclear de HTE-Ø transfectada com pcDNA3 vazio; **B:** Extrato nuclear de HTE-Ø transfectada com plasmídeo que codifica para E6; **C:** Extrato nuclear de HTE-E6 transfectada com pcDNA3 vazio; **D:** Extrato nuclear de HTE-E6 transfectada com plasmídeo que codifica para E6; **E:** extrato proteico total de HEK293T (controle positivo).

4.3.3. Ação das oncoproteínas de HPV16 sobre a produção de citocinas

Para avaliar as consequências biológicas da interferência de E6 de HPV16 sobre a resposta imune inata, foi realizado um ensaio múltiplo de ELISA avaliando a expressão de doze citocinas induzidas por vírus com o kit *Viral-induced Multi-Analyte ELISArray* (figura suplementar S1).

Foram utilizadas células HTE transduzidas com E6 de HPV16 (HTE-E6) ou o vetor vazio (HTE-Ø), transfectadas com IKKε, MyD88 ou GFP (controle negativo e de eficiência de transfecção, simultaneamente). Neste experimento, poucas citocinas foram afetadas pela transfecção de IKKε e MyD88, porém várias apresentaram expressão diferenciada entre células que expressam E6 (HTE-E6) e aquelas que não expressam-na (HTE-Ø). Dentre as citocinas alteradas, algumas já

descritas na literatura como afetadas por E6 HPV16 (IL-6, IL-8), mostrando que as células HTE constituem um bom sistema para analisar a influência das oncoproteínas na concentração de citocinas exportadas.

Para uma análise quantitativa de expressão de citocinas, foi utilizado o kit *CBA Flex Set* para analisar IL-1 β , TNF, RANTES, IP-10, IL-12p70, IL-6, IL-10, IFN- α , MCP-1 e IL-8. Destas, as citocinas MCP-1, RANTES e IL-12p70 não foram detectadas em concentrações mensuráveis nos ensaios, dentre as amostras com células HTE; estas três citocinas foram detectadas em amostras provenientes de células sanguíneas periféricas mononucleares, usadas como controle nos primeiros experimentos (dados não mostrados).

A citocina IL-8 tem expressão sempre maior em células contendo E7 de HPV16 quando comparado com a célula sem oncoproteínas (figura 25). Em células HTE-E6 e HTE-E6E7, a concentração desta citocina no meio variou inconstantemente em relação à HTE- $\emptyset$ e HTE-E7; em alguns experimentos a concentração de IL-8 era maior em linhagens contendo E6 de HPV16, em outros experimentos, era menor. Tratamentos com LPS, TNF (figura 29, tabela S1) ou ODN (figura 30, tabela S2) aumentam a expressão de IL-8 em relação à cultura não tratada.

Figura 29: Concentração de IL-8 em células HTE mediante o tratamento com TNF e LPS. O sobrenadante de células cultivadas (em placas de 60 mm de diâmetro) foi analisado por CBA quanto à concentração da citocina. Abaixo do gráfico, a linhagem celular e o tratamento utilizado. Barras de erro representam desvio padrão. **no-** células não-tratadas; **TNF-** células tratadas com 25 ng/mL TNF por 24 horas; **LPS-** células tratadas com 5 µg/mL LPS por 48h. Barras representam a média obtida ± o erro padrão da média (SEM).

Figura 30: Concentração de IL-8 em células HTE mediante o tratamento com LPS e ODN. O sobrenadante das amostras (células cultivadas em placas de 12 poços) foi analisado por CBA quanto à concentração da citocina. **neg-** células não-tratadas; **LPS-** células tratadas com 5 µg/mL LPS por 24h; **ODN2216, ODN2006, ODN2315-** células tratadas com 1µM do respectivo ODN por 24h. Barras representam a média obtida ± SEM.

Em células HTE-E6 transfectadas transientemente, a expressão transiente de IKK α e IKK β aumentou a concentração de IL-8, enquanto que IKK ϵ , tanto a forma selvagem, quanto a porção aminoterminal (aa 1-160; vide figura 6), e TBK1 tiveram o efeito contrário quando comparadas às células transfectadas com o vetor vazio (figura 31, tabela S3).

Figura 31: Concentração de IL-8 em células HTE mediante expressão heteróloga de componentes da via de TLR. O sobrenadante das amostras (células cultivadas em placas de 12 poços) foi analisado por CBA quanto à concentração da citocina. Abaixo do gráfico, o tratamento empregado na cultura designada. **Não transfect**- células não-transfectadas; **pcDNA3**- plasmídeos no qual as construções foram clonadas (controle negativo), transfectado com reagente FuGENE[®] HD; **MyD88**, **IKK α** , **IKK β** , **IKK ϵ** , **TBK1**, **IKK ϵ Nterm (aa 1-160)**- proteínas expressas heterologicamente nas células através de transfecção transiente com reagente FuGENE[®] HD. Barras representam a média obtida $\pm$ SEM.

A expressão de TNF foi induzida por LPS, sem grandes alterações devido à presença de E6, assim como observado no ensaio de ELISA. Em células HTE-E7, a indução por LPS foi muito superior, mas isto não mais se observa em células HTE-E6E7 (figura 32, tabela S1).

Figura 32: Concentração de TNF em células HTE mediante o tratamento com LPS. O sobrenadante de células cultivadas (em placas de 60 mm de diâmetro) foi analisado por CBA quanto à concentração da citocina. Abaixo do gráfico, a linhagem celular e o tratamento utilizado. Barras de erro representam desvio padrão. **no-** células não-tratadas; **LPS-** células tratadas com 5 µg/mL LPS por 48h. Barras representam a média obtida ± SEM.

A concentração de IL-6 também é afetada por E7 e E6 nas células tratadas com TNF ou LPS e células não tratadas; novamente, a influência de E6 se sobrepõe à exercida por E7 e a linhagem contendo ambas as oncoproteínas apresenta resultado similar àquela contendo apenas E6. Quando as células expressam apenas a oncoproteína E7, a concentração de IL-6 no sobrenadante é geralmente reduzida. A presença de E6 induz significativamente a liberação de IL-6 pelas células, independentemente de E7 (figura 33, tabela S1). Tratamento com LPS, TNF, ODNs ou transfecção de plasmídeos também induz a expressão de IL-6 pelas células HTE (figura 34, tabela S2).

Figura 33: Concentração de IL-6 em células HTE mediante o tratamento com TNF e LPS. O sobrenadante de células cultivadas (em placas de 60 mm de diâmetro) foi analisado por CBA quanto à concentração da citocina. Abaixo do gráfico, a linhagem celular e o tratamento utilizado. Barras de erro representam desvio padrão. **no-** células não-tratadas; **TNF-** células tratadas com 25 ng/mL TNF por 24 horas; **LPS-** células tratadas com 5 µg/mL LPS por 48h. Barras representam a média obtida ± SEM.

Figura 34: Concentração de IL-6 em células HTE mediante o tratamento com LPS e ODN. O sobrenadante das amostras (células cultivadas em placas de 12 poços) foi analisado por CBA quanto à concentração da citocina. **neg-** células não-tratadas; **LPS-** células tratadas com 5 µg/mL LPS por 24h; **ODN2216, ODN2006, ODN2315-** células tratadas com 1µM do respectivo ODN por 24h. Barras representam a média obtida ± SEM.

A expressão heteróloga de IKK α , IKK β , IKK ϵ ou TBK1 aumentou a concentração de IL-6, mas a expressão de MyD88 e especialmente IKK ϵ aminoterminal diminuiu sua concentração em culturas HTE-E6 (figura 35, tabela S3).

Figura 35: Concentração de IL-6 em células HTE mediante expressão heteróloga de componentes da via de TLR. O sobrenadante das amostras (células cultivadas em placas de 12 poços) foi analisado por CBA quanto à concentração da citocina. Abaixo do gráfico, o tratamento empregado na cultura designada. **Não transfet**- células não-transfectadas; **pcDNA3**- plasmídeos no qual as construções foram clonadas (controle negativo), transfectado com reagente FuGENE[®] HD; **MyD88, IKK α , IKK β , IKK ϵ , TBK1, IKK ϵ Nterm (aa 1-160)**- proteínas expressas heterologicamente nas células através de transfecção transiente com reagente FuGENE[®] HD. Barras representam a média obtida $\pm$ SEM.

5 DISCUSSÃO

Duas possibilidades são admissíveis quando referentes à ação de E6 sobre o sistema imune: (i) inibição da resposta, buscando a evasão do sistema imune, para estabelecimento da infecção e (ii) ativação da resposta, buscando a eliminação da forma episomal do vírus, para a progressão da carcinogênese. Ademais, estas ações não são mutuamente exclusivas. Este projeto, em conjunto com outros trabalhos já citados de nosso grupo de pesquisa, estudou a ação das oncoproteínas especificamente na via de sinalização de TLRs, componente da resposta imune inata.

A primeira investigação realizada neste projeto utilizou-se de um bem-sucedido estudo de coorte coordenado por nosso grupo de pesquisa. Sendo um vírus de DNA dupla fita, especula-se que o TLR9 seja o responsável, dentre os TLRs, pela detecção do vírus intracelularmente (Krieg, 2006). Tal suspeita tornou-se ainda mais aceita após a publicação de Hasan *et al.* (2007), demonstrando que as oncoproteínas virais inibiam a expressão deste receptor nas células; ação que foi caracterizada molecularmente seis anos depois (Hasan *et al.*, 2013). Portanto, um polimorfismo na região promotora de *TLR9*, com capacidade de alterar a expressão deste gene (Ng *et al.*, 2010), poderia influenciar a história natural da infecção por HPV e neoplasias cervicais.

Analizamos o papel do polimorfismo rs5743836, na região promotora do gene *TLR9* (T-1237C), e sua associação com o risco de aquisição e eliminação de infecções tipo-específicas por HPV, usando uma estratégia de amostragem caso-controle com amostras pertencentes à coorte Ludwig-McGill. O genótipo de TLR9 mais comum foi TT (homozigoto selvagem), seguido por TC (heterozigoto) e CC

(homozigoto selvagem). Não encontramos evidências substanciais referentes ao risco de infecção por HPV ou eliminação do vírus entre os diferentes genótipos, seja pelo tipo ou pela espécie de HPV (tabelas 1, 2 e 3). A baixa prevalência de alguns tipos em nossa população e a raridade de genótipos CC impediram uma avaliação mais robusta.

A frequência do alelo mutante na população foi de 22%. Estes números revelam que esta população se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg, o que demonstra que não há grande vantagem seletiva em um dos genótipos e a proporção destes indivíduos na população se mantém constante. Em outros estudos, foi encontrada uma frequência de 14% em norte-americanos caucasianos, 25% em afro-americanos, 4% em hispânicos, 19,4% em portugueses e 0,03% em asiáticos (Lazarus *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2007; Ng *et al.*, 2010). A frequência deste SNP nos indivíduos aqui analisados é similar às encontradas em estudos com descendentes de africanos e portugueses, povos que contribuíram significativamente na genética da população brasileira, como se sabe historicamente.

A influência não significativa do polimorfismo em infecções por HPV de tipos prevalentes em casos de carcinoma cervical (especialmente HPV16 e 18) poderia ser interpretada pelos resultados de Hasan *et al.* (2007). A ação das oncoproteínas virais sobre a transcrição de TLR9 é de tal magnitude que o polimorfismo na região promotora pouco influencia na transcrição deste gene; porém, tipos menos oncogênicos não suprimem tanto a transcrição de TLR9, possibilitando alguma influência do polimorfismo sobre a progressão da doença (Oliveira *et al.*, 2013).

Entretanto, há inúmeros polimorfismos nos genes que codificam para os TLRs e alguns destes demonstraram influenciar a história natural da infecção por HPV (Pandey *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2012; Roszak *et al.*, 2012). O polimorfismo

rs5743836, particularmente, demonstrou efeito diferencial em grupos étnicos distintos. Em norte-americanos de descendência européia, este polimorfismo apresentou risco elevado para asma nas pessoas que possuem o alelo mutante (C); entretanto, não houveram diferenças significativas em norte-americanos de descendência africana (Lazarus *et al.*, 2003). Em nossas análises, ao analisarmos separadamente mulheres de grupos étnicos específicos, os resultados por nós obtidos não se alteraram (dados não mostrados).

O próximo passo foi caracterizar interações proteicas descobertas previamente por nosso grupo de pesquisa. A primeira proteína analisada foi MyD88, que possui grande importância na via de TLR por participar da primeira etapa de sinalização de todos os TLRs humanos, exceto TLR3 e TLR4 nos endossomos (O'Neill *et al.*, 2013). Ao analisarmos a sequência primária da proteína MyD88, pudemos notar que esta possui em sua estrutura primária uma pequena sequência de cinco aminoácidos LLELL (leucina, leucina, ácido glutâmico, leucina, leucina). Sítios na estrutura primária compostos por cinco resíduos de aminoácidos LxxLL (sendo “x” um aminoácido qualquer), contendo um aminoácido negativamente carregado na terceira posição, são motivos comuns de interação com a proteína E6 de HPV16 (Zanier *et al.*, 2013). Dentre as proteínas que interagem com E6 através deste motivo está UBE3A, também conhecida como Proteína Associada à E6 (E6AP), que participa diretamente da ação mais conhecida de E6, a ubiquitinação de p53 (que resulta na degradação deste supressor de tumor). Portanto, grande parte da importância que E6 tem no processo de carcinogênese depende de sua interação com o motivo LxxLL (Huibregtse *et al.*, 1993; Brimer *et al.*, 2007).

A interação entre MyD88 e E6 foi confirmada em células HEK293T. As análises com o sítio de interação não foram bem-sucedidas, mas conseguimos

evidências indiretas de que a ligação não ocorre nesta região da proteína MyD88; quando expressa heterologicamente em células superexpressando MyD88, a concentração de E6 no extrato proteico é muito superior à observada em células que não superexpressam MyD88 (figura 18). Tal efeito é observado tanto para a forma selvagem da proteína, como para os mutantes construídos (figura 19). É sabido que a estabilidade de E6 é favorecida pela interação com outra proteína (Tomaic *et al.*, 2009; Ansari *et al.*, 2012); portanto, a estabilização de E6 devido à presença de MyD88 mutante indica que a interação ocorre de maneira independente ao sítio LLELL de MyD88.

A interação observada foi tempo-dependente, sendo perdida com o passar do tempo. Apesar da presença constante (e até mesmo em quantidade crescente) das proteínas E6 e MyD88 nos extratos, a interação só foi verificada quando as proteínas foram extraídas 12 horas após a transfecção (figura 14). Este resultado explica em parte a dificuldade de obtenção de resultados, uma vez que a interação protéica revela-se mais complexa e/ou sensível que inicialmente se imaginava. A interação entre MyD88 e E6 talvez dependa de fatores que não tenham presença constante na célula HEK293T; também é possível que existam inibidores desta interação, que impediram a coimunoprecipitação nas amostras coletadas 24 h e 36 h após transfecção; uma terceira explicação seria a alteração da interação proteica mediante modificações pós-traducionais das proteínas envolvidas, por exemplo, é sabido que MyD88 pode ser fosforilada (Zhou *et al.*, 2013).

Diferente de MyD88, IKK ϵ participa de uma etapa mais posterior na via de TLRs, ativando os transfatores NF- κ B e IRF3. Notavelmente, E6 interage de maneira seletiva com membros da família I κ B quinase, sendo capaz de interagir com IKK ϵ e IKK β , mas não com IKK α e TBK1, apesar da alta similaridade entre estas enzimas,

especialmente na região do domínio enzimático, onde verificamos que a interação com IKK ϵ ocorre (figura 16). TBK1 possui 67% de similaridade com IKK ϵ referente à estrutura primária (Verhelst *et al.*, 2013). Mediante o grande número de interações conhecidas de E6 com proteínas celulares, muito se discute quanto ao significado das interações (White *et al.*, 2012); a especificidade da interação é um forte indício de que esta interação proteica possui uma justificativa biológica para existir.

Como mencionado, verificamos que o sítio de interação de IKK ϵ com E6 de HPV16 encontra-se nos primeiros 160 aminoácidos da enzima (figura 22). A interação de E6 na região aminoterminal de IKK ϵ é um fato muito interessante, pois nesta região está localizado o sítio catalítico de quinase e o sítio de ligação ao substrato ATP (UniProt: a hub for protein information, 2014). E6 pode exercer influência significativa na atividade de NF- κ B e IRFs, que são ativados por IKK ϵ , através desta interação.

A influência de E6 nestes transfatores já é notória; sabe-se que esta proteína viral é capaz de interagir com IRF3 e impedir a transativação de seus genes alvos (Ronco *et al.*, 1998). A atividade catalítica não foi reverificada nesta tese, mas estudamos a ativação do transfator IRF3, modulado através de sua localização subcelular (Iwamura *et al.*, 2001), e verificamos que a presença de E6 aumenta a concentração deste em extratos nucleares (figura 28). Conhecendo o impedimento da ativação de IRF3 causado por E6 de HPV16, o aumento da concentração deste transfator no núcleo é provavelmente uma tentativa da célula de responder a este embargo.

