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

MIRIAN GALLIOTE MORALE

**Efeito da infecção por HPV nas vias de
sinalização por *Toll Like Receptors***

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 5890

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

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

05/05/2016

MIRIAN GALLIOTE MORALE

**Efeito da infecção por HPV nas vias de sinalização
por *Toll Like Receptors***

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

*Orientadora: Dra. Luisa Lina Villa
Co-Orientador: Dr. Enrique Mario Boccardo Pierulivo*

São Paulo

2016

Dedico a minha família
Sempre presente

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, pela oportunidade.

Aos meus orientadores Dra. Luisa Lina Villa e Dr. Enrique Boccardo, pelos ensinamentos e conselhos, pela confiança em meu trabalho, pela compreensão e paciência.

Aos funcionários e colegas do Laboratório de Biologia Molecular do ICESP e do Laboratório de Inovação em Câncer do CMN, pelo apoio e colaboração.

Aos amigos do Laboratório de Oncovirologia pelo carinho, amizade, preocupação e suporte em todas as etapas de desenvolvimento dessa tese.

À minha família pela compreensão, dedicação, carinho e amor.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, minha gratidão, carinho e respeito.

À FAPESP, pela bolsa concedida e ao CNPq pelo apoio financeiro.

*“Above all, don’t fear difficult moments.
The best comes from them”
Rita Levi-Montalcini*

RESUMO

Morale, M.G. **Efeito da infecção por HPV nas vias de sinalização por Toll Like Receptors**. 2016. 85p. Tese – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

As oncoproteínas E6 e E7 do Papilomavírus Humano (HPV) estão envolvidas na desregulação do sistema imune inato, provocando alterações na expressão dos receptores do tipo *Toll* (TLR). Considerando-se a função da via de sinalização iniciada por TLR, haveria uma vantagem para o vírus capaz de manipular a resposta desta via de modo que possa persistir nas células sem ser detectado pelo sistema imune ou ainda modulando essa resposta e criando um ambiente mais propício à manutenção da infecção. No entanto, muitos dos mecanismos que levam à eliminação da infecção ou persistência do HPV ainda são pouco conhecidos. O objetivo principal desse trabalho é investigar o papel das vias de TLR no processo de carcinogênese mediado por HPV. Inicialmente, foi analisada a expressão de genes da via de TLR em linhagens de tumores cervicais e em células expressando as oncoproteínas virais. Foram identificados vários genes diferencialmente expressos entre linhagens de células tumorais e queratinócitos normais, incluindo moléculas adaptadoras da via de TLR e genes associados à via da MAP quinase, ativação de NFkappaB e resposta imune antiviral. Cerca de 90% destes genes foram regulados negativamente. Entre eles, destacamos HMGB1, que apesar de possuir menos RNAm nas células tumorais possui um nível proteico muito maior, além de ter-se mostrado de grande importância para a viabilidade e proliferação das células tumorais, conforme demonstrado através de experimentos de supressão gênica. Em conjunto, os nossos dados indicam que E6 e E7 de HPVs de alto risco inibem proteínas da via de sinalização de TLR.

Palavras-chave: HPV, TLR, imunidade inata, oncoproteínas, expressão e supressão de genes

ABSTRACT

Morale, M.G. **Effects of HPV infection on TLR signaling pathway.** 2016. 87p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Previous studies have shown that E6 and E7 HPV oncoproteins are involved in innate immune system dysregulation, causing alterations on Toll-like receptors (TLR) expression. Considering TLR pathway function, it would be advantageous for a virus to manipulate the response of this pathway so it can persist in cells without being detected by the immune system or to modulate this response to create a better environment for persistence of infection. However, many of the mechanisms leading to HPV infection clearance or persistence are still unknown and matter of active investigation. We analyzed in cervical cancer cell lines expression of genes from TLR pathway; several were differentially expressed between tumor cells lines and normal keratinocytes, including TLR adaptors molecules and genes associated with MAP kinase pathway, NFkappaB activation and antiviral immune response. About 90% of these genes were down regulated. Among them, we selected HMGB1 for further characterization due to its interference with tumor cell viability and proliferation. Altogether, our data indicate that high risk HPV E6 and E7 can inhibit TLR signaling pathway.