O fator NF- κ B (formas ativas p65 e p50) também teve sua concentração nuclear aumentada mediante a presença de E6 de HPV16; por outro lado, a unidade p105, inibidor da atividade transativadora de NF- κ B (Ghosh & Karin, 2002) também

teve sua concentração nuclear aumentada (figura 28). Nosso grupo descobriu que a proteína E6 potencializa a ativação de NF- κ B por IKK ϵ (Ismar R. Haga, dados não publicados), é provável que esta ação dependa da interação entre as proteínas IKK ϵ e E6 aqui caracterizada. A ativação de NF- κ B por E6 de HPV16 era conhecida (James *et al.*, 2016) e estes experimentos indicam que IKK ϵ é um dos alvos para a ação de E6 que resulta na ativação de NF- κ B.

Tal influência sobre a ativação de NF- κ B não foi observado com TBK1, proteína da família de IKK ϵ que verificamos não interagir com E6. Porém, houve potencialização também da ativação por MyD88 (Ismar R. Haga, dados não publicados), o que reforça a tese de que E6 de HPV16 exerce ação ativadora sobre segmentos da resposta imune antiviral para a progressão tumoral da doença. De fato, há diversas publicações indicando que isto ocorre (Dolganiuc *et al.*, 2004; Boehme *et al.*, 2006; Pandey *et al.*, 2009; Cai *et al.*, 2013; Mesri *et al.*, 2014), algumas apontando a participação de IKK ϵ (Clement *et al.*, 2008) e MyD88 (Salcedo *et al.*, 2013) no processo.

Apesar de sua importante ação no combate à infecção, muitos estudos mostram que NF- κ B é frequentemente essencial para a iniciação e progressão do câncer (Shen & Hahn, 2011). Mine *et al.* (2013), analisou dados referentes à alteração da expressão gênica em pacientes com câncer cervical e observou um constante aumento da expressão de genes relacionados à resposta antiviral e progressão do crescimento celular, demonstrando o quanto estes processos podem ser importantes para a progressão tumoral.

Vandermark *et al.* (2012) argumentou que as oncoproteínas E6 e E7 de HPV16 inibem a atividade de NF- κ B e isto contribui para o processo de transformação maligna, entretanto, este efeito está vinculado especialmente à

proteína E7 e difere entre culturas em diferentes estados de confluência e proliferação; por exemplo, em amostras não confluentes e não tratadas, a presença de E6 de HPV16 aumentou a atividade de NF- κ B (Vandermark *et al.*, 2012). Os experimentos desta tese foram realizados com células sempre em estado proliferativo, não utilizamos células em estado completamente confluyente.

Muitas ações de E6 dependem de sua grande capacidade de interagir com proteínas humanas. Várias interações já foram descobertas, porém poucos experimentos que embasam estas informações foram realizados em queratinócitos, células que o HPV naturalmente infecta. Para estudar as interações proteicas de E6, pesquisadores lançam mão de sistema de transcrição e tradução *in-vitro*, células CV-1 (fibroblastos de macaco), células HEK293/293T (renais), *E. coli*, células NIH 3T3 (fibroblastos de camundongo), células BGC823 (gástricas), dentre outras (Vande Pol & Klingelutz, 2013). Queratinócitos têm baixa eficiência para a realização das metodologias necessárias, como expressão heteróloga de proteínas, e observar interações proteicas nestas células constitui um obstáculo poucas vezes superado. Pudemos verificar com sucesso a interação entre E6 e IKK ϵ em queratinócitos (figura 23). Embora em proporção muito menor do que se verificou em HEK293T, tal resultado constitui um raro achado dentre os estudos de alvos moleculares de E6 e demonstra com alta confiabilidade que o fenômeno observado ocorre em infecções naturais por HPV.

Para analisar a consequência última da ação das oncoproteínas virais sobre a resposta mediada por TLRs, diversas citocinas foram analisadas quanto a sua presença no sobrenadante de culturas celulares. Este tópico possui resultados controversos na literatura (Filippova *et al.*, 2005; Boccardo *et al.*, 2010; Koshiol & Kovacic, 2012); controvérsia que se explica em parte pela variedade de sistemas

utilizados para análise, trazendo consigo viés oriundo de diferentes características celulares. Por exemplo, é comum comparar as linhagens HeLa (que expressa oncoproteína de HPV18) e SiHa (que expressa oncoproteínas de HPV16), porém, estas células são oriundas de mulheres de etnias diferentes, resultado em diversas diferença gênicas entre as amostras além dos genes de origem viral. Este trabalho utilizou linhagens de células epiteliais (HTE) que diferem unicamente quanto à presença dos oncogenes de HPV16 entre elas, minimizando as interferências provenientes de características alheias às oncoproteínas estudadas. A vantagem em se utilizar as células HTE para estudo da via de TLRs se tornou ainda mais evidente após verificarmos a expressão basal das proteínas MyD88 e IKK ϵ em diversas linhagens de interesse (figuras 26 e 27).

As concentrações das citocinas IL-6, IL-8 e TNF apresentaram significativas alterações mediante a presença das oncoproteínas (figuras 29 a 35). Estudos indicam que carcinomas HPV positivos expressam altos níveis de IL-6, porém, estas células perdem a expressão do receptor de IL-6, impedindo a ativação autócrina (Hess *et al.*, 2000); o que está de acordo com o resultado por nós observado da citocina MCP-1, produto da ação de IL-6, contribuindo para a imunossupressão local. É sabido também que IL-6 estimula proliferação de linhagens epiteliais cervicais normais e neoplásicas (Castrilli *et al.*, 1997); o aumento da produção de IL-6 por E6 pode constituir um agente ativo na carcinogênese por HPV16.

Adicionalmente, observamos que IKK ϵ tem papel significativo no aumento da produção de IL-6 mediante presença de E6. A expressão da proteína truncada IKK ϵ aminoterminal (1^o ao 160^o aa) reduziu a concentração de IL-6 no sobrenadante de culturas celulares, tal efeito foi específico para a linhagem que expressa E6 de HPV16 (figura 35). Portanto, E6 estimula a ativação de NF- κ B por IKK ϵ resultando

na produção da IL-6; a presença da proteína truncada IKK ϵ aminoterminal inibe esta ação, provavelmente por competição.

Outra citocina estimulada pela presença de oncoproteínas virais foi IL-8 (figuras 29 a 31). Estudos mostram que E6 de HPV16 induz a expressão de IL-8 em linhagens de células tumorais, resultando na produção de fatores angiogênicos e metastáticos, as metaloproteinases 2 e 9 (Shiau *et al.*, 2013). Esta observação sugere que este também pode ser um mecanismo promovido pelo HPV16 para progressão tumoral. Em nossas análises, observamos um aumento da concentração de IL-8 em células expressando oncoproteínas virais inclusive em células tratadas com LPS ou ODNs, o que indica que a ação das oncoproteínas virais utiliza-se da resposta por TLRs. De Andrea *et al.* (2007) apresentou resultados discrepantes em relação aos da presente tese, os níveis de IL-8 foi diminuídos pela presença das oncoproteínas E6 e E7 de HPV16; tal discrepância pode ser causada pela diferença nas linhagens utilizadas.

TNF exerce papel muito importante na regulação da inflamação em resposta à infecções, influenciando atividades antivirais, apoptose, crescimento e proliferação celular (Locksley *et al.*, 2001). Estudos prévios apontam a relevância de TNF na resposta imune contra a infecção por HPV. TNF inibe a transcrição de genes de HPV16 (Kyo *et al.*, 1994) e queratinócitos imortalizados por HPV16 apresentaram sensibilidade ao tratamento por TNF, que diminuiu o crescimento celular (Villa *et al.*, 2000). Por outro lado, E6 de HPV16 é capaz de bloquear a apoptose mediada por TNF (Duerksen-Hughes *et al.*, 1999; James *et al.*, 2006). Fato interessante foi noticiado por Filippova *et al.* (2005), que demonstrou que E6 de HPV16 pode tanto proteger, quanto sensibilizar as células ao TNF, dependendo da concentração desta oncoproteína. Em nossos experimentos, a produção de TNF foi estimulada em

células HTE pelo tratamento com LPS, em especial em células expressando E7, mas não E6, de HPV16 (figura 32). Existem evidências que TNF pode agir como promotor tumoral (Gaiotti *et al.*, 2000; Balkwill, 2002), a capacidade de E7 de induzir a expressão desta citocina em condições específicas pode ser benéfico à progressão da doença, mas é importante para o HPV controlar rigorosamente a produção de TNF, uma vez que este fator tem grande potencial de combate ao vírus, isto se reflete no papel de E6, que reverte o efeito produzido por E7.

Citocinas reguladas por um mesmo conjunto de transfatores apresentaram resultados distintos devido à presença de E6. Por exemplo, não houve um efeito uniforme nas citocinas reguladas por NF- κ B (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-8, MCP-1 e RANTES). Fica evidente que E6 de HPV16 não afeta uniformemente a ação de um transfator, mas apresenta efeitos diversos nos genes alvos. Isto mostra que a ação das oncoproteínas sobre as vias ocorre de forma complexa e em diversas etapas da via de sinalização. A figura 36 representa a via de TLR e os pontos de influência de E6 de HPV16 discutidos neste trabalho.

Figura 36: Via de sinalização de TLR com destaque para interferências de E6 de HPV16. Resumo da influência de E6 na via de TLR, utilizando a figura 1 como base, baseado nos resultados obtidos e citados no presente trabalho. Proteínas cuja ação com E6 de HPV16 não foi estudada estão representadas em tons de cinza. Proteínas que interagem com E6, mas não conhecemos a consequência desta interação, estão representadas em amarelo. Proteínas que não interagem com E6, ou não são afetadas por E6 quanto à ativação de NF-κB, em roxo. Proteínas ativadas por E6 em verde. Proteínas inibidas por E6 em vermelho. Adaptada de O'Neill *et al.* (2013).

A via TLR mostrou que pode ser influenciada por E6 de HPV16 em múltiplas etapas; desde a expressão de seus componentes, até a atividade dos mesmos. Isto sugere que esta via é importante para o sucesso da infecção viral e/ou progressão da doença. As consequências de cada ação aqui observada poderão ser melhor estudadas futuramente e novas influências da oncoproteína E6 sobre as células humanas podem ser acrescidas à sua já extensa lista de processos biológicos modificados. Diante do crescente interesse em tratamentos de infecções por HPV

que se utilizam da ativação do sistema imune (So & Ouchi, 2010; Zhu & Mohan, 2010; Öhlschläger *et al.*, 2011), ponderamos que estes não devem ser utilizados até o completo entendimento da relação entre o sistema imune e os papilomavírus, pois é possível que o processo de progressão tumoral se favoreça da ação antiviral promovida.

6 CONCLUSÕES

O sistema imune inato tem papel decisivo no desfecho das doenças causadas pelo Papilomavírus humano (HPV). É importante que um vírus seja capaz de evadir os mecanismos de combate à infecção para que esta se estabeleça; entretanto, agentes infecciosos com capacidade oncogênica demonstram capacidade de ativar respostas imunes e isto colabora para o processo de carcinogênese. A via de sinalização por TLRs é influenciada pela oncoproteína E6 de HPV16, seus componentes são alvos de diferentes modos de interferência.

O polimorfismo rs5742826 estudado não influenciou significativamente no desfecho da infecção por HPV na coorte de mulheres acompanhadas. Apenas alguns tipos de HPV apresentaram tímida influência do polimorfismo no risco de infecção ou chance de eliminação do vírus. É admissível que este polimorfismo não exerce influência relevante na resposta imune contra a infecção pelo HPV.

Os TLRs ativam genes de resposta aos PAMPs que detectam por meio de uma via de sinalização, formada por diversas proteínas que a compõem. Vários destes componentes interagem com a proteína E6 de HPV16, segundo experimentos realizados em nosso grupo de pesquisa. A proteína adaptadora MyD88 interage com E6 de HPV16, de modo que E6 é estabilizada pela presença de MyD88. Tal observação é comum em experimentos que estudam a interação de E6 com proteínas celulares, especialmente quando estas possuem um conhecido sítio de interação com E6, LxxLL. Apesar de MyD88 possuir um sítio similar em sua sequência primária, a estabilização de E6 independe deste sítio, indicando que a interação não ocorre neste local, como era esperado.

A quinase IKK ϵ também interage com E6 de HPV16. Esta interação, comprovada em queratinócitos, ocorre na região que contém o sítio catalítico da enzima. Experimentos prévios demonstraram que E6 potencializa a ativação de NF- κ B por IKK ϵ e os resultados deste trabalho indicam que a ação de E6 ocorre diretamente na enzima IKK ϵ , aumentando sua capacidade catalítica.

Por consequência, a produção de citocinas responsivas à atividade de TLRs foi alterada pelas oncoproteínas de HPV16, especialmente E6. Citocinas cujo aumento de expressão já foi vinculado ao favorecimento do processo de carcinogênese tiveram sua produção aumentada pela presença de E6 e/ou E7 de HPV16.

Por fim, este trabalho demonstra a ativação da resposta imune inata mediada por TLRs através da ação da proteína E6 de HPV16, com potencial influência na progressão da tumorigênese. Tal fato aumenta a complexidade da relação entre o HPV e o sistema imune e põe em dúvida abordagens terapêuticas que ativam a resposta imune contra o HPV.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, T.; KANAME, Y.; HAMAMOTO, I.; TSUDA, Y.; WEN, X.; TAGUWA, S.; MORIISHI, K.; TAKEUCHI, O.; KAWAI, T.; KANTO, T.; HAYASHI, N.; AKIRA, S.; MATSUURA, Y. Hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates the toll-like receptor-MyD88-dependent signaling pathway in macrophage cell lines. *J Virol*, v. 81, n. 17, p. 8953-66, Sep 2007.

AMADOR-MOLINA, A.; HERNANDEZ-VALENCIA, J. F.; LAMOYI, E.; CONTRERAS-PAREDES, A.; LIZANO, M. Role of innate immunity against human papillomavirus (HPV) infections and effect of adjuvants in promoting specific immune response. *Viruses*, v. 5, n. 11, p. 2624-42, Nov 2013.

ANSARI, T.; BRIMER, N.; VANDE POL, S. B. Peptide interactions stabilize and restructure human papillomavirus type 16 E6 to interact with p53. *J Virol*, v. 86, n. 20, p. 11386-91, Oct 2012.

BALKWILL, F. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? *Cytokine Growth Factor Rev*, v. 13, n. 2, p. 135-41, Apr 2002.

BERGVALL, M.; MELENDY, T.; ARCHAMBAULT, J. The E1 proteins. *Virology*, v. 445, n. 1-2, p. 35-56, Oct 2013.

BOCCARDO, E.; LEPIQUE, A. P.; VILLA, L. L. The role of inflammation in HPV carcinogenesis. *Carcinogenesis*, v. 31, n. 11, p. 1905-12, Nov 2010.

BOEHM, J. S.; ZHAO, J. J.; YAO, J.; KIM, S. Y.; FIRESTEIN, R.; DUNN, I. F.; SJOSTROM, S. K.; GARRAWAY, L. A.; WEREMOWICZ, S.; RICHARDSON, A. L.; GREULICH, H.; STEWART, C. J.; MULVEY, L. A.; SHEN, R. R.; AMBROGIO, L.; HIROZANE-KISHIKAWA, T.; HILL, D. E.; VIDAL, M.; MEYERSON, M.; GRENIER, J. K.; HINKLE, G.; ROOT, D. E.; ROBERTS, T. M.; LANDER, E. S.; POLYAK, K.; HAHN, W. C. Integrative genomic approaches identify IKBKE as a breast cancer oncogene. *Cell*, v. 129, n. 6, p. 1065-79, Jun 15 2007.

BOEHME, K. W.; GUERRERO, M.; COMPTON, T. Human cytomegalovirus envelope glycoproteins B and H are necessary for TLR2 activation in permissive cells. *J Immunol*, v. 177, n. 10, p. 7094-102, Nov 15 2006.

BRIMER, N.; LYONS, C.; VANDE POL, S. B. Association of E6AP (UBE3A) with human papillomavirus type 11 E6 protein. *Virology*, v. 358, n. 2, p. 303-310, 2007.

BRUNI, L.; BARRIONUEVO-ROSAS, L.; ALBERO, G.; ALDEA, M.; SERRANO, B.; VALENCIA, S.; BROTONS, M.; MENA, M.; COSANO, R.; MUÑOZ, J.; BOSCH, F. X.; DE SANJOSÉ, S.; CASTELLSAGUÉ, X. *Human Papillomavirus and Related Diseases in the World*. ICO Information Centre on HPV and Cancer (HPV Information Centre)2015-12-23. 2016

BUCK, C. B.; DAY, P. M.; TRUS, B. L. The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology*, v. 445, n. 1-2, p. 169-74, Oct 2013.

CAI, M.; LI, M.; WANG, K.; WANG, S.; LU, Q.; YAN, J.; MOSSMAN, K. L.; LIN, R.; ZHENG, C. The Herpes Simplex Virus 1-Encoded Envelope Glycoprotein B Activates NF- κ B through the Toll-Like Receptor 2 and MyD88/TRAF6-Dependent Signaling Pathway. *PLoS ONE*, v. 8, n. 1, p. e54586, 2013.

CARPENTER, S.; O'NEILL, L. A. How important are Toll-like receptors for antimicrobial responses? *Cell Microbiol*, v. 9, n. 8, p. 1891-901, Aug 2007.

CARVALHO, A.; MARQUES, A.; MACIEL, P.; RODRIGUES, F. Study of disease-relevant polymorphisms in the TLR4 and TLR9 genes: a novel method applied to the analysis of the Portuguese population. *Mol Cell Probes*, v. 21, n. 4, p. 316-20, Aug 2007.