Keywords: HPV, TLR pathway, innate immunity, oncoproteins, gene expression and silencing

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Vias de sinalização mediadas por receptores do tipo Toll (TLR).....	20
Figura 2: Mapa esquemático do vetor retroviral pLXSN.....	29
Figura 3: Mapa do vetor retroviral pBabe. U.....	30
Figura 4: Configurações para análise de amostras para ciclo celular em citômetro de fluxo	48
Figura 5: Controle de qualidade do RNA extraído a partir de diferentes linhagens celulares.	49
Figura 6: Comparação da expressão de genes envolvidos nas vias de sinalização mediadas por TLR entre queratinócitos normais e linhagens celulares derivadas de tumores da cérvix uterina.....	50
Figura 7: Agrupamento das amostras em função do padrão de expressão de 84 genes envolvidos nas vias de sinalização por TLR.	53
Figura 8: Efeito da presença de HPV na expressão protéica de SARM1, Myd88, TBK1, TRAF6 e HMGB1.	59
Figura 9: Efeito da presença de HPV na expressão protéica FADD, Caspase 8, Ube2N.	60
Figura 10: Efeito da presença de HPV na expressão protéica deTLR4, IRAK4 e TNFR1.	60
Figura 11: Efeito de E6 e E7 de HPV16 na expressão protéica de TLR4, SARM1, Ube2N e TNFR1 em queratinócitos humanos primários.....	62
Figura 12: Efeito da expressão de E6 e E7 de HPV16 na expressão de HMGB1 em culturas de queratinócitos humanos primários (NHEK).....	63
Figura 13: Efeito da presença de HPV na expressão e localização celular de HMGB1, Myd88, TLR4 e TNFR1 em culturas celulares tumorais e em células normas transduzidas com E6 e E7 de HPV16.....	67
Figura 14: Efeito de E6 e E7 de HPV16 na expressão protéica de HMGB1 em culturas organotípicas.	67
Figura 15: Alteração da viabilidade de células tumorais após silenciamento de HMGB1.	68
Figura 16: Diminuição na cinética de crescimento de culturas de células derivadas de tumores cervicais ou queratinócitos normais tansduzidos com E6 e E7 de HPV16 após silenciamento de HMGB1.....	69
Figura 17: Aumento da ativação de caspase 3 em células tumorais HPV positivas silenciadas para HMGB1.	70
Figura 18: Silenciamento de HMGB1 leva ao aumento de população hipodiplóide em células HeLa mas não altera as populações em cada fase do ciclo celular.	71
Figura 19: Efeito do silenciamento de HMGB1 no potencial clonogênico de células tumorais.....	72
Figura 20: Exemplo de medição de expressão de citocinas pró-inflamatórias.	74
Figura 21: Resultados de expressão de citocinas pró-inflamatórias em amostras de culturas organotípicas transduzidas com vetores retrovirais pBABE, pBABE HPV11 E6E7, pLXSN, pLXSN HPV16 E6E7.....	75
Figura 22: Resumo das funções associadas à localização celular de HMGB1.	84
Figura 23: Representação simplificada da via de sinalização por TLR4 e proteínas identificadas no presente trabalho.	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista de anticorpos utilizados e respectivas concentrações.	41
Tabela 2: Citocinas identificáveis pelo kit <i>Proteome Profiler Human Cytokine Array Kit, Panel A</i>	45
Tabela 3: Nome, alteração relativa no nível de expressão (fold: amostra/controle) e p-valor dos genes da via de sinalização por TLR diferencialmente expressos entre as linhagens derivadas de tumores de colo do útero HPV positivas e queratinócitos normais (controle).....	51
Tabela 4: Nome, alteração relativa no nível de expressão (fold: amostra/controle) e p-valor dos genes da via de sinalização por TLR diferencialmente expressos entre as linhagens derivadas de tumores de cólo de útero HPV positivas e negativas e queratinócitos normais (controle).	52
Tabela 5: Nome, alteração relativa no nível de expressão (fold: amostra/controle) e p-valor dos genes da via de sinalização por TLR diferencialmente expressos entre as linhagens derivadas de tumores de cólo de útero HPV positivas e linhagem tumoral HPV negativa C33A (controle).....	54
Tabela 6: Expressão de genes significativamente alterados em queratinócitos transduzidos com E6 e E7 de HPV16 e HPV11, utilizando-se como controle células transduzidas com vetor retroviral vazio.	55
Tabela 7: Expressão de genes significativamente alterados em culturas organotípicas com queratinócitos transduzidos com E6 e E7 de HPV16 e HPV11, utilizando-se como controle células transduzidas com vetor retroviral vazio.....	56
Tabela 8: Mutantes de E7 de HPV16 e alterações funcionais.	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-1: proteína ativadora 1	MCM7: Minichromosome Maintenance Complex Component 7
Bak: BCL2 Antagonist/Killer	MGMT: O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase
BCL2: B-Cell CLL/Lymphoma 2	MyD88: Myeloid Differentiation Primary Response 88
CDK: quinase dependente de ciclina	NF-kB: fator nuclear kB
CIN: cervical intraepithelial neoplasia	NFX1: Nuclear Transcription Factor, X-Box Binding 1
DNA: ácido desoxiribonucleico	ORF: Open Read Frame
E2F: fator E2	p21: cyclin-dependent kinase inhibitor 1
ECSIT: evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathways	p27: cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
EGF: fator de crescimento epidermal	p53: Transformation-Related Protein 53
ERC-55: endoplasmic reticulum calcium-binding protein of 55 kDa	PAMP: Pathogen-associated molecular pattern
FADD: Fas-Associated protein with Death Domain	Rb: Retinoblastoma
GM-CSF: Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor	RNA: ácido ribonucleico
Gps2: G Protein Pathway Suppressor 2	SARM1: Sterile Alpha And TIR Motif Containing 1
hADA3: homolog Alteration/Deficiency In Activation 3	SNP: single-nucleotide polymorphisms
HBV: vírus da hepatite B	SORBS2: Sorbin And SH3 Domain Containing 2
HCV: vírus da hepatite C	TBK1: TANK-Binding Kinase 1
HHV-8: herpesvírus humano 8	TLR: Toll like Receptors
HIV: vírus da imunodeficiência humana	TNF: fator de necrose tumoral
HLA: antígeno leucocitário humano	TNFR1: Tumor Necrosis Factor Receptor Type 1
HMGB1: High mobility group box 1	TRAF6: TNF receptor associated factor 6
HPV: Papilomavírus Humano	TRIF Toll-Interleukin-1 Receptor Domain-Containing Adapter Protein Inducing Interferon Beta
IFN: Interferon	Ube2N: Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2N
IL: interleucina	VEGF: vascular endothelial growth factor
IRAK4: interleukin-1 receptor-associated kinase 4	XRCC1: X-Ray Repair Cross-Complementing Protein 1
IRF3: interferon regulatory factor 3	
LPS: Lipopolissacarídeos	
MAPK: Mitogen-activated protein kinase	

Sumário

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	ASSOCIAÇÃO ENTRE CÂNCER DE COLO DO ÚTERO E HPV	12
1.2	BIOLOGIA DO HPV	14
1.3	INFLAMAÇÃO E CÂNCER	17
1.4	<i>TOLL-LIKE RECEPTORS</i> E CÂNCER	18
1.5	PAPEL DOS TLR NA CARCINOGENESE VIRAL.....	22
2	OBJETIVOS.....	28
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1	VETORES RETROVIRAIS.....	29
3.2	RECUPERAÇÃO DOS VETORES A PARTIR DE PAPEL FILTRO	31
3.3	QUIMIOTRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS COMPETENTES.....	31
3.4	PURIFICAÇÃO DOS PLASMÍDEOS.....	31
3.5	CULTIVO DE CÉLULAS	32
3.6	TRANSDUÇÃO DE VETORES RETROVIRAIS	33
3.7	CULTURA ORGANOTÍPICA DE QUERATINÓCITOS (RAFT)	34
3.7.1	<i>Preparação de células “feeders”</i>	34
3.7.2	<i>Preparação do equivalente dérmico</i>	34
3.7.3	<i>Cultura organotípica de queratinócitos</i>	35
3.8	PURIFICAÇÃO DE RNA	35
3.8.1	<i>TRIzol® (Thermo Fisher, Massachusetts, EUA)</i>	35
3.8.2	<i>RNA mini kit da Qiagen (Hilden, Alemanha)</i>	36
3.9	ESPRESSÃO DE RNAM DE GENES DA VIA DE TLR.....	36
3.9.1	<i>Genes</i>	38
3.10	EXTRAÇÃO PROTEICA	39
3.11	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	40
3.12	MONITORAMENTO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS	40
3.12.1	<i>SDS-PAGE</i>	40
3.12.2	<i>Western Blot</i>	40
3.13	IMUNOFLOURESCÊNCIA E IMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ).....	42
3.14	PRODUÇÃO DE LENTIVÍRUS E SILENCIAMENTO GÊNICO	42
3.15	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR	43
3.16	ENSAIOS CLONOGÊNICOS E DE PROLIFERAÇÃO	44
3.17	ANÁLISE DE PRODUÇÃO DE CITOCINAS.....	44
3.18	ANÁLISE DE CICLO CELULAR	46
4	RESULTADOS	49
4.1	ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA VIA DE TLR.....	49
4.2	VALIDAÇÃO DOS DADOS DE EXPRESSÃO GÊNICA POR ANÁLISE DE PROTEÍNAS	57
4.3	ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA EM CÉLULAS NORMAIS TRANSDUZIDAS COM E6 E E7 DE HPV16.....	61
4.4	ANÁLISE DE EXPRESSÃO POR IMUNOFLOURESCÊNCIA E IMUNOHISTOQUÍMICA	64
4.5	EFEITO DO SILENCIAMENTO GÊNICO DE HMGB1 EM LINHAGENS HPV POSITIVAS	67
4.6	ANÁLISE DE PRODUÇÃO DE CITOCINAS.....	73
5	DISCUSSÃO	76
5.1	RECEPTORES DO TIPO TOLL E PERSISTÊNCIA DA INFECÇÃO POR HPV.....	76
5.2	ADAPTADORES DA VIA DE TLR	79
5.3	ATIVAÇÃO DE NFκB	80
5.4	HIGH MOBILITY GROUP BOX 1 (HMGB1)	82
6	CONCLUSÕES.....	86