CARVALHO, A.; PASQUALOTTO, A. C.; PITZURRA, L.; ROMANI, L.; DENNING, D. W.; RODRIGUES, F. Polymorphisms in toll-like receptor genes and susceptibility to pulmonary aspergillosis. *J Infect Dis*, v. 197, n. 4, p. 618-21, Feb 15 2008.

CASTRILLI, G.; TATONE, D.; DIODORO, M. G.; ROSINI, S.; PIANTELLI, M.; MUSIANI, P. Interleukin 1 alpha and interleukin 6 promote the in vitro growth of both normal and neoplastic human cervical epithelial cells. *Br J Cancer*, v. 75, n. 6, p. 855-9, 1997.

CHEN, X.; WANG, S.; LIU, L.; CHEN, Z.; QIANG, F.; KAN, Y.; SHEN, Y.; WU, J.; SHEN, H.; HU, Z. A genetic variant in the promoter region of Toll-like receptor 9 and cervical cancer susceptibility. *DNA Cell Biol*, v. 31, n. 5, p. 766-71, May 2012.

CHEN, X. Z.; MAO, X. H.; ZHU, K. J.; JIN, N.; YE, J.; CEN, J. P.; ZHOU, Q.; CHENG, H. Toll like receptor agonists augment HPV 11 E7-specific T cell responses by modulating monocyte-derived dendritic cells. *Arch Dermatol Res*, v. 302, n. 1, p. 57-65, Jan 2010.

CLEMENT, J. F.; MELOCHE, S.; SERVANT, M. J. The IKK-related kinases: from innate immunity to oncogenesis. *Cell Res*, v. 18, n. 9, p. 889-99, Sep 2008.

- DAUD, II; SCOTT, M. E.; MA, Y.; SHIBOSKI, S.; FARHAT, S.; MOSCICKI, A. B. Association between toll-like receptor expression and human papillomavirus type 16 persistence. *Int J Cancer*, v. 128, n. 4, p. 879-86, Feb 15 2011.
- DE ANDREA, M.; MONDINI, M.; AZZIMONTI, B.; DELL'OSTE, V.; GERMANO, S.; GAUDINO, G.; MUSSO, T.; LANDOLFO, S.; GARIGLIO, M. Alpha- and betapapillomavirus E6/E7 genes differentially modulate pro-inflammatory gene expression. *Virus Res*, v. 124, n. 1-2, p. 220-5, Mar 2007.
- DE VILLIERS, E. M. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology*, v. 445, n. 1-2, p. 2-10, Oct 2013.
- DIMAIO, D.; PETTI, L. M. The E5 proteins. *Virology*, v. 445, n. 1-2, p. 99-114, Oct 2013.
- DOLGANIUC, A.; OAK, S.; KODYS, K.; GOLENBOCK, D. T.; FINBERG, R. W.; KURT-JONES, E.; SZABO, G. Hepatitis C core and nonstructural 3 proteins trigger toll-like receptor 2-mediated pathways and inflammatory activation. *Gastroenterology*, v. 127, n. 5, p. 1513-24, Nov 2004.
- DOORBAR, J. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. *Virology*, v. 445, n. 1-2, p. 80-98, Oct 2013.
- DOORBAR, J.; EGAWA, N.; GRIFFIN, H.; KRANJEC, C.; MURAKAMI, I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev Med Virol*, v. 25 Suppl 1, p. 2-23, Mar 2015.
- DUERKSEN-HUGHES, P. J.; YANG, J.; SCHWARTZ, S. B. HPV 16 E6 blocks TNF-mediated apoptosis in mouse fibroblast LM cells. *Virology*, v. 264, n. 1, p. 55-65, Nov 10 1999.
- EINSTEIN, M. H.; SCHILLER, J. T.; VISCIDI, R. P.; STRICKLER, H. D.; COURSAGET, P.; TAN, T.; HALSEY, N.; JENKINS, D. Clinician's guide to human papillomavirus immunology: knowns and unknowns. *Lancet Infect Dis*, v. 9, n. 6, p. 347-56, Jun 2009.
- FAHEY, L. M.; RAFF, A. B.; DA SILVA, D. M.; KAST, W. M. Reversal of human papillomavirus-specific T cell immune suppression through TLR agonist treatment of Langerhans cells exposed to human papillomavirus type 16. *J Immunol*, v. 182, n. 5, p. 2919-28, Mar 1 2009.
- FILIPPOVA, M.; BROWN-BRYAN, T. A.; CASIANO, C. A.; DUERKSEN-HUGHES, P. J. The human papillomavirus 16 E6 protein can either protect or further sensitize cells to TNF: effect of dose. *Cell Death Differ*, v. 12, n. 12, p. 1622-35, Dec 2005.

FITZGERALD, K. A.; PALSSON-MCDERMOTT, E. M.; BOWIE, A. G.; JEFFERIES, C. A.; MANSELL, A. S.; BRADY, G.; BRINT, E.; DUNNE, A.; GRAY, P.; HARTE, M. T.; MCMURRAY, D.; SMITH, D. E.; SIMS, J. E.; BIRD, T. A.; O'NEILL, L. A. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature*, v. 413, n. 6851, p. 78-83, Sep 6 2001.

FRANCO, E.; VILLA, L.; ROHAN, T.; FERENCZY, A.; PETZL-ERLER, M.; MATLASHEWSKI, G. Design and methods of the Ludwig-McGill longitudinal study of the natural history of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Brazil. Ludwig-McGill Study Group. *Rev Panam Salud Publica*, v. 6, n. 4, p. 223-33, Oct 1999.

GAIOTTI, D.; CHUNG, J.; IGLESIAS, M.; NEES, M.; BAKER, P. D.; EVANS, C. H.; WOODWORTH, C. D. 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*, v. 27, n. 2, p. 97-109, Feb 2000.

GHOSH, S.; KARIN, M. Missing pieces in the NF- κ B puzzle. *Cell*, v. 109 Suppl, p. S81-96, Apr 2002.

GUO, J. P.; SHU, S. K.; ESPOSITO, N. N.; COPPOLA, D.; KOOMEN, J. M.; CHENG, J. Q. IKK ϵ phosphorylation of estrogen receptor α Ser-167 and contribution to tamoxifen resistance in breast cancer. *J Biol Chem*, v. 285, n. 6, p. 3676-84, Feb 5 2010.

HASAN, U. A.; BATES, E.; TAKESHITA, F.; BILIATO, A.; ACCARDI, R.; BOUVARD, V.; MANSOUR, M.; VINCENT, I.; GISSMANN, L.; IFTNER, T.; SIDERI, M.; STUBENRAUCH, F.; TOMMASINO, M. TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. *J Immunol*, v. 178, n. 5, p. 3186-97, Mar 1 2007.

HASAN, U. A.; ZANNETTI, C.; PARROCHE, P.; GOUTAGNY, N.; MALFROY, M.; ROBLOT, G.; CARREIRA, C.; HUSSAIN, I.; MULLER, M.; TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J.; PICARD, D.; SYLLA, B. S.; TRINCHIERI, G.; MEDZHITOV, R.; TOMMASINO, M. The human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein induces a transcriptional repressor complex on the Toll-like receptor 9 promoter. *J Exp Med*, v. 210, n. 7, p. 1369-87, Jul 1 2013.

HAVRE, P. A.; YUAN, J.; HEDRICK, L.; CHO, K. R.; GLAZER, P. M. p53 inactivation by HPV16 E6 results in increased mutagenesis in human cells. *Cancer Res*, v. 55, n. 19, p. 4420-4, Oct 1 1995.

HESS, S.; SMOLA, H.; SANDARADURA DE SILVA, U.; HADASCHIK, D.; KUBE, D.; BALDUS, S. E.; FLUCKE, U.; PFISTER, H. Loss of IL-6 receptor expression in cervical carcinoma cells inhibits autocrine IL-6 stimulation: abrogation of constitutive monocyte chemoattractant protein-1 production. *J Immunol*, v. 165, n. 4, p. 1939-48, Aug 15 2000.

HOFFMANN, J.; AKIRA, S. Innate immunity. *Current Opinion in Immunology*, v. 25, n. 1, p. 1-3, 2013.

HOWIE, H. L.; KATZENELLENBOGEN, R. A.; GALLOWAY, D. A. Papillomavirus E6 proteins. *Virology*, v. 384, n. 2, p. 324-34, Feb 20 2009.

HSU, S.; KIM, M.; HERNANDEZ, L.; GRAJALES, V.; NOONAN, A.; ANVER, M.; DAVIDSON, B.; ANNUNZIATA, C. M. IKK-epsilon coordinates invasion and metastasis of ovarian cancer. *Cancer Res*, v. 72, n. 21, p. 5494-504, Nov 1 2012.

HUIBREGTSE, J. M.; SCHEFFNER, M.; HOWLEY, P. M. Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins. *Molecular and Cellular Biology*, v. 13, n. 8, p. 4918-4927, 1993.

IWAMURA, T.; YONEYAMA, M.; YAMAGUCHI, K.; SUHARA, W.; MORI, W.; SHIOTA, K.; OKABE, Y.; NAMIKI, H.; FUJITA, T. Induction of IRF-3/-7 kinase and NF-kappaB in response to double-stranded RNA and virus infection: common and unique pathways. *Genes Cells*, v. 6, n. 4, p. 375-88, Apr 2001.

JAMES, M. A.; LEE, J. H.; KLINGELHUTZ, A. J. Human Papillomavirus Type 16 E6 Activates NF- B, Induces cIAP-2 Expression, and Protects against Apoptosis in a PDZ Binding Motif-Dependent Manner. *Journal of Virology*, v. 80, n. 11, p. 5301-5307, 2006.

JOOSTEN, L. A.; ABDOLLAHI-ROODSAZ, S.; DINARELLO, C. A.; O'NEILL, L.; NETEA, M. G. Toll-like receptors and chronic inflammation in rheumatic diseases: new developments. *Nat Rev Rheumatol*, v. 12, n. 6, p. 344-57, Jun 2016.

KAUKINEN, P.; SILLANPAA, M.; NOUSIAINEN, L.; MELEN, K.; JULKUNEN, I. Hepatitis C virus NS2 protease inhibits host cell antiviral response by inhibiting IKKepsilon and TBK1 functions. *J Med Virol*, v. 85, n. 1, p. 71-82, Jan 2013.

KAWAI, T.; ADACHI, O.; OGAWA, T.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity*, v. 11, n. 1, p. 115-22, Jul 1999.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*, v. 11, n. 5, p. 373-84, May 2010.

KFOURY, A.; VIRARD, F.; RENNO, T.; COSTE, I. Dual function of MyD88 in inflammation and oncogenesis: implications for therapeutic intervention. *Curr Opin Oncol*, v. 26, n. 1, p. 86-91, Jan 2014.

KIM, T. Y.; MYOUNG, H. J.; KIM, J. H.; MOON, I. S.; KIM, T. G.; AHN, W. S.; SIN, J. I. Both E7 and CpG-oligodeoxynucleotide are required for protective immunity against challenge with human papillomavirus 16 (E6/E7) immortalized tumor cells: involvement of CD4+ and CD8+ T cells in protection. *Cancer Res*, v. 62, n. 24, p. 7234-40, Dec 15 2002.

KIM, Y.; GIRARDI, M.; DUVIC, M.; KUZEL, T.; ROOK, A.; LINK, B.; PINTER-BROWN, L.; COMERCI, C.; MCAULEY, S.; SCHMALBACH, T. TLR9 Agonist Immunomodulator Treatment of Cutaneous T-Cell Lymphoma (CTCL) with CPG7909. *Blood*, v. 104, n. 11, p. 743-743, 2004.

KOSHIOL, J.; KOVACIC, M. B. Cytokines and Markers of Immune Response to HPV Infection. *Inflammation and Infections*, 2012.

KOSTER, M. I. Making an epidermis. *Ann N Y Acad Sci*, v. 1170, p. 7-10, Jul 2009.

KRIEG, A. M. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov*, v. 5, n. 6, p. 471-84, Jun 2006.

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*, v. 200, n. 1, p. 130-9, Apr 1994.

LAMBERT, P. F.; OZBUN, M. A.; COLLINS, A.; HOLMGREN, S.; LEE, D.; NAKAHARA, T. Using an immortalized cell line to study the HPV life cycle in organotypic "raft" cultures. *Methods Mol Med*, v. 119, p. 141-55, 2005.

LAZARUS, R.; KLIMECKI, W. T.; RABY, B. A.; VERCELLI, D.; PALMER, L. J.; KWIATKOWSKI, D. J.; SILVERMAN, E. K.; MARTINEZ, F.; WEISS, S. T. Single-nucleotide polymorphisms in the Toll-like receptor 9 gene (TLR9): frequencies, pairwise linkage disequilibrium, and haplotypes in three U.S. ethnic groups and exploratory case-control disease association studies. *Genomics*, v. 81, n. 1, p. 85-91, Jan 2003.

LEBRE, M. C.; VAN DER AAR, A. M.; VAN BAARSEN, L.; VAN CAPEL, T. M.; SCHUITMAKER, J. H.; KAPSENBERG, M. L.; DE JONG, E. C. Human keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9. *J Invest Dermatol*, v. 127, n. 2, p. 331-41, Feb 2007.

LI, H.; CHEN, L.; ZHANG, A.; WANG, G.; HAN, L.; YU, K.; PU, P.; KANG, C.; HUANG, Q. Silencing of IKKepsilon using siRNA inhibits proliferation and invasion of glioma cells in vitro and in vivo. *Int J Oncol*, v. 41, n. 1, p. 169-78, Jul 2012.

LIU, Q.; THORLAND, E. C.; HEIT, J. A.; SOMMER, S. S. Overlapping PCR for bidirectional PCR amplification of specific alleles: a rapid one-tube method for simultaneously differentiating homozygotes and heterozygotes. *Genome Res*, v. 7, n. 4, p. 389-98, Apr 1997.

LOCKSLEY, R. M.; KILLEEN, N.; LENARDO, M. J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, v. 104, n. 4, p. 487-501, Feb 23 2001.

LU, K. C.; YANG, H. Y.; LIN, Y. F.; KAO, S. Y.; LAI, C. H.; CHU, C. M.; WU, C. C.; SU, S. L. The T-1237C polymorphism of the Toll-like receptor-9 gene is associated with chronic kidney disease in a Han Chinese population. *Tohoku J Exp Med*, v. 225, n. 2, p. 109-16, 2011.

MCBRIDE, A. A. The papillomavirus E2 proteins. *Virology*, v. 445, n. 1-2, p. 57-79, Oct 2013.

MCMURRAY, H. R.; NGUYEN, D.; WESTBROOK, T. F.; MCANCE, D. J. Biology of human papillomaviruses. *Int J Exp Pathol*, v. 82, n. 1, p. 15-33, Feb 2001.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; KOPP, E.; STADLEN, A.; CHEN, C.; GHOSH, S.; JANEWAY, C. A., JR. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell*, v. 2, n. 2, p. 253-8, Aug 1998.

MESRI, ENRIQUE A.; FEITELSON, M. A.; MUNGER, K. Human Viral Oncogenesis: A Cancer Hallmarks Analysis. *Cell Host & Microbe*, v. 15, n. 3, p. 266-282, 2014.

MINE, K. L.; SHULZHENKO, N.; YAMBARTSEV, A.; ROCHMAN, M.; SANSON, G. F.; LANDO, M.; VARMA, S.; SKINNER, J.; VOLFOVSKY, N.; DENG, T.; BRENNAN, S. M.; CARVALHO, C. R.; RIBALTA, J. C.; BUSTIN, M.; MATZINGER, P.; SILVA, I. D.; LUNG, H.; GERBASE-DELIMA, M.; MORGUN, A. Gene network reconstruction reveals cell cycle and antiviral genes as major drivers of cervical cancer. *Nat Commun*, v. 4, p. 1806, 2013.

MISCH, E. A.; HAWN, T. R. Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to human disease. *Clin Sci (Lond)*, v. 114, n. 5, p. 347-60, Mar 2008.

MOSCICKI, A. B.; SCHIFFMAN, M.; BURCHELL, A.; ALBERO, G.; GIULIANO, A. R.; GOODMAN, M. T.; KJAER, S. K.; PALEFSKY, J. Updating the natural history of

human papillomavirus and anogenital cancers. *Vaccine*, v. 30 Suppl 5, p. F24-33, Nov 20 2012.

MUNGER, K.; PHELPS, W. C.; BUBB, V.; HOWLEY, P. M.; SCHLEGEL, R. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol*, v. 63, n. 10, p. 4417-21, Oct 1989.

MUNOZ, N.; BOSCH, F. X.; DE SANJOSE, S.; HERRERO, R.; CASTELLSAGUE, X.; SHAH, K. V.; SNIJDERS, P. J.; MEIJER, C. J. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*, v. 348, n. 6, p. 518-27, Feb 6 2003.

MUZIO, M.; NATOLI, G.; SACCANI, S.; LEVRERO, M.; MANTOVANI, A. The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6). *J Exp Med*, v. 187, n. 12, p. 2097-101, Jun 15 1998.

NAKAHARA, T.; KIYONO, T. Interplay between NF- κ B/interferon signaling and the genome replication of HPV. *Future Virology*, v. 11, n. 3, p. 14, February 2016.

NASU, K.; NARAHARA, H. Pattern recognition via the toll-like receptor system in the human female genital tract. *Mediators Inflamm*, v. 2010, p. 976024, 2010.

NG, M. T.; VAN'T HOF, R.; CROCKETT, J. C.; HOPE, M. E.; BERRY, S.; THOMSON, J.; MCLEAN, M. H.; MCCOLL, K. E.; EL-OMAR, E. M.; HOLD, G. L. Increase in NF-kappaB binding affinity of the variant C allele of the toll-like receptor 9 -1237T/C polymorphism is associated with Helicobacter pylori-induced gastric disease. *Infect Immun*, v. 78, n. 3, p. 1345-52, Mar 2010.

NOVAK, N.; YU, C. F.; BUSSMANN, C.; MAINTZ, L.; PENG, W. M.; HART, J.; HAGEMANN, T.; DIAZ-LACAVA, A.; BAURECHT, H. J.; KLOPP, N.; WAGENPFEIL, S.; BEHRENDT, H.; BIEBER, T.; RING, J.; ILLIG, T.; WEIDINGER, S. Putative association of a TLR9 promoter polymorphism with atopic eczema. *Allergy*, v. 62, n. 7, p. 766-72, Jul 2007.

O'NEILL, L. A.; GOLENBOCK, D.; BOWIE, A. G. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol*, v. 13, n. 6, p. 453-60, Jun 2013.

O'NEILL, L. A. J. Toll-like receptors in cancer. *Oncogene*, v. 27, n. 2, p. 158-160, 2008.

ÖHLSCHLÄGER, P.; SPIES, E.; ALVAREZ, G.; QUETTING, M.; GROETTRUP, M. The combination of TLR-9 adjuvantation and electroporation-mediated delivery enhances in vivo antitumor responses after vaccination with HPV-16 E7 encoding DNA. *International Journal of Cancer*, v. 128, n. 2, p. 473-481, 15 January 2011 2011.

OLIVEIRA, L. B.; LOUVANTO, K.; RAMANAKUMAR, A. V.; FRANCO, E. L.; VILLA, L. L.; LUDWIG-MCGILL COHORT, S. Polymorphism in the promoter region of the Toll-like receptor 9 gene and cervical human papillomavirus infection. *J Gen Virol*, v. 94, n. Pt 8, p. 1858-64, Aug 2013.

PAGANO, M.; DURST, M.; JOSWIG, S.; DRAETTA, G.; JANSEN-DURR, P. Binding of the human E2F transcription factor to the retinoblastoma protein but not to cyclin A is abolished in HPV-16-immortalized cells. *Oncogene*, v. 7, n. 9, p. 1681-6, Sep 1992.

PANDEY, S.; MITTAL, R. D.; SRIVASTAVA, M.; SRIVASTAVA, K.; SINGH, S.; SRIVASTAVA, S.; MITTAL, B. Impact of Toll-like receptors [TLR] 2 (–196 to –174 del) and TLR 4 (Asp299Gly, Thr399Ile) in cervical cancer susceptibility in North Indian women. *Gynecologic Oncology*, v. 114, n. 3, p. 501-505, 2009.

PETERS, R. T.; LIAO, S. M.; MANIATIS, T. IKKepsilon is part of a novel PMA-inducible IkkappaB kinase complex. *Mol Cell*, v. 5, n. 3, p. 513-22, Mar 2000.

PETT, M. R.; HERDMAN, M. T.; PALMER, R. D.; YEO, G. S.; SHIVJI, M. K.; STANLEY, M. A.; COLEMAN, N. Selection of cervical keratinocytes containing integrated HPV16 associates with episome loss and an endogenous antiviral response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 103, n. 10, p. 3822-7, Mar 7 2006.

PRABHAVATHY, D.; VIJAYALAKSHMI, R.; KANCHANA, M. P.; KARUNAGARAN, D. HPV16 E2 enhances the expression of NF-kappaB and STAT3 target genes and potentiates NF-kappaB activation by inflammatory mediators. *Cell Immunol*, v. 292, n. 1-2, p. 70-7, Nov-Dec 2014.

QIN, B.; CHENG, K. Silencing of the IKKepsilon gene by siRNA inhibits invasiveness and growth of breast cancer cells. *Breast Cancer Res*, v. 12, n. 5, p. R74, 2010.

RABACHINI, T.; TROTTIER, H.; FRANCO, E. L.; VILLA, L. L. Validation of dot blot hybridization and denaturing high performance liquid chromatography as reliable methods for TP53 codon 72 genotyping in molecular epidemiologic studies. *BMC Genet*, v. 11, p. 44, 2010.

RENNER, F.; MORENO, R.; SCHMITZ, M. L. SUMOylation-dependent localization of IKKepsilon in PML nuclear bodies is essential for protection against DNA-damage-triggered cell death. *Mol Cell*, v. 37, n. 4, p. 503-15, Feb 26 2010.

ROMAN, A.; MUNGER, K. The papillomavirus E7 proteins. *Virology*, v. 445, n. 1-2, p. 138-68, Oct 2013.

RONCO, L. V.; KARPOVA, A. Y.; VIDAL, M.; HOWLEY, P. M. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev*, v. 12, n. 13, p. 2061-72, Jul 1 1998.

ROSZAK, A.; LIANERI, M.; SOWIŃSKA, A.; JAGODZIŃSKI, P. P. Involvement of toll-like receptor 9 polymorphism in cervical cancer development. *Molecular Biology Reports*, v. 39, n. 8, p. 8425-8430, 2012.

SABROE, I.; PARKER, L. C.; DOWER, S. K.; WHYTE, M. K. The role of TLR activation in inflammation. *J Pathol*, v. 214, n. 2, p. 126-35, Jan 2008.

SALCEDO, R.; CATAISSON, C.; HASAN, U.; YUSPA, S. H.; TRINCHIERI, G. MyD88 and its divergent toll in carcinogenesis. *Trends Immunol*, v. 34, n. 8, p. 379-89, Aug 2013.

SANKAR, S.; CHAN, H.; ROMANOW, W. J.; LI, J.; BATES, R. J. IKK-i signals through IRF3 and NFkappaB to mediate the production of inflammatory cytokines. *Cell Signal*, v. 18, n. 7, p. 982-93, Jul 2006.

SCHLECHT, N. F.; KULAGA, S.; ROBITAILLE, J.; FERREIRA, S.; SANTOS, M.; MIYAMURA, R. A.; DUARTE-FRANCO, E.; ROHAN, T. E.; FERENCZY, A.; VILLA, L. L.; FRANCO, E. L. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *JAMA*, v. 286, n. 24, p. 3106-14, Dec 26 2001.

SCHWARTZ, S. HPV-16 RNA processing. *Front Biosci*, v. 13, p. 5880-91, 2008.

SHEN, R. R.; HAHN, W. C. Emerging roles for the non-canonical IKKs in cancer. *Oncogene*, v. 30, n. 6, p. 631-41, Feb 10 2011.

SHIAU, M. Y.; FAN, L. C.; YANG, S. C.; TSAO, C. H.; LEE, H.; CHENG, Y. W.; LAI, L. C.; CHANG, Y. H. Human papillomavirus up-regulates MMP-2 and MMP-9 expression and activity by inducing interleukin-8 in lung adenocarcinomas. *PLoS One*, v. 8, n. 1, p. e54423, 2013.

SO, E. Y.; OUCHI, T. The application of Toll like receptors for cancer therapy. *Int J Biol Sci*, v. 6, n. 7, p. 675-81, 2010.

STANLEY, M. Immune responses to human papillomavirus. *Vaccine*, v. 24 Suppl 1, p. S16-22, Mar 30 2006.

STANLEY, M. A. Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. *Clin Microbiol Rev*, v. 25, n. 2, p. 215-22, Apr 2012.

STANLEY, M. A.; PETT, M. R.; COLEMAN, N. HPV: from infection to cancer. *Biochem Soc Trans*, v. 35, n. Pt 6, p. 1456-60, Dec 2007.

SWANN, J. B.; VESELY, M. D.; SILVA, A.; SHARKEY, J.; AKIRA, S.; SCHREIBER, R. D.; SMYTH, M. J. Demonstration of inflammation-induced cancer and cancer immunoediting during primary tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 105, n. 2, p. 652-6, Jan 15 2008.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Innate immunity to virus infection. *Immunol Rev*, v. 227, n. 1, p. 75-86, Jan 2009.

TINDLE, R. W. Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nat Rev Cancer*, v. 2, n. 1, p. 59-65, Jan 2002.

TOMAIC, V.; PIM, D.; BANKS, L. The stability of the human papillomavirus E6 oncoprotein is E6AP dependent. *Virology*, v. 393, n. 1, p. 7-10, Oct 10 2009.

TRAVIS, J. On the Origin of The Immune System. *Science*, v. 324, n. 5927, p. 580-582, 2009.

UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Research*, 2014.

VANDE POL, S. B.; KLINGELHUTZ, A. J. Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology*, v. 445, n. 1-2, p. 115-37, Oct 2013.

VANDERMARK, E. R.; DELUCA, K. A.; GARDNER, C. R.; MARKER, D. F.; SCHREINER, C. N.; STRICKLAND, D. A.; WILTON, K. M.; MONDAL, S.; WOODWORTH, C. D. Human papillomavirus type 16 E6 and E 7 proteins alter NF- κ B in cultured cervical epithelial cells and inhibition of NF- κ B promotes cell growth and immortalization. *Virology*, v. 425, n. 1, p. 53-60, Mar 30 2012.

VERHELST, K.; VERSTREPEN, L.; CARPENTIER, I.; BEYAERT, R. IkappaB kinase epsilon (IKKepsilon): a therapeutic target in inflammation and cancer. *Biochem Pharmacol*, v. 85, n. 7, p. 873-80, Apr 1 2013.

VILLA, L. L.; SICHERO, L.; RAHAL, P.; CABALLERO, O.; FERENCZY, A.; ROHAN, T.; FRANCO, E. L. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol*, v. 81, n. Pt 12, p. 2959-68, Dec 2000.

VILLA, L. L.; VIEIRA, K. B.; PEI, X. F.; SCHLEGEL, R. Differential effect of tumor necrosis factor on proliferation of primary human keratinocytes and cell lines containing human papillomavirus types 16 and 18. *Mol Carcinog*, v. 6, n. 1, p. 5-9, 1992.

WANG, J. W.; RODEN, R. B. L2, the minor capsid protein of papillomavirus. *Virology*, v. 445, n. 1-2, p. 175-86, Oct 2013.

WANG, Y.; LU, X.; ZHU, L.; SHEN, Y.; CHENGEDZA, S.; FENG, H.; WANG, L.; JUNG, J. U.; GUTKIND, J. S.; FENG, P. IKK epsilon kinase is crucial for viral G protein-coupled receptor tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 110, n. 27, p. 11139-44, Jul 2 2013.

WESCHE, H.; HENZEL, W. J.; SHILLINGLAW, W.; LI, S.; CAO, Z. MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity*, v. 7, n. 6, p. 837-47, Dec 1997.

WHITE, E. A.; KRAMER, R. E.; TAN, M. J. A.; HAYES, S. D.; HARPER, J. W.; HOWLEY, P. M. Comprehensive Analysis of Host Cellular Interactions with Human Papillomavirus E6 Proteins Identifies New E6 Binding Partners and Reflects Viral Diversity. *Journal of Virology*, v. 86, n. 24, p. 13174-13186, 2012.

ZANIER, K.; CHARBONNIER, S.; SIDI, A. O. M. O.; MCEWEN, A. G.; FERRARIO, M. G.; POUSSIN-COURMONTAGNE, P.; CURA, V.; BRIMER, N.; BABAH, K. O.; ANSARI, T.; MULLER, I.; STOTE, R. H.; CAVARELLI, J.; VANDE POL, S.; TRAVE, G. Structural Basis for Hijacking of Cellular LxxLL Motifs by Papillomavirus E6 Oncoproteins. *Science*, v. 339, n. 6120, p. 694-698, 2013.

ZHAO, Q.; LIANG, D.; SUN, R.; JIA, B.; XIA, T.; XIAO, H.; LAN, K. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded replication and transcription activator impairs innate immunity via ubiquitin-mediated degradation of myeloid differentiation factor 88. *J Virol*, v. 89, n. 1, p. 415-27, Jan 2015.

ZHOU, H.; DI PALMA, S.; PREISINGER, C.; PENG, M.; POLAT, A. N.; HECK, A. J.; MOHAMMED, S. Toward a comprehensive characterization of a human cancer cell phosphoproteome. *J Proteome Res*, v. 12, n. 1, p. 260-71, Jan 4 2013.

ZHU, J.; MOHAN, C. Toll-like receptor signaling pathways--therapeutic opportunities. *Mediators Inflamm*, v. 2010, p. 781235, 2010.

APÊNDICES

Figura Suplementar S1 – **Citocinas expressas por culturas de células HTE**

Tabela Suplementar S1 – **Detalhamento da análise estatística das figuras 29, 32 e 33**

Tabela Suplementar S2 – **Detalhamento da análise estatística das figuras 30 e 34**

Tabela Suplementar S3 – **Detalhamento da análise estatística das figuras 31 e 35**

Figura S1: Citocinas expressas por culturas de células HTE. As células foram transfectadas com três diferentes plasmídeos, contendo cada um gene diferente. Após 16h, foram tratadas com LPS por 24h, após este período, alíquotas do sobrenadante foram coletadas e submetidas à quantificação com o kit *Viral-induced Multi-Analyte ELISArray*. Experimento feito em duplicata. **Eixo da ordenada:** valor médio de absorbância, normalizado (dividido) pelo valor médio obtido para HTEv+GFP. **HTE:** células epiteliais humanas imortalizadas, provenientes de tonsila. **HTEv:** HTE transduzida estavelmente com vetor vazio. **HTE-E6:** HTE transduzida estavelmente com E6 de HPV16. **GFP, IKKε e MyD88:** genes contidos nos plasmídeos utilizados para transfectar as culturas celulares. **Eixo da abscissas:** citocinas medidas.

Tabela S1: Detalhamento da análise estatística das figuras 29, 32 e 33. Expressão de IL-8, TNF e IL-6 mediante tratamento com TNF e LPS, em células HTE.

Teste de Bonferroni	IL-8	TNF	IL-6
	p-valor	p-valor	p-valor
HTE-Ø neg vs HTE-Ø TNF	***	-	***
HTE-Ø neg vs HTE-Ø LPS	**	***	ns
HTE-Ø neg vs HTE-E6 neg	***	ns	***
HTE-Ø neg vs HTE-E6 TNF	***	-	***
HTE-Ø neg vs HTE-E6 LPS	***	***	***
HTE-Ø neg vs HTE-E7 neg	***	***	ns
HTE-Ø neg vs HTE-E7 TNF	***	-	ns
HTE-Ø neg vs HTE-E7 LPS	***	***	ns
HTE-Ø neg vs HTE-E6E7 neg	***	**	***
HTE-Ø neg vs HTE-E6E7 TNF	***	-	***
HTE-Ø neg vs HTE-E6E7 LPS	***	ns	***
HTE-Ø TNF vs HTE-Ø LPS	***	-	ns
HTE-Ø TNF vs HTE-E6 neg	ns	-	***
HTE-Ø TNF vs HTE-E6 TNF	***	-	***
HTE-Ø TNF vs HTE-E6 LPS	***	-	***
HTE-Ø TNF vs HTE-E7 neg	ns	-	***
HTE-Ø TNF vs HTE-E7 TNF	ns	-	***
HTE-Ø TNF vs HTE-E7 LPS	***	-	***
HTE-Ø TNF vs HTE-E6E7 neg	**	-	***
HTE-Ø TNF vs HTE-E6E7 TNF	***	-	***
HTE-Ø TNF vs HTE-E6E7 LPS	***	-	***
HTE-Ø LPS vs HTE-E6 neg	*	***	***
HTE-Ø LPS vs HTE-E6 TNF	***	-	***
HTE-Ø LPS vs HTE-E6 LPS	***	***	***
HTE-Ø LPS vs HTE-E7 neg	***	***	***
HTE-Ø LPS vs HTE-E7 TNF	***	-	**
HTE-Ø LPS vs HTE-E7 LPS	***	***	ns
HTE-Ø LPS vs HTE-E6E7 neg	ns	***	***
HTE-Ø LPS vs HTE-E6E7 TNF	***	-	***
HTE-Ø LPS vs HTE-E6E7 LPS	***	***	***
HTE-E6 neg vs HTE-E6 TNF	***	-	***
HTE-E6 neg vs HTE-E6 LPS	***	***	***
HTE-E6 neg vs HTE-E7 neg	ns	***	***
HTE-E6 neg vs HTE-E7 TNF	***	-	***
HTE-E6 neg vs HTE-E7 LPS	***	***	***
HTE-E6 neg vs HTE-E6E7 neg	ns	ns	ns
HTE-E6 neg vs HTE-E6E7 TNF	***	-	***

HTE-E6 neg vs HTE-E6E7 LPS	***	**	***
HTE-E6 TNF vs HTE-E6 LPS	***	-	***
HTE-E6 TNF vs HTE-E7 neg	***	-	***
HTE-E6 TNF vs HTE-E7 TNF	***	-	***
HTE-E6 TNF vs HTE-E7 LPS	***	-	***
HTE-E6 TNF vs HTE-E6E7 neg	***	-	***
HTE-E6 TNF vs HTE-E6E7 TNF	ns	-	*
HTE-E6 TNF vs HTE-E6E7 LPS	***	-	***
HTE-E6 LPS vs HTE-E7 neg	***	***	***
HTE-E6 LPS vs HTE-E7 TNF	***	-	***
HTE-E6 LPS vs HTE-E7 LPS	***	***	***
HTE-E6 LPS vs HTE-E6E7 neg	***	***	***
HTE-E6 LPS vs HTE-E6E7 TNF	***	-	***
HTE-E6 LPS vs HTE-E6E7 LPS	***	***	*
HTE-E7 neg vs HTE-E7 TNF	ns	-	ns
HTE-E7 neg vs HTE-E7 LPS	***	***	*
HTE-E7 neg vs HTE-E6E7 neg	ns	***	***
HTE-E7 neg vs HTE-E6E7 TNF	***	-	***
HTE-E7 neg vs HTE-E6E7 LPS	***	**	***
HTE-E7 TNF vs HTE-E7 LPS	***	-	ns
HTE-E7 TNF vs HTE-E6E7 neg	***	-	***
HTE-E7 TNF vs HTE-E6E7 TNF	***	-	***
HTE-E7 TNF vs HTE-E6E7 LPS	***	-	***
HTE-E7 LPS vs HTE-E6E7 neg	***	***	***
HTE-E7 LPS vs HTE-E6E7 TNF	***	-	***
HTE-E7 LPS vs HTE-E6E7 LPS	***	***	***
HTE-E6E7 neg vs HTE-E6E7 TNF	***	-	***
HTE-E6E7 neg vs HTE-E6E7 LPS	***	***	***
HTE-E6E7 TNF vs HTE-E6E7 LPS	***	-	***

ns : não significativo;

* : p-valor $\leq 0,05$;

** : p-valor $\leq 0,01$;

*** : p-valor $\leq 0,01$.

- : não calculado

Tabela S2: Detalhamento da análise estatística das figuras 30 e 34. Expressão de IL-8 e IL-6 mediante tratamento com LPS e ODN, em células HTE.