1 Introdução

1.1 Associação entre Câncer de Colo do Útero e HPV

O Papilomavírus Humano (HPV) foi inicialmente detectado em amostras de câncer cervical na década de 80. A partir de então diversos estudos foram realizados estabelecendo por fim a relação entre a infecção por HPV e o desenvolvimento do câncer cervical, e assim, pela primeira vez o desenvolvimento de um tipo de câncer foi totalmente atribuído a uma infecção viral (BOSCH; DE SANJOSÉ, 2003; ZUR HAUSEN, 1991).

Os vinte anos seguintes à detecção do HPV foram marcados por estudos epidemiológicos que demonstraram que a infecção por tipos específicos de HPV, conhecidos como de alto risco ou oncogênicos, são os diretos responsáveis pelo câncer cervical (BOSCH; DE SANJOSÉ, 2003).

Além de lesões do colo uterino, HPVs são responsáveis por uma gama muito diversa de lesões epiteliais, infectando epitélios cutâneos e mucosos, e causando desde lesões benignas a carcinomas (DE VILLIERS et al., 2004).

Há mais de 200 tipos de HPV descritos capazes de infectar células epiteliais em uma variedade de sítios anatômicos, sendo subdivididos em 5 gêneros. Os tipos pertencentes ao gênero Alpha possuem tropismo por mucosas e foram agrupados em alto e baixo risco oncogênico de acordo com sua associação com câncer cervical (MUÑOZ et al., 2003).

Dentre os Alphapapilomavírus, os tipos de alto risco HPV16 e HPV18 são responsáveis por aproximadamente 70% dos casos de câncer cervical, sendo que juntamente a outros 6 tipos oncogênicos são responsáveis por 90% dos casos no mundo. Já os tipos de baixo risco HPV6 e HPV11 são associados com proliferações benignas da região genital, estando associados a 100% dos casos

de verrugas genitais, que apesar de não serem consideradas uma condição médica severa causam significativa morbidade psicológica e substancial gasto nos sistemas de saúde (WRIGHT et al., 2006).

Em 2012, 528.000 mulheres desenvolveram câncer do colo do útero no mundo, e no mesmo ano, 266.000 vieram a óbito devido a esse. Estima-se ainda 560.000 novos casos em 2015, sendo aproximadamente 20.000 desses no Brasil (FERLAY et al., 2013). Em países em desenvolvimento é uma das principais causas de morte e onde mais de 85% dos casos ocorrem, já que procedimentos preventivos como detecção precoce de lesões no colo uterino por exame Papanicolaou não atingem toda a população eficientemente (JEMAL et al., 2011).