Teste de Bonferroni	IL-8	IL-6
	p-valor	p-valor
HTE-Ø neg vs HTE-Ø LPS	ns	ns
HTE-Ø neg vs HTE-Ø 2216	*	ns
HTE-Ø neg vs HTE-Ø 2006	***	ns
HTE-Ø neg vs HTE-Ø 2315	***	ns
HTE-Ø neg vs HTE-E6 neg	***	***
HTE-Ø neg vs HTE-E6 LPS	***	***
HTE-Ø neg vs HTE-E6 2216	***	***
HTE-Ø neg vs HTE-E6 2006	***	***
HTE-Ø neg vs HTE-E6 2315	***	***
HTE-Ø neg vs HTE-E7 neg	***	***
HTE-Ø neg vs HTE-E7 LPS	***	ns
HTE-Ø neg vs HTE-E7 2216	***	***
HTE-Ø neg vs HTE-E7 2006	***	***
HTE-Ø neg vs HTE-E7 2315	***	***
HTE-Ø neg vs HTE-E6E7 neg	***	***
HTE-Ø neg vs HTE-E6E7 LPS	***	***
HTE-Ø neg vs HTE-E6E7 2216	***	***
HTE-Ø neg vs HTE-E6E7 2006	***	***
HTE-Ø neg vs HTE-E6E7 2315	***	***
HTE-Ø LPS vs HTE-Ø 2216	ns	ns
HTE-Ø LPS vs HTE-Ø 2006	ns	ns
HTE-Ø LPS vs HTE-Ø 2315	ns	ns
HTE-Ø LPS vs HTE-E6 neg	***	***
HTE-Ø LPS vs HTE-E6 LPS	***	***
HTE-Ø LPS vs HTE-E6 2216	***	***
HTE-Ø LPS vs HTE-E6 2006	***	***
HTE-Ø LPS vs HTE-E6 2315	***	***
HTE-Ø LPS vs HTE-E7 neg	***	*
HTE-Ø LPS vs HTE-E7 LPS	***	ns
HTE-Ø LPS vs HTE-E7 2216	***	***
HTE-Ø LPS vs HTE-E7 2006	***	*
HTE-Ø LPS vs HTE-E7 2315	***	***
HTE-Ø LPS vs HTE-E6E7 neg	***	***
HTE-Ø LPS vs HTE-E6E7 LPS	***	***
HTE-Ø LPS vs HTE-E6E7 2216	***	***
HTE-Ø LPS vs HTE-E6E7 2006	***	***
HTE-Ø LPS vs HTE-E6E7 2315	***	***
HTE-Ø 2216 vs HTE-Ø 2006	ns	ns

HTE-Ø 2216 vs HTE-Ø 2315	ns	ns
HTE-Ø 2216 vs HTE-E6 neg	***	***
HTE-Ø 2216 vs HTE-E6 LPS	***	***
HTE-Ø 2216 vs HTE-E6 2216	***	***
HTE-Ø 2216 vs HTE-E6 2006	***	***
HTE-Ø 2216 vs HTE-E6 2315	***	***
HTE-Ø 2216 vs HTE-E7 neg	***	**
HTE-Ø 2216 vs HTE-E7 LPS	***	ns
HTE-Ø 2216 vs HTE-E7 2216	***	***
HTE-Ø 2216 vs HTE-E7 2006	***	**
HTE-Ø 2216 vs HTE-E7 2315	***	***
HTE-Ø 2216 vs HTE-E6E7 neg	***	***
HTE-Ø 2216 vs HTE-E6E7 LPS	***	***
HTE-Ø 2216 vs HTE-E6E7 2216	***	***
HTE-Ø 2216 vs HTE-E6E7 2006	***	***
HTE-Ø 2216 vs HTE-E6E7 2315	***	***
HTE-Ø 2006 vs HTE-Ø 2315	ns	ns
HTE-Ø 2006 vs HTE-E6 neg	***	***
HTE-Ø 2006 vs HTE-E6 LPS	***	***
HTE-Ø 2006 vs HTE-E6 2216	***	***
HTE-Ø 2006 vs HTE-E6 2006	***	***
HTE-Ø 2006 vs HTE-E6 2315	***	***
HTE-Ø 2006 vs HTE-E7 neg	***	ns
HTE-Ø 2006 vs HTE-E7 LPS	***	ns
HTE-Ø 2006 vs HTE-E7 2216	***	***
HTE-Ø 2006 vs HTE-E7 2006	***	ns
HTE-Ø 2006 vs HTE-E7 2315	***	ns
HTE-Ø 2006 vs HTE-E6E7 neg	***	***
HTE-Ø 2006 vs HTE-E6E7 LPS	***	***
HTE-Ø 2006 vs HTE-E6E7 2216	***	***
HTE-Ø 2006 vs HTE-E6E7 2006	*	***
HTE-Ø 2006 vs HTE-E6E7 2315	***	***
HTE-Ø 2315 vs HTE-E6 neg	***	***
HTE-Ø 2315 vs HTE-E6 LPS	***	***
HTE-Ø 2315 vs HTE-E6 2216	***	***
HTE-Ø 2315 vs HTE-E6 2006	***	***
HTE-Ø 2315 vs HTE-E6 2315	***	***
HTE-Ø 2315 vs HTE-E7 neg	***	ns
HTE-Ø 2315 vs HTE-E7 LPS	***	ns
HTE-Ø 2315 vs HTE-E7 2216	***	***
HTE-Ø 2315 vs HTE-E7 2006	***	ns
HTE-Ø 2315 vs HTE-E7 2315	***	**

HTE-Ø 2315 vs HTE-E6E7 neg	***	***
HTE-Ø 2315 vs HTE-E6E7 LPS	***	***
HTE-Ø 2315 vs HTE-E6E7 2216	***	***
HTE-Ø 2315 vs HTE-E6E7 2006	*	***
HTE-Ø 2315 vs HTE-E6E7 2315	***	***
HTE-E6 neg vs HTE-E6 LPS	ns	ns
HTE-E6 neg vs HTE-E6 2216	***	***
HTE-E6 neg vs HTE-E6 2006	***	***
HTE-E6 neg vs HTE-E6 2315	***	***
HTE-E6 neg vs HTE-E7 neg	***	***
HTE-E6 neg vs HTE-E7 LPS	***	***
HTE-E6 neg vs HTE-E7 2216	***	***
HTE-E6 neg vs HTE-E7 2006	***	***
HTE-E6 neg vs HTE-E7 2315	***	***
HTE-E6 neg vs HTE-E6E7 neg	ns	***
HTE-E6 neg vs HTE-E6E7 LPS	ns	***
HTE-E6 neg vs HTE-E6E7 2216	***	***
HTE-E6 neg vs HTE-E6E7 2006	***	***
HTE-E6 neg vs HTE-E6E7 2315	ns	***
HTE-E6 LPS vs HTE-E6 2216	***	***
HTE-E6 LPS vs HTE-E6 2006	***	***
HTE-E6 LPS vs HTE-E6 2315	***	***
HTE-E6 LPS vs HTE-E7 neg	***	***
HTE-E6 LPS vs HTE-E7 LPS	***	***
HTE-E6 LPS vs HTE-E7 2216	***	***
HTE-E6 LPS vs HTE-E7 2006	***	***
HTE-E6 LPS vs HTE-E7 2315	***	***
HTE-E6 LPS vs HTE-E6E7 neg	ns	***
HTE-E6 LPS vs HTE-E6E7 LPS	ns	***
HTE-E6 LPS vs HTE-E6E7 2216	***	***
HTE-E6 LPS vs HTE-E6E7 2006	***	***
HTE-E6 LPS vs HTE-E6E7 2315	ns	***
HTE-E6 2216 vs HTE-E6 2006	ns	***
HTE-E6 2216 vs HTE-E6 2315	ns	ns
HTE-E6 2216 vs HTE-E7 neg	***	***
HTE-E6 2216 vs HTE-E7 LPS	***	***
HTE-E6 2216 vs HTE-E7 2216	***	***
HTE-E6 2216 vs HTE-E7 2006	***	***
HTE-E6 2216 vs HTE-E7 2315	***	***
HTE-E6 2216 vs HTE-E6E7 neg	***	***
HTE-E6 2216 vs HTE-E6E7 LPS	***	***
HTE-E6 2216 vs HTE-E6E7 2216	ns	ns
HTE-E6 2216 vs HTE-E6E7 2006	***	***

HTE-E6 2216 vs HTE-E6E7 2315	***	***
HTE-E6 2006 vs HTE-E6 2315	ns	***
HTE-E6 2006 vs HTE-E7 neg	***	***
HTE-E6 2006 vs HTE-E7 LPS	ns	***
HTE-E6 2006 vs HTE-E7 2216	***	***
HTE-E6 2006 vs HTE-E7 2006	***	***
HTE-E6 2006 vs HTE-E7 2315	***	***
HTE-E6 2006 vs HTE-E6E7 neg	***	***
HTE-E6 2006 vs HTE-E6E7 LPS	***	***
HTE-E6 2006 vs HTE-E6E7 2216	***	***
HTE-E6 2006 vs HTE-E6E7 2006	***	***
HTE-E6 2006 vs HTE-E6E7 2315	***	***
HTE-E6 2315 vs HTE-E7 neg	***	***
HTE-E6 2315 vs HTE-E7 LPS	***	***
HTE-E6 2315 vs HTE-E7 2216	***	***
HTE-E6 2315 vs HTE-E7 2006	***	***
HTE-E6 2315 vs HTE-E7 2315	***	***
HTE-E6 2315 vs HTE-E6E7 neg	***	***
HTE-E6 2315 vs HTE-E6E7 LPS	***	***
HTE-E6 2315 vs HTE-E6E7 2216	ns	ns
HTE-E6 2315 vs HTE-E6E7 2006	***	***
HTE-E6 2315 vs HTE-E6E7 2315	***	***
HTE-E7 neg vs HTE-E7 LPS	***	ns
HTE-E7 neg vs HTE-E7 2216	ns	***
HTE-E7 neg vs HTE-E7 2006	***	ns
HTE-E7 neg vs HTE-E7 2315	***	ns
HTE-E7 neg vs HTE-E6E7 neg	***	***
HTE-E7 neg vs HTE-E6E7 LPS	***	***
HTE-E7 neg vs HTE-E6E7 2216	***	***
HTE-E7 neg vs HTE-E6E7 2006	***	***
HTE-E7 neg vs HTE-E6E7 2315	***	***
HTE-E7 LPS vs HTE-E7 2216	***	***
HTE-E7 LPS vs HTE-E7 2006	***	ns
HTE-E7 LPS vs HTE-E7 2315	***	**
HTE-E7 LPS vs HTE-E6E7 neg	***	***
HTE-E7 LPS vs HTE-E6E7 LPS	***	***
HTE-E7 LPS vs HTE-E6E7 2216	***	***
HTE-E7 LPS vs HTE-E6E7 2006	***	***
HTE-E7 LPS vs HTE-E6E7 2315	***	***
HTE-E7 2216 vs HTE-E7 2006	***	***
HTE-E7 2216 vs HTE-E7 2315	***	*
HTE-E7 2216 vs HTE-E6E7 neg	***	***

HTE-E7 2216 vs HTE-E6E7 LPS	***	***
HTE-E7 2216 vs HTE-E6E7 2216	***	***
HTE-E7 2216 vs HTE-E6E7 2006	***	***
HTE-E7 2216 vs HTE-E6E7 2315	***	***
HTE-E7 2006 vs HTE-E7 2315	***	ns
HTE-E7 2006 vs HTE-E6E7 neg	***	***
HTE-E7 2006 vs HTE-E6E7 LPS	***	***
HTE-E7 2006 vs HTE-E6E7 2216	***	***
HTE-E7 2006 vs HTE-E6E7 2006	***	***
HTE-E7 2006 vs HTE-E6E7 2315	***	***
HTE-E7 2315 vs HTE-E6E7 neg	***	***
HTE-E7 2315 vs HTE-E6E7 LPS	***	***
HTE-E7 2315 vs HTE-E6E7 2216	***	***
HTE-E7 2315 vs HTE-E6E7 2006	***	***
HTE-E7 2315 vs HTE-E6E7 2315	***	***
HTE-E6E7 neg vs HTE-E6E7 LPS	ns	ns
HTE-E6E7 neg vs HTE-E6E7 2216	***	***
HTE-E6E7 neg vs HTE-E6E7 2006	***	ns
HTE-E6E7 neg vs HTE-E6E7 2315	ns	***
HTE-E6E7 LPS vs HTE-E6E7 2216	**	***
HTE-E6E7 LPS vs HTE-E6E7 2006	***	***
HTE-E6E7 LPS vs HTE-E6E7 2315	ns	ns
HTE-E6E7 2216 vs HTE-E6E7 2006	***	***
HTE-E6E7 2216 vs HTE-E6E7 2315	***	***
HTE-E6E7 2006 vs HTE-E6E7 2315	***	***

Tabela S3: Detalhamento da análise estatística das figuras 31 e 35. Expressão de IL-8 e IL-6 mediante expressão heteróloga de componentes da via de TLR.

Teste de Bonferroni	IL-8	IL-6
	p-valor	p-valor
HTE-Ø Neg vs HTE-Ø pcDNA3	***	***
HTE-Ø Neg vs HTE-Ø MyD88	***	***
HTE-Ø Neg vs HTE-Ø IKKa+IKKb	***	***
HTE-Ø Neg vs HTE-Ø IKKe+TBK1	***	***
HTE-Ø Neg vs HTE-Ø IKKe	***	***
HTE-Ø Neg vs HTE-Ø IKKe Nterm	***	***
HTE-Ø Neg vs HTE-E6 Neg	***	***
HTE-Ø Neg vs HTE-E6 pcDNA3	***	***
HTE-Ø Neg vs HTE-E6 MyD88	***	***
HTE-Ø Neg vs HTE-E6 IKKa+IKKb	***	***
HTE-Ø Neg vs HTE-E6 IKKe+TBK1	***	***
HTE-Ø Neg vs HTE-E6 IKKe	***	***
HTE-Ø Neg vs HTE-E6 IKKe Nterm	***	***
HTE-Ø pcDNA3 vs HTE-Ø MyD88	***	***
HTE-Ø pcDNA3 vs HTE-Ø IKKa+IKKb	***	*
HTE-Ø pcDNA3 vs HTE-Ø IKKe+TBK1	ns	**
HTE-Ø pcDNA3 vs HTE-Ø IKKe	*	***
HTE-Ø pcDNA3 vs HTE-Ø IKKe Nterm	***	ns
HTE-Ø pcDNA3 vs HTE-E6 Neg	**	ns
HTE-Ø pcDNA3 vs HTE-E6 pcDNA3	***	***
HTE-Ø pcDNA3 vs HTE-E6 MyD88	***	***
HTE-Ø pcDNA3 vs HTE-E6 IKKa+IKKb	***	***
HTE-Ø pcDNA3 vs HTE-E6 IKKe+TBK1	***	***
HTE-Ø pcDNA3 vs HTE-E6 IKKe	***	***
HTE-Ø pcDNA3 vs HTE-E6 IKKe Nterm	***	***
HTE-Ø MyD88 vs HTE-Ø IKKa+IKKb	**	ns
HTE-Ø MyD88 vs HTE-Ø IKKe+TBK1	***	ns
HTE-Ø MyD88 vs HTE-Ø IKKe	***	ns
HTE-Ø MyD88 vs HTE-Ø IKKe Nterm	***	***
HTE-Ø MyD88 vs HTE-E6 Neg	***	***
HTE-Ø MyD88 vs HTE-E6 pcDNA3	***	***
HTE-Ø MyD88 vs HTE-E6 MyD88	***	***
HTE-Ø MyD88 vs HTE-E6 IKKa+IKKb	***	***
HTE-Ø MyD88 vs HTE-E6 IKKe+TBK1	***	***
HTE-Ø MyD88 vs HTE-E6 IKKe	***	***
HTE-Ø MyD88 vs HTE-E6 IKKe Nterm	***	***
HTE-Ø IKKa+IKKb vs HTE-Ø IKKe+TBK1	***	ns
HTE-Ø IKKa+IKKb vs HTE-Ø IKKe	***	ns

HTE-Ø IKKa+IKKb vs HTE-Ø IKKe Nterm	***	ns
HTE-Ø IKKa+IKKb vs HTE-E6 Neg	***	***
HTE-Ø IKKa+IKKb vs HTE-E6 pcDNA3	***	***
HTE-Ø IKKa+IKKb vs HTE-E6 MyD88	ns	***
HTE-Ø IKKa+IKKb vs HTE-E6 IKKa+IKKb	***	***
HTE-Ø IKKa+IKKb vs HTE-E6 IKKe+TBK1	***	***
HTE-Ø IKKa+IKKb vs HTE-E6 IKKe	***	***
HTE-Ø IKKa+IKKb vs HTE-E6 IKKe Nterm	***	***
HTE-Ø IKKe+TBK1 vs HTE-Ø IKKe	ns	ns
HTE-Ø IKKe+TBK1 vs HTE-Ø IKKe Nterm	***	ns
HTE-Ø IKKe+TBK1 vs HTE-E6 Neg	*	***
HTE-Ø IKKe+TBK1 vs HTE-E6 pcDNA3	***	***
HTE-Ø IKKe+TBK1 vs HTE-E6 MyD88	***	***
HTE-Ø IKKe+TBK1 vs HTE-E6 IKKa+IKKb	***	***
HTE-Ø IKKe+TBK1 vs HTE-E6 IKKe+TBK1	***	***
HTE-Ø IKKe+TBK1 vs HTE-E6 IKKe	***	***
HTE-Ø IKKe+TBK1 vs HTE-E6 IKKe Nterm	***	***
HTE-Ø IKKe vs HTE-Ø IKKe Nterm	***	***
HTE-Ø IKKe vs HTE-E6 Neg	ns	***
HTE-Ø IKKe vs HTE-E6 pcDNA3	***	***
HTE-Ø IKKe vs HTE-E6 MyD88	***	***
HTE-Ø IKKe vs HTE-E6 IKKa+IKKb	***	***
HTE-Ø IKKe vs HTE-E6 IKKe+TBK1	***	***
HTE-Ø IKKe vs HTE-E6 IKKe	***	***
HTE-Ø IKKe vs HTE-E6 IKKe Nterm	***	***
HTE-Ø IKKe Nterm vs HTE-E6 Neg	***	*
HTE-Ø IKKe Nterm vs HTE-E6 pcDNA3	***	***
HTE-Ø IKKe Nterm vs HTE-E6 MyD88	***	***
HTE-Ø IKKe Nterm vs HTE-E6 IKKa+IKKb	***	***
HTE-Ø IKKe Nterm vs HTE-E6 IKKe+TBK1	***	***
HTE-Ø IKKe Nterm vs HTE-E6 IKKe	***	***
HTE-Ø IKKe Nterm vs HTE-E6 IKKe Nterm	***	***
HTE-E6 Neg vs HTE-E6 pcDNA3	***	***
HTE-E6 Neg vs HTE-E6 MyD88	***	***
HTE-E6 Neg vs HTE-E6 IKKa+IKKb	***	***
HTE-E6 Neg vs HTE-E6 IKKe+TBK1	***	***
HTE-E6 Neg vs HTE-E6 IKKe	***	***
HTE-E6 Neg vs HTE-E6 IKKe Nterm	***	***
HTE-E6 pcDNA3 vs HTE-E6 MyD88	***	***
HTE-E6 pcDNA3 vs HTE-E6 IKKa+IKKb	***	***
HTE-E6 pcDNA3 vs HTE-E6 IKKe+TBK1	***	ns
HTE-E6 pcDNA3 vs HTE-E6 IKKe	***	**
HTE-E6 pcDNA3 vs HTE-E6 IKKe Nterm	***	***

HTE-E6 MyD88 vs HTE-E6 IKKa+IKKb	***	***
HTE-E6 MyD88 vs HTE-E6 IKKe+TBK1	***	***
HTE-E6 MyD88 vs HTE-E6 IKKe	***	***
HTE-E6 MyD88 vs HTE-E6 IKKe Nterm	***	***
HTE-E6 IKKa+IKKb vs HTE-E6 IKKe+TBK1	***	**
HTE-E6 IKKa+IKKb vs HTE-E6 IKKe	***	ns
HTE-E6 IKKa+IKKb vs HTE-E6 IKKe Nterm	***	***
HTE-E6 IKKe+TBK1 vs HTE-E6 IKKe	ns	ns
HTE-E6 IKKe+TBK1 vs HTE-E6 IKKe Nterm	***	***
HTE-E6 IKKe vs HTE-E6 IKKe Nterm	***	***

ns: não significativo;

* : p-valor $\leq 0,05$;

** : p-valor $\leq 0,01$;

*** : p-valor $\leq 0,01$.

LISTA DE ANEXOS

Anexo A– Súmula Curricular

Anexo B– Artigo publicado no periódico *Journal of Genral Virology*. *Polymorphism in the promoter region of the Toll-like receptor 9 gene and cervical human papillomavirus infection*. Volume 94, páginas 1858-64, Agosto de 2013. Acesso aberto.

ANEXO A - SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Lucas Boeno Oliveira

Local e data de nascimento: Ipatinga, Minas Gerais, 08 de agosto de 1988

EDUCAÇÃO

Colégio São Francisco Xavier, Ipatinga, Minas Gerais, 2005.

Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2010.
Graduação: Bacharelado em Bioquímica.

Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
Doutorado direto em Ciências Biológicas (Bioquímica), em curso.
Vias de transdução de sinal e polimorfismo de *Toll-like Receptors* na carcinogênese por HPV
Orientadora: Luisa Lina Villa

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Citometria de Fluxo no Citômetro Attune (Applied Biosystems). São Paulo-SP, 2015.

Biossegurança na Pesquisa com Organismos Geneticamente Modificados (OGMs). São Paulo-SP, 2013.

Espectrometria de massas associada à proteômica: aplicações em genética. Águas de Lindóia-SP, 2013.

Biotecnologia Aplicada para Produção de Produtos Industrializados. Águas de Lindóia-SP, 2009.

IV Curso de Verão em Bioquímica e Biologia Molecular. São Paulo-SP, 2009.

Proteômica e Peptidômica como Ferramentas Moleculares. Viçosa-MG, 2008.

Fisiologia para Ciências da Saúde. Viçosa-MG, 2008.

Bioinformática para Análises Genômicas. Viçosa-MG, 2007.

OCUPAÇÃO

Bolsista de Doutorado, FAPESP, 01/02/2011 a 31/07/2015

PUBLICAÇÕES (Artigos Completos e Resumos em Congressos)

OLIVEIRA, L. B.; FOLGUEIRA, M. A. A. K. Biomarcadores no Câncer (Capítulo de livro) Em: Fundamentos de Oncologia Molecular. 1 ed. Saito, R. ; Lana, M. ; Medrano, R. ; Chammas, R. (Org.). São Paulo : Atheneu, 2015, p. 315-328.

OLIVEIRA, L. B. ; LOUVANTO, K. ; RAMANAKUMAR, A. V. ; FRANCO, E. L. ; VILLA, L. L. . Polymorphism in the promoter region of the Toll-like receptor 9 gene and cervical human papillomavirus infection. Journal of General Virology, v. 94, p. 1858-1864, 2013.

REIS, P. A. A. ; ROSADO, G. L. ; SILVA, L. A. C. ; OLIVEIRA, L. C. ; OLIVEIRA, L. B. ; COSTA, M. D. L. ; ALVIM, F. C. ; FONTES, E. P. B. . The Binding Protein BiP Attenuates Stress-Induced Cell Death in Soybean via Modulation of the N-Rich Protein-Mediated Signaling Pathway. Plant Physiology, v. 157, p. 1853-1865, 2011.

OLIVEIRA, L. ; MORALE, M. ; BOCCARDO, E. ; VILLA, L. . E6 oncoprotein from HPV16 targets the Toll-like Receptors pathway. Em: The DNA Tumor Virus Meeting, 2014, Madison (WI), E.U.A.

OLIVEIRA, L. B. ; MORALE, M. G. ; VILLA, L. L. . Study of Toll-like Receptors influence on HPV infection. Em: 59º Congresso Brasileiro de Genética, 2013, Águas de Lindóia, Brasil.

CARPINETTI, P. A. ; OLIVEIRA, L. B. ; SANTOS, A. A. ; FIETTO, L. G. ; RAMOS, J.R.L.S. ; FONTES, E. P. B. . Protective Roles of Soybean BiP against Abiotic Stresses in the Model System *Arabidopsis thaliana*. Em: XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2010, Foz do Iguaçu, Brasil.

OLIVEIRA, L. B. ; PINHEIRO, G. L. ; SANTOS, A. A. ; FIETTO, L. G. ; FONTES, E. P. B. . Functional Characterization and Expression Analysis of Soybean NAC Transfators at Protein Level in Nucleus. Em: XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2010, Foz do Iguaçu, Brasil.

CARPINETTI, P. A. ; OLIVEIRA, L. B. ; FARIAS, J. A. Q. A. ; SANTOS, A.A. ; FONTES, E. P. B. . Efeito Protetor de Bipd de Soja Contra Estresse Abiótico em *Arabidopsis*. Em: XIX Simpósio de Iniciação Científica da UFV, 2009, Viçosa, Brasil.

FONSECA, L.M. ; ZANARDO, L.G. ; TESSAROLLO, N.G. ; CARPINETTI, P.A. ; OLIVEIRA, L. B. ; FIETTO, L. G. . Caracterização de Purificação Parcial de Amilase de

Trigo da Espécie *Triticum aestivum*. Em: XIX Simpósio de Iniciação Científica da UFV, 2009, Viçosa, Brasil.

OLIVEIRA, L. B. ; PINHEIRO, G. L. ; SANTOS, A.A. ; FIETTO, L. G. ; FONTES, E. P. B. . Expressão Heteróloga e Obtenção de Soro Policlonal Contra Transfatores NACs de Soja. Em: Simpósio de Iniciação Científica da UFV, 2009, Viçosa, Brasil.

OLIVEIRA, L. B. ; FARIAS, J. A. Q. A. ; SANTOS, A.A. ; FIETTO, L. G. ; FONTES, E. P. B. . Expressão Heteróloga e Caracterização Funcional de Transfatores NAC de Soja. Em: 55º Congresso Brasileiro de Genética, 2009, Águas de Lindóia, Brasil.

OLIVEIRA, L. B. ; MARQUES, C. S. ; PINHEIRO, G. L. ; FONTES, E. P. B. ; FIETTO, L. G. . Caracterização Molecular e Funcional dos Transfatores GmNAC1, GmNAC6 e GmNAC6 de Soja (*Glynice max*). Em: Simpósio de Iniciação Científica da UFV, 2008, Viçosa, Brasil.

OLIVEIRA, L. B. ; PINHEIRO, G. L. ; FIETTO, L. G. ; FONTES, E. P. B. . Purificação em Sistema de Expressão Heterólogo e Obtenção de Antissoro Policlonal de Transfatores da Família NAC de Soja (*Glynice max*). Em: Simpósio de Iniciação Científica da UFV, 2008, Viçosa, Brasil.

ANEXO B – ARTIGO PUBLICADO NO PERÍODO
JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY

Polymorphism in the promoter region of the Toll-like receptor 9 gene and cervical human papillomavirus infection

Lucas Boeno Oliveira,^{1†} Karolina Louvanto,^{2†}
Agnihotram V. Ramanakumar,² Eduardo L. Franco,² Luisa L. Villa^{1,3}
and for the Ludwig–McGill Cohort Study

Correspondence

Luisa L. Villa

luisa.villa@icesp.org.br

¹Center of Investigation in Translational Oncology, Instituto do Câncer de Estado de São Paulo, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

²Division of Cancer Epidemiology, McGill University, Montreal, Quebec, H2W 1S6 Canada

³HPV Institute, School of Medicine, Santa Casa de São Paulo, and Dept Radiology and Basic Oncology, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Polymorphism in the Toll-like receptor (TLR) 9 gene has been shown to have a significant role in some diseases; however, little is known about its possible role in the natural history of human papillomavirus (HPV) infections. We investigated the association between a single-nucleotide polymorphism (SNP) (rs5743836) in the promoter region of TLR9 (T1237C) and type-specific HPV infections. Specimens were derived from a cohort of 2462 women enrolled in the Ludwig–McGill Cohort Study. We randomly selected 500 women who had a cervical HPV infection detected at least once during the study as cases. We defined two control groups: (i) a random sample of 300 women who always tested HPV negative, and (ii) a sample of 234 women who were always HPV negative but had a minimum of ten visits during the study. TLR9 genotyping was performed using bidirectional PCR amplification of specific alleles. Irrespective of group, the WT homozygous TLR9 genotype (TT) was the most common form, followed by the heterozygous (TC) and the mutant homozygous (CC) forms. There were no consistent associations between polymorphism and infection risk, either overall or by type or species. Likewise, there were no consistently significant associations between polymorphism and HPV clearance or persistence. We concluded that this polymorphism in the promoter region of TLR9 gene does not seem to have a mediating role in the natural history of the HPV infection.

Received 25 February 2013

Accepted 9 May 2013

INTRODUCTION

Persistent human papillomavirus (HPV) infection is a key early event in cervical carcinogenesis (Schlecht *et al.*, 2001). Infection acquisition and persistence are dependent on the host immune system. Toll-like receptors (TLRs) are expressed constitutively in host cells and permit the recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), which are essential in host defence mechanisms. The clinical interest in TLRs in terms of cancer therapies is increasing. Agents that activate TLRs, either alone or more likely in conjunction with other therapies, including radiotherapy and chemotherapy, may have great potential as new cancer treatments. Similarly, the inhibition of certain TLRs in tumours associated with inflammation may lead to new therapies (Corr & O'Neill, 2009).

It has been shown that HPV modulates the expression of TLR at the transcriptional level, and this can be an

important feature to avoid host defences (Hasan *et al.*, 2007). The promoter sequence of a gene determines its transcription, and a single-nucleotide polymorphism (SNP) can alter the gene expression and consequently the host's susceptibility or resistance to diseases. A number of genetic association studies suggest that TLR polymorphisms can alter the response to PAMPs and may be associated with susceptibility to different diseases (Misch & Hawn, 2008; Netea *et al.*, 2012).

The rs5743836 polymorphism on the promoter region of TLR9 gene (T1237C) is related to susceptibility to allergic aspergillosis (Carvalho *et al.*, 2008), non-Hodgkin's lymphoma (Carvalho *et al.*, 2012), *Helicobacter pylori*-induced gastric disease (Ng *et al.*, 2010), atopic eczema (Novak *et al.*, 2007) and chronic kidney disease (Lu *et al.*, 2011). This SNP creates a putative NFκB-binding site, increasing the gene transcription due to the action of this transcriptional factor (Ng *et al.*, 2010). The activity of NFκB is inhibited by HPV16 oncoproteins E6 and E7;

†These authors contributed equally to this work.

however, when activated, NF κ B inhibits proliferation and immortalization (Vandermark *et al.*, 2012). HPV persistence seems to be associated with low IL-6 levels (Rosa *et al.*, 2012), and the rs5743836 polymorphism creates a novel IL-6-binding site, increasing the transcription and creating a loop of TLR9/IL-6 signalling amplification (Carvalho *et al.*, 2011).

Furthermore, the expression of E6 and E7 oncoproteins from high-risk HPV types, but not from low-risk HPVs, inhibits the activation of TLR9 by CpG motifs in human keratinocytes and reduces production of TLR9 mRNA (Hasan *et al.*, 2007). Studies that relate the mRNA expression of TLRs and HPV infection have observed that HPV16 infections that regressed were significantly associated with increased expression of TLR2, TLR3, TLR7, TLR8 and TLR9 (Daud *et al.*, 2011). This suggests that the modulation of immune responses triggered by TLR9 may play an important role in the immune response against HPV and may affect infection risk or clearance. With this rationale in mind, we investigated whether the rs5743836 SNP polymorphism in the promoter region of TLR9 mediates the natural history of HPV infection among women enrolled in the Ludwig–McGill Cohort Study.

RESULTS

The cumulative risk of type-specific HPV infection according to the different TLR9 genotypes is shown in Table 1. Among the 500 ever-positive HPV cases, the following HPV genotypes were the most common: HPV16 (22.8 %), HPV53 (15.2 %), HPV51 (11.4 %) and HPV84 (11.0 %). *Alphapapillomavirus* 9 (46.4 %) was the most common species followed by *Alphapapillomavirus* 3 (27.4 %) and 7 (26.6 %). Although there was considerable variation in prevalence of TLR9 genotypes among cases, there were no noteworthy variations in type- or species-specific HPV prevalence among these genotypes.