Apesar de a infecção persistente dos HPVs de alto-risco ser fator de risco necessário para o desenvolvimento do câncer cervical, tanto a resposta imune sistêmica como local contra esse vírus ainda não é bem entendida (GARCIA-CHACON et al., 2009; HO et al., 1995). Além disso, a maioria das mulheres elimina o vírus e apenas uma minoria desenvolve câncer, o que indica a presença de complexas diferenças na resposta imune daquelas que desenvolvem infecções persistentes por HPV, que permitem a progressão de lesões precursoras até o tumor.

Independente da resposta imune, inata ou adaptativa, local ou sistêmica, induzida nessas mulheres com infecção crônica, em alguns casos tais respostas são ineficientes para eliminar o vírus, resultando em infecção viral persistente (GARCIA-CHACON et al., 2009). Tanto no caso da eliminação da infecção quanto na persistência os mecanismos envolvidos precisam de maior elucidação.

1.2 Biologia do HPV

Os HPVs possuem genoma composto por DNA circular dupla-fita de aproximadamente 8000 pb contido num capsídeo icosaédrico (DE VILLIERS et al., 2004). Esse genoma apresenta oito ORFs que codificam para as proteínas: L1 e L2, componentes do capsídeo; E1, E2 e E4 envolvidas em processos do ciclo viral como replicação e empacotamento do genoma; E5, E6 e E7 proteínas responsáveis por interferir em processos celulares prevenindo diferenciação, apoptose e estimulando a proliferação celular (FRAZER, 2004).

O ciclo de infecção viral produtivo dos papilomavírus inicia-se após a introdução do HPV em células epiteliais proliferantes presentes na camada basal, onde ocorre a expressão das proteínas virais não estruturais, especialmente E1 e E2.

A replicação do genoma viral inicia-se com a ligação da proteína E2 à origem de replicação, e essa por sua vez recruta a helicase E1 o que permite a seguir a formação do complexo de replicação. Além de seu papel na replicação. E2 é ainda um fator de transcrição, e como possui 4 sítios de ligação na região promotora do HPV, atua de modo dose dependente, estimulando a transcrição de E6 e E7 quando em baixos níveis e inibindo quando presente em altos níveis proteicos (DOORBAR, 2006).

A replicação do genoma viral é dependente da maquinaria celular, necessitando assim da entrada da célula em fase S do ciclo celular. Mesmo ao infectar células que não estão ativamente proliferando, o HPV é capaz de estimular o estado proliferativo através da atuação da proteína E7. A capacidade proliferativa é desacoplada do processo de diferenciação celular principalmente pela interação entre E7 e membros da família do retinoblastoma (Rb), o que

acarreta a degradação dessas proteínas (DYSON et al., 1989; MOODY; LAIMINS, 2010). O fator de transcrição E2F que é responsável pela transcrição de genes relacionados à entrada da célula na fase S, como as ciclinas A e E, tem sua atividade inibida pela interação com Rb (SUN et al., 2007). Assim, durante a infecção por HPV, devido à degradação de Rb desencadeada pela proteína E7, o fator E2F está ativo, o que permite à célula a progressão no ciclo celular e, portanto, proliferação contínua.

Além de E7 inibir membros da família da proteína Rb, interage com diversos reguladores do ciclo celular, incluindo ciclinas, quinases dependentes de ciclinas (CDKs), inibidores de CDKs, culina 2, deacetilases, AP-1, E2F1 e E2F6, favorecendo ainda mais a progressão do ciclo celular (MCLAUGHLIN-DRUBIN; MÜNGER, 2009b)

No entanto, a atuação da proteína E7 pode induzir a célula infectada a entrar em apoptose, já que esse é um método de defesa da célula contra proliferação descontrolada. Assim, E6 é necessária atuando como proteína anti-apoptótica, interagindo principalmente com p53 e inibindo a atividade apoptótica dessa. No caso nos HPVs de alto risco essa interação leva a ubiquitinação e degradação de p53 mais eficientemente do que o observado em HPVs de baixo risco oncogênico. (DOORBAR, 2006).

E6, além de ser conhecida por promover a degradação de p53, também é capaz de interagir com uma série de fatores, entre eles ERC-55, paxillin, tuberin, E6-AP, E6-BP, E6TP1, Bak, TNFR1, FADD, caspase-8, p300/CBP, MCM7, XRCC1, MGMT, NFX1-91, hADA3, Gps2 e proteínas PDZ. Essas interações afetam tanto a diferenciação quanto a transcrição em queratinócitos,

ativam telomerase e inibem