Table 2 shows the age-adjusted odds ratios (ORs) of cumulative risk of selected type- and species-specific HPV infections according to putative TLR9 phenotypes and control group contrast. There were significant increases in risk for HPV6/11, -35 and -89 with the dominant model. With the recessive model, the only significant result was seen with HPV61. The only type with reduced risk was HPV73, observable with sufficient precision only in the dominant model. The magnitude of the associations did not change materially when contrasting with the more restricted control group, which had greater HPV detection opportunity because of the longer follow-up. This was also the situation when comparing with both control groups pooled together (data not shown). Among HPV species, risk of *Alphapapillomavirus* 10 HPVs was significantly elevated because of the preponderance of the effect due to HPV6/11. An analysis of the subset of cases that developed cervical cytological abnormalities did not reveal any associations with risk (data not shown).

Another potential effect for a mediating role of TLR9 polymorphism would be via a delayed or accelerated clearance of HPV infections among women who had prevalent or incident infections with given HPV types. Table 3 shows the hazard ratios (HRs) of type-specific HPV clearance by putative TLR9 phenotypes according to two different levels of stringency in defining clearance of infection events. In the dominant model, the only significant result was seen with the most stringent definition (two consecutive negative visits following HPV positivity) and HPV59 showing a decreased clearance with HR=0.32 (95 % CI 0.10–0.98). In the recessive model, a significant five- to sevenfold increase in rate of clearance was seen with both definitions for HPV51. Accelerated clearance was also seen for HPV56 and -58 with the recessive model. There were no significant associations when grouping types within HPV species. The HPV clearance with any HPV type and the TLR9 genotypes are shown in Fig. 1.

Except for a significant protection against *Alphapapillomavirus* 9 species infections with the dominant model (HR=0.56, 95 % CI 0.34–0.95), there were no associations between TLR9 phenotypes and type-specific HPV persistence (data not shown).

In the analyses restricted to women with a high likelihood of exposure to HPV, the only significant type-specific association was a protective effect for HPV73 (OR=0.22; 95 % CI 0.05–0.96) in the dominant model; no significant associations between TLR9 genotype and HPV clearance were observed (data not shown).

DISCUSSION

We analysed the role of a SNP (rs5743836) in the promoter region of the TLR9 gene (T1237C) and its association with risk of acquisition and clearance of type-specific HPV infection using a case–control sampling strategy within the Ludwig–McGill Cohort Study. A previous study found a different TLR9 variant (SNP rs352140) to be a risk factor for cervical cancer (Roszak *et al.*, 2012), whilst another failed to detect such an association (Pandey *et al.*, 2011). Other studies on TLR9 and cervical HPV have focused on expression levels of TLR9 among HPV16-positive pre-cancerous or cancerous cervical lesions (Daud *et al.*, 2011; Hasimu *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2007; Pandey *et al.*, 2011; Weng *et al.*, 2011).

The most common TLR9 genotype (T1237C) was TT followed by TC and CC. We found no evidence of substantial variation among these genotypes with respect to type- or group-specific HPV infection risk. Admittedly, the low prevalence of some types and the rarity of the CC genotype precluded a more robust assessment. The only significant result with our analyses restricted to women with high likelihood of exposure to HPV was on the protective effect of HPV73 in the dominant model, but the

Table 1. Cumulative risk of type-specific HPV infection in the entire cohort and among cases, and according to TLR9 genotype among cases

Genotype/species	Overall positivity in whole cohort (%) (n=2462)	Overall positivity among cases (%) (n=500)	HPV positivity by TLR9 genotype (%)			
			TT (%) (n=307)	TC (%) (n=165)	CC (%) (n=17)	NA (%) (n=11)
HPV genotype						
6/11	109 (4.43)	46 (9.2)	22 (7.2)	21 (12.7)	3 (17.7)	0 (0)
16	286 (11.6)	114 (22.8)	72 (23.5)	35 (21.2)	5 (29.4)	2 (18.2)
18	90 (3.7)	35 (7.0)	25 (8.1)	10 (6.1)	0 (0)	0 (0)
26	19 (0.8)	6 (1.2)	2 (0.7)	3 (1.8)	1 (5.9)	0 (0)
31	106 (4.3)	37 (7.4)	23 (7.5)	13 (7.9)	0 (0)	1 (9.1)
32	10 (0.4)	2 (0.4)	1 (0.3)	1 (0.6)	0 (0)	0 (0)
33	52 (2.1)	21 (4.2)	10 (3.3)	9 (5.5)	2 (11.8)	0 (0)
34	2 (0.1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
35	82 (3.3)	30 (6.0)	12 (3.9)	16 (9.7)	1 (5.9)	1 (9.1)
39	49 (2.0)	18 (3.6)	10 (3.3)	8 (4.9)	0 (0)	0 (0)
40	44 (1.8)	20 (4.0)	12 (3.9)	8 (4.9)	0 (0)	0 (0)
42	32 (1.3)	13 (2.6)	7 (2.3)	6 (3.6)	0 (0)	0 (0)
44	11 (0.5)	4 (0.8)	2 (0.7)	1 (0.6)	1 (5.9)	0 (0)
45	85 (3.5)	34 (6.8)	21 (6.8)	9 (5.5)	3 (17.7)	1 (9.1)
51	161 (6.5)	57 (11.4)	36 (11.7)	17 (10.3)	3 (17.7)	1 (9.1)
52	115 (4.7)	47 (9.4)	30 (9.8)	13 (7.9)	2 (11.8)	2 (18.2)
53	184 (7.5)	76 (15.2)	43 (14.0)	28 (17.0)	1 (5.9)	4 (36.4)
54	76 (3.1)	37 (7.4)	19 (6.2)	17 (10.3)	1 (5.9)	0 (0)
55	94 (3.8)	38 (7.6)	19 (6.2)	16 (9.7)	3 (17.7)	0 (0)
56	71 (2.9)	27 (5.4)	12 (3.9)	14 (8.5)	1 (5.9)	0 (0)
57	6 (0.2)	4 (0.8)	1 (0.3)	3 (1.8)	0 (0)	0 (0)
58	119 (4.8)	43 (8.6)	29 (9.5)	13 (7.9)	1 (5.9)	0 (0)
59	69 (2.8)	26 (5.2)	13 (4.2)	10 (6.1)	1 (5.9)	2 (18.2)
61	65 (2.6)	26 (5.2)	19 (6.2)	3 (1.8)	4 (23.5)	0 (0)
62	55 (2.2)	23 (4.6)	11 (3.6)	11 (6.7)	1 (5.9)	0 (0)
64	2 (0.1)	1 (0.2)	0 (0)	1 (0.6)	0	0 (0)
66	64 (2.6)	22 (4.4)	11 (3.6)	9 (5.5)	1 (5.9)	1 (9.1)
67	9 (0.4)	5 (1.0)	5 (1.6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
68	73 (3.0)	27 (5.4)	13 (4.2)	10 (6.1)	3 (17.7)	1 (9.1)
69	6 (0.2)	3 (0.6)	2 (0.7)	1 (0.6)	0 (0)	0 (0)
70	46 (1.9)	19 (3.8)	12 (3.9)	6 (3.6)	1 (5.9)	0 (0)
71	40 (1.6)	18 (3.6)	14 (4.6)	4 (2.4)	0 (0)	0 (0)
72	17 (0.7)	9 (1.8)	4 (1.3)	4 (2.4)	0 (0)	1 (9.1)
73	62 (2.5)	29 (5.8)	23 (7.5)	5 (3.0)	0 (0)	1 (9.1)
81	39 (1.6)	20 (4.0)	11 (3.6)	8 (4.9)	1 (5.9)	0 (0)
82	17 (0.7)	4 (0.8)	4 (1.3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
83	54 (2.2)	20 (4.0)	11 (3.6)	9 (5.5)	0 (0)	0 (0)
84	122 (5.0)	55 (11.0)	30 (9.8)	21 (12.7)	3 (17.7)	1 (9.1)
89	25 (1.0)	8 (1.6)	2 (0.7)	5 (3.0)	1 (5.9)	0 (0)
Any HPV	1194 (48.5)	500 (100)	299 (97.4)	162 (98.2)	17(100)	11 (100)
Alphapapillomavirus species*						
Species 3	322 (13.1)	137 (27.4)	80 (26.1)	48 (29.1)	7 (41.2)	2 (18.2)
Species 5	194 (7.9)	68 (13.6)	42 (13.7)	21 (12.7)	4 (23.5)	1 (9.1)
Species 6	287 (11.7)	114 (22.8)	62 (20.2)	44 (26.7)	3 (17.7)	5 (45.5)
Species 7	341 (13.9)	133 (26.6)	76 (24.8)	47 (28.5)	6 (35.3)	4 (36.4)
Species 9	586 (23.8)	232 (46.4)	143 (46.6)	73 (44.2)	10 (58.8)	6 (54.6)
Species 10	199 (8.1)	81 (16.2)	41 (13.4)	35 (21.2)	5 (29.4)	0 (0)

NA, Not applicable.

*Species 3 (HPV61, -72, -62, -81, -83, -84 and -89); species 5 (HPV82, -26, -69 and -51); species 6 (HPV82, -26, -69 and -51); species 7 (HPV18, -39, -45, -59, -68 and -70); species 9 (HPV16, -31, -33, -35, -52, -58, -67); species 10 (HPV6, -11, -44 and -55).

Table 2. Age-adjusted ORs of cumulative risk of selected type-specific HPV infections according to putative TLR9 phenotype

Significant associations are highlighted in bold.

Genotype/species	HPV-positive vs random sample of HPV-negative women		HPV-positive vs HPV-negative who completed a minimum of ten visits	
	Dominant model*	Recessive model†	Dominant model*	Recessive model†
	OR (95 % CI)	OR (95 % CI)	OR (95 % CI)	OR (95 % CI)
HPV genotype				
6/11	1.82 (0.99–3.32)	1.53 (0.44–5.27)	1.88 (1.02–3.44)	1.59 (0.46–5.56)
16	0.88 (0.58–1.34)	1.02 (0.38–2.71)	0.87 (0.57–1.33)	1.05 (0.39–2.84)
18	0.63 (0.30–1.34)	NA	0.63 (0.30–1.34)	NA
31	0.89 (0.44–1.79)	NA	0.92 (0.45–1.86)	NA
35	2.38 (1.12–5.06)	0.77 (0.10–5.88)	2.37 (1.11–5.04)	0.79 (0.10–6.06)
45	0.91 (0.44–1.88)	2.26 (0.65–7.89)	0.92 (0.44–1.92)	2.35 (0.67–8.31)
51	0.89 (0.50–1.56)	1.24 (0.36–4.23)	0.89 (0.50–1.57)	1.29 (0.37–4.42)
52	0.79 (0.42–1.51)	1.01 (0.23–4.36)	0.79 (0.42–1.51)	1.03 (0.24–4.53)
53	1.11 (0.68–1.83)	0.29 (0.04–2.17)	1.09 (0.66–1.79)	0.30 (0.04–2.21)
54	1.58 (0.82–3.07)	0.60 (0.08–4.55)	1.55 (0.80–3.01)	0.62 (0.08–4.66)
55	1.56 (0.86–3.20)	1.96 (0.57–6.75)	1.66 (0.86–3.20)	2.03 (0.58–7.05)
56	2.10 (0.97–4.55)	0.85 (0.11–6.47)	2.05 (0.95–4.46)	0.87 (0.11–6.65)
58	0.77 (0.40–1.48)	0.50 (0.07–3.78)	0.76 (0.40–1.47)	0.51 (0.07–3.89)
59	1.37 (0.60–3.10)	0.92 (0.12–7.06)	1.40 (0.61–3.17)	0.95 (0.12–7.33)
61	0.59 (0.24–1.42)	4.43 (1.43–13.72)	0.58 (0.24–1.40)	4.60 (1.48–14.36)
68	1.66 (0.76–3.62)	3.07 (0.87–10.80)	1.63 (0.75–3.58)	3.17 (0.89–11.24)
73	0.34 (0.13–0.91)	NA	0.34 (0.13–0.89)	NA
84	1.33 (0.76–2.33)	1.34 (0.40–4.54)	1.30 (0.75–2.28)	1.38 (0.40–4.70)
89	4.90 (0.98–24.48)	3.14 (0.37–26.41)	4.96 (0.99–24.78)	3.24 (0.38–27.36)
Any HPV	0.94 (0.70–1.27)	0.63 (0.31–1.27)	0.87 (0.63–1.20)	0.62 (0.29–1.32)
Alphapapillomavirus species‡				
Species 3	1.15 (0.79–1.68)	1.27 (0.54–2.99)	1.12 (0.77–1.65)	1.32 (0.55–3.14)
Species 7	1.16 (0.78–1.70)	1.08 (0.43–2.68)	1.15 (0.78–1.71)	1.11 (0.44–2.81)
Species 9	0.92 (0.67–1.27)	1.02 (0.48–2.20)	0.90 (0.65–1.25)	1.06 (0.48–2.34)
Species 10	1.67 (1.05–2.66)	1.50 (0.56–4.02)	1.69 (1.06–2.71)	1.56 (0.57–4.26)

OR, odds ratio; CI, confidence interval; NA, Not applicable.

*Dominant model: mutant homozygote (CC) + heterozygote (TC) versus WT homozygote (TT).

†Recessive model: WT homozygote (TT) + heterozygote (TC) versus mutant homozygote (CC).

‡Species 3 (HPV61, -72, -62, -81, -83, -84 and -89); species 7 (HPV18, -39, -45, -59, -68 and -70); species 9 (HPV16, -31, -33, -35, -52, -58 and -67); species 10 (HPV6, -11, -44 and -55).

overall HPV73 positivity among the cases was low, being only 5.8 %. However, the findings with HPV73 or with any other HPV type could not be corroborated in the analyses of HPV clearance or persistence. Therefore, one might speculate that the association with HPV73 was mostly due to chance because of the high number of associations that were examined. We also did not observe an association between cases of cervical cytological abnormalities and the TLR9 polymorphism (data not shown), which fails to support a mediating role for this SNP after HPV acquisition. We did not see an association between the ethnic background and the TLR9 gene (T1237C) (data not shown), which was seen in a previous study showing an increased risk for asthma with Caucasians but not African Americans (Lazarus *et al.*, 2003).

Our study has important limitations. We chose a hypothesis-driven, focused view on only one polymorphism in the TLR9 promoter; our findings do not preclude an effect for the entire TLR9 gene or from other innate immunity genes that mediate PAMP responses. Although we had a large sample of women who developed cervical HPV infection over a period of many years and suitable control groups based on follow-up and exposure opportunity, our sample sizes for individual HPV types were admittedly small. Although we did not observe any associations with the subset of cases that developed cervical lesions, there were less than 100 of the latter and only a few would be informative at the level of HPV type. Sample size requirements would be substantially greater than those fulfilled by the present study if TLR gene responses are mediated via specific HPV types.

Table 3. Type-specific HPV clearance and TLR9 genotypes using two different definitions for clearance

Significant associations are highlighted in bold.

Genotype/species	Clearance definition 1*				Clearance definition 2†			
	Dominant model‡		Recessive model§		Dominant model‡		Recessive model§	
	Events	HR	Events	HR	Events	HR	Events	HR
HPV genotype								
6/11	24	1.54 (0.79–2.99)	3	1.46 (0.44–4.81)	20	1.42 (0.72–2.78)	2	3.41 (0.74–15.64)
16	37	1.09 (0.71–1.69)	5	1.27 (0.51–3.19)	36	0.99 (0.63–1.55)	5	1.31 (0.52–3.28)
18	8	1.95 (0.82–4.63)	0	NA	5	1.47 (0.52–4.14)	0	NA
31	10	0.90 (0.39–2.09)	0	NA	8	1.07 (0.44–2.59)	0	NA
33	9	0.95 (0.34–2.65)	1	0.55 (0.07–4.41)	8	0.92 (0.32–2.63)	1	0.46 (0.06–3.75)
35	16	0.63 (0.28–1.44)	1	1.37 (0.18–10.52)	14	1.05 (0.41–2.71)	1	5.41 (0.60–48.64)
45	9	0.76 (0.33–1.78)	3	0.62 (0.18–2.11)	8	0.83 (0.34–1.99)	3	0.85 (0.24–2.97)
51	17	0.94 (0.49–1.80)	3	5.26 (1.58–17.53)	15	0.77 (0.38–1.56)	3	6.70 (1.75–25.65)
52	14	1.58 (0.75–3.34)	2	1.68 (0.40–7.16)	13	1.41 (0.69–2.89)	2	2.74 (0.62–12.09)
53	25	0.76 (0.33–1.78)	3	0.62 (0.18–2.11)	24	1.33 (0.76–2.34)	1	0.71 (0.10–5.23)
54	17	1.13 (0.55–2.317)	1	1.12 (0.15–8.45)	16	1.11 (0.53–2.31)	1	1.78 (0.23–13.76)
55	16	1.04 (0.50–2.17)	3	0.72 (0.21–2.40)	12	0.84 (0.34–2.10)	2	0.47 (0.10–2.12)
56	15	1.31 (0.57–3.02)	1	2.09 (0.26–16.54)	14	1.39 (0.58–3.35)	1	10.78 (0.97–119.70)
58	11	1.30 (1.70–229.99)	1	19.79 (1.70–230.0)	11	1.56 (0.66–3.65)	1	8.71 (0.92–82.98)
59	10	0.57 (0.21–1.56)	1	4.97 (0.34–72.82)	8	0.32 (0.10–0.98)	0	NA
61	7	0.80 (0.30–2.15)	4	1.17 (0.38–3.60)	6	0.90 (0.32–2.54)	3	0.90 (0.26–3.19)
68	11	1.39 (0.58–3.38)	3	1.21 (0.32–4.57)	9	1.29 (0.49–3.40)	3	1.37 (0.36–5.21)
73	3	2.52 (0.64–9.88)	0	NA	3	2.67 (0.70–10.22)	0	NA
89	4	...	1	0.47 (0.03–6.42)	3	NA	1	NA
Any HPV	158	0.98 (0.80–1.20)	16	1.18 (0.71–1.94)	133	0.93 (0.75–1.16)	14	1.30 (0.76–2.22)
Alphapapillomavirus species 								
Species 3	48	1.11 (0.76–1.63)	7	0.78 (0.36–1.68)	40	0.96 (0.64–1.45)	6	0.85 (0.37–1.96)
Species 7	44	0.91 (0.62–1.34)	6	0.88 (0.38–2.01)	34	0.80 (0.52–1.23)	5	0.65 (0.26–1.63)
Species 9	74	0.99 (0.73–1.33)	9	1.29 (0.66–2.52)	69	1.09 (0.80–1.50)	9	1.56 (0.79–3.06)
Species 10	38	1.37 (0.85–2.21)	5	0.96 (0.39–2.41)	31	1.16 (0.69–1.94)	3	0.72 (0.22–2.38)

NA, not applicable.

*Definition 1: One negative follow-up visit after an HPV-positive test.

†Definition 2: Two negative follow-up visits after an HPV-negative test.

‡Dominant model: mutant homozygote (CC) + heterozygote (TC) versus WT homozygote (TT).

§Recessive model: WT homozygote (TT) + heterozygote (TC) versus mutant homozygote (CC).

||Species 3 (HPV61, -72, -62, -81, -83, -84 and -89); species 7 (HPV18, -39, -45, -59, -68 and -70); species 9 (HPV16, -31, -33, -35, -52, -58 and -67); species 10 (HPV6, -11, -44 and -55).

HPV16 may evade innate host immunity by downregulating the expression of TLR9, thus becoming persistent (Hasan *et al.*, 2007). This was also seen with incident HPV16 infections that cleared and were associated with increased expression of TLR9 compared with women who did not clear the virus (Daud *et al.*, 2011). However, another study showed the opposite, with an increase in TLR9 expression in cervical neoplasia samples (Lee *et al.*, 2007). In view of our findings, it seems unlikely that the polymorphism (T1237C) in the promoter region of TLR9 gene plays a key role in determining the course of cervical HPV infections. In contrast, our findings do not preclude a possible mediating mechanism via viral interference on the expression levels of the TLR9 receptors.

METHODS

Subjects. Recruitment and follow-up for the Ludwig–McGill Cohort Study took place between 1993 and 2005 in a population of low-income women in São Paulo, Brazil. The women were followed for up to 10 years. Eligible women were: between 18 and 60 years of age, had an intact uterus, were not pregnant or planning to become pregnant in the next 12 months and had not been treated for cervical disease in the last 6 months prior to enrolment. The study methods have been described in detail elsewhere (Franco *et al.*, 1999). The study was approved by the ethical review boards of the participating institutions in Brazil and Canada. Informed consent was obtained from all participants prior to enrolment.

Altogether, 2462 eligible women were enrolled into the study, among whom three different groups were derived for the present analyses for the purpose of evaluating the association between the SNP

Fig. 1. HPV clearance with any HPV type and the TLR9 genotypes [WT homozygote (TT), heterozygote (TC) or mutant homozygote (CC)] in the Kaplan–Meier analysis.

(rs5743836) polymorphism on the promoter region of TLR9 and the risk of HPV infection. The first group (cases) comprised 500 randomly selected women from among those ($n=1215$) who had a cervical HPV infection (of one or more HPV types) detected at least once at enrolment or at any point during follow-up. Two control groups were selected, as follows: control group 1 was a random sample of 300 women who always tested HPV negative during the entire study (out of the remainder of 1247 women), irrespective of how many follow-up visits were completed; control group 2 consisted of all 234 women who were always HPV negative as above but had a minimum of ten visits completed (approx. 7 years) in the study, including the enrolment. Expectedly, there was an overlap between these two control groups: 56 women fulfilled the criteria for inclusion in both control groups. In the analyses, these two control groups were treated independently.

Samples. DNA was extracted previously (Rabachini *et al.*, 2010) from exfoliated cervical cells and purified by spin column chromatography using a GFX Genomic Blood DNA Purification kit (Amersham Pharmacia Biotech) or organic solvent extraction (phenol/chloroform method) and 1 μ l DNA extract was used for PCRs in a 50 μ l final volume.

TLR9 genotyping. TLR9 genotype determination was performed using bidirectional PCR amplification of specific alleles (Bi-PASA) (Liu *et al.*, 1997), using the following primers (Carvalho *et al.*, 2008): 0.4 μ M 5'-TCATTTCAGCCTCACTCAGA-3' (forward outer primer); 0.4 μ M 5'-CACATTTCAGCCCTAGAGGG-3' (reverse outer primer); 0.05 μ M 5'-GGCGGCGGGGGCCGTGCTGTTCCCTCTGCCTGA-3' (inner WT primer); 0.1 μ M 5'-GGGCCGCGGGGCCATGAGACTTGGGGGAGT-TTC-3' (inner mutant primer). We used AmpliTaq Gold DNA polymerase with 1 $\times$ PCR Buffer II (Applied Biosystems). Products were analysed by gel electrophoresis in a 1% agarose gel to distinguish between WT homozygotes (TT), heterozygotes (TC) and mutant homozygotes (CC). The amplicons were: the whole fragment, amplified with the outer primers (644 bp), the WT allele-specific amplicon (395 bp) and the mutant-specific amplicon (275 bp). Validation of the Bi-PASA method was done by sequencing several of the generated fragments to confirm the different polymorphisms (data not shown).

Statistical analyses. All statistical analyses were carried out with Stata v12.1 (STATA Corp.). We compared the rates of type-specific HPV positivity for the different TLR9 genotypes among cases. We calculated the age-adjusted ORs and respective 95% CIs using logistic regression to measure the magnitude of the associations between

TLR9 genotype and infection risk, defined as overall risk of any type, individual types or grouped types. To estimate the association between TLR9 genotype and infection, subjects who tested positive for the presence of a particular TLR9 allele were compared with those who lacked that allele. This resulted in two models of phenotype attribution: dominant, defined as CC+TC versus TT, and recessive, defined as TT+TC versus CC.

Analyses of the different outcome variables with respect to TLR9 polymorphism were carried out for the two control groups separately. We omitted HPV types from some analyses if their prevalence was not at least 5% among cases. We also used proportional hazards regression to evaluate the effect of TLR9 variation on type-specific HPV clearance among cases using two different definitions for a cleared infection episode: (i) one negative follow-up visit following HPV positivity, and (ii) two consecutive negative visits following HPV positivity. A third outcome was persistent HPV infection. Persistence was defined as women (among cases) who tested positive for the same HPV type in two or more consecutive visits.

To test whether the effect of certain alleles depended on the level of exposure opportunity to HPV, a separate analysis was carried out based on the women's sexual history to define a subgroup with a high likelihood of exposure to HPV. This type of analysis has been carried out previously (Ferguson *et al.*, 2011; Mahmud *et al.*, 2007) and was discussed methodologically by Halloran & Struchiner (1995). This subgroup included 51.2% of the cases and controls and consisted of women who had their first sexual intercourse at age 17 or younger, or who had had more than five lifetime sexual partners. This covariate combination was chosen because the prevalence of HPV is highest in women with such a sexual behaviour profile (Trottier & Franco, 2006).

ACKNOWLEDGEMENTS

The Ludwig–McGill Cohort Study team members affiliated with the Ludwig Institute for Cancer Research in Sao Paulo, Brazil, are Maria Luiza Baggio, Lenice Galan, João Simão Sobrinho, José Carlos Mann Prado, Silvanaide Ferreira, Lara Termini, Maria Cecília Costa, Romulo Miyamura, Andrea Trevisan, Patricia Thomann, João Candeias, Laura Sichero, Paula Rahal, Antonio Ruiz, Jane Kaiano, Monica Santos, Patricia Savio, Paulo Maciag, Tatiana Rabachini and Luisa Villa (Co-Principal Investigator); members affiliated with McGill University in Montreal, Canada, are Marie-Claude Rousseau, Salaheddin Mahmud, Nicolas Schlecht, Helen Trottier, Alex Ferenczy, Thomas Rohan, Myriam Chevarie-Davis, Karolina Louvanto, Joseph Tota, Agnihotram Ramanakumar, Eliane Duarte, Sophie Kulaga, Juliette Robitaille, Robert Platt and Eduardo Franco (Principal Investigator). We thank Nuno Miguel Sampaio Osório and Fernando José dos Santos Rodrigues of the Instituto de Investigação em Ciências da Vida e da Saúde (ICVS), University of Minho, Braga Portugal, for stimulating discussions. Financial support for this study was provided by the Ludwig Institute for Cancer Research (intramural grant to L. L. V. and E. L. F.), the US National Cancer Institute (grant CA70269 to E. L. F.), the Canadian Institutes of Health Research (operating grant 49396 and team grant 83320 to E. L. F.), a FAPESP grant 2008/03232-1, a PhD fellowship to L. B. O. (2010/18388-7) and a Sigrid Jusélius Foundation fellowship to K. L.

REFERENCES

Carvalho, A., Pasqualotto, A. C., Pitzurra, L., Romani, L., Denning, D. W. & Rodrigues, F. (2008). Polymorphisms in Toll-like receptor genes and susceptibility to pulmonary aspergillosis. *J Infect Dis* **197**, 618–621.

- Carvalho, A., Osório, N. S., Saraiva, M., Cunha, C., Almeida, A. J., Teixeira-Coelho, M., Ludovico, P., Pedrosa, J., Pitzurra, L. & other authors (2011). The C allele of rs5743836 polymorphism in the human TLR9 promoter links IL-6 and TLR9 up-regulation and confers increased B-cell proliferation. *PLoS ONE* 6, e28256.
- Carvalho, A., Cunha, C., Almeida, A. J., Osório, N. S., Saraiva, M., Teixeira-Coelho, M., Pedreiro, S., Torrado, E., Domingues, N. & other authors (2012). The rs5743836 polymorphism in TLR9 confers a population-based increased risk of non-Hodgkin lymphoma. *Genes Immun* 13, 197–201.
- Corr, S. C. & O'Neill, L. A. (2009). Genetic variation in Toll-like receptor signalling and the risk of inflammatory and immune diseases. *J Innate Immun* 1, 350–357.
- Daud, I. I., Scott, M. E., Ma, Y., Shiboski, S., Farhat, S. & Moscicki, A. B. (2011). Association between Toll-like receptor expression and human papillomavirus type 16 persistence. *Int J Cancer* 128, 879–886.
- Ferguson, R., Ramanakumar, A. V., Richardson, H., Tellier, P. P., Coutlée, F., Franco, E. L. & Roger, M. (2011). Human leukocyte antigen (HLA)-E and HLA-G polymorphisms in human papillomavirus infection susceptibility and persistence. *Hum Immunol* 72, 337–341.
- Franco, E., Villa, L., Rohan, T., Ferenczy, A., Petzl-Erler, M., Matlashewski, G. & Ludwig-McGill Study Group (1999). Design and methods of the Ludwig-McGill longitudinal study of the natural history of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in Brazil. *Rev Panam Salud Publica* 6, 223–233.
- Halloran, M. E. & Struchiner, C. J. (1995). Causal inference in infectious diseases. *Epidemiology* 6, 142–151.
- Hasan, U. A., Bates, E., Takeshita, F., Biliato, A., Accardi, R., Bouvard, V., Mansour, M., Vincent, I., Gissmann, L. & other authors (2007). TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. *J Immunol* 178, 3186–3197.
- Hasimu, A., Ge, L., Li, Q. Z., Zhang, R. P. & Guo, X. (2011). Expressions of Toll-like receptors 3, 4, 7, and 9 in cervical lesions and their correlation with HPV16 infection in Uighur women. *Chin J Cancer* 30, 344–350.
- Lazarus, R., Klimecki, W. T., Raby, B. A., Vercelli, D., Palmer, L. J., Kwiatkowski, D. J., Silverman, E. K., Martinez, F. & Weiss, S. T. (2003). Single-nucleotide polymorphisms in the Toll-like receptor 9 gene (TLR9): frequencies, pairwise linkage disequilibrium, and haplotypes in three U.S. ethnic groups and exploratory case-control disease association studies. *Genomics* 81, 85–91.
- Lee, J. W., Choi, J. J., Seo, E. S., Kim, M. J., Kim, W. Y., Choi, C. H., Kim, T. J., Kim, B. G., Song, S. Y. & Bae, D. S. (2007). Increased Toll-like receptor 9 expression in cervical neoplasia. *Mol Carcinog* 46, 941–947.
- Liu, Q., Thorland, E. C., Heit, J. A. & Sommer, S. S. (1997). Overlapping PCR for bidirectional PCR amplification of specific alleles: a rapid one-tube method for simultaneously differentiating homozygotes and heterozygotes. *Genome Res* 7, 389–398.
- Lu, K. C., Yang, H. Y., Lin, Y. F., Kao, S. Y., Lai, C. H., Chu, C. M., Wu, C. C. & Su, S. L. (2011). The T-1237C polymorphism of the Toll-like receptor-9 gene is associated with chronic kidney disease in a Han Chinese population. *Tohoku J Exp Med* 225, 109–116.
- Mahmud, S. M., Robinson, K., Richardson, H., Tellier, P. P., Ferenczy, A. S., Roger, M., Coutlee, F. & Franco, E. L. (2007). HLA polymorphisms and cervical human papillomavirus infection in a cohort of Montreal University students. *J Infect Dis* 196, 82–90.
- Misch, E. A. & Hawn, T. R. (2008). Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to human disease. *Clin Sci (Lond)* 114, 347–360.
- Netea, M. G., Wijmenga, C. & O'Neill, L. A. (2012). Genetic variation in Toll-like receptors and disease susceptibility. *Nat Immunol* 13, 535–542.
- Ng, M. T., Van't Hof, R., Crockett, J. C., Hope, M. E., Berry, S., Thomson, J., McLean, M. H., McColl, K. E., El-Omar, E. M. & Hold, G. L. (2010). Increase in NF- κ B binding affinity of the variant C allele of the Toll-like receptor 9 –1237T/C polymorphism is associated with *Helicobacter pylori*-induced gastric disease. *Infect Immun* 78, 1345–1352.
- Novak, N., Yu, C. F., Bussmann, C., Maintz, L., Peng, W. M., Hart, J., Hagemann, T., Diaz-Lacava, A., Baurecht, H. J. & other authors (2007). Putative association of a TLR9 promoter polymorphism with atopic eczema. *Allergy* 62, 766–772.
- Pandey, S., Mittal, B., Srivastava, M., Singh, S., Srivastava, K., Lal, P. & Mittal, R. D. (2011). Evaluation of Toll-like receptors 3 (c.1377C/T) and 9 (G2848A) gene polymorphisms in cervical cancer susceptibility. *Mol Biol Rep* 38, 4715–4721.
- Rabachini, T., Trottier, H., Franco, E. L. & Villa, L. L. (2010). Validation of dot blot hybridization and denaturing high performance liquid chromatography as reliable methods for TP53 codon 72 genotyping in molecular epidemiologic studies. *BMC Genet* 11, 44.
- Rosa, M. I., Moraes, M. V., Vuolo, F., Petronilho, F., Bozzetti, M. C., Medeiros, L. R., Igansi, C. N., Silva, F. R., Dal-Pizzol, F. & Rosa, D. D. (2012). Association of interleukin-6 in women with persistence of DNA-HPV: a nested case-control study. *Arch Gynecol Obstet* 285, 143–148.
- Roszak, A., Lianeri, M., Sowińska, A. & Jagodziński, P. P. (2012). Involvement of Toll-like receptor 9 polymorphism in cervical cancer development. *Mol Biol Rep* 39, 8425–8430.
- Schlecht, N. F., Kulaga, S., Robitaille, J., Ferreira, S., Santos, M., Miyamura, R. A., Duarte-Franco, E., Rohan, T. E., Ferenczy, A. & other authors (2001). Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *JAMA* 286, 3106–3114.
- Trottier, H. & Franco, E. L. (2006). The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine* 24 (Suppl. 1), S1–S15.
- Vandermark, E. R., Deluca, K. A., Gardner, C. R., Marker, D. F., Schreiner, C. N., Strickland, D. A., Wilton, K. M., Mondal, S. & Woodworth, C. D. (2012). Human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins alter NF- κ B in cultured cervical epithelial cells and inhibition of NF- κ B promotes cell growth and immortalization. *Virology* 425, 53–60.
- Weng, Y., Wang, Y., Shi, Y., Zhou, W., Wang, H. & Wang, C. (2011). TLR9 expression and its role in chemosensitivity to DDP in human cervical cancer cells in vitro. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 31, 550–554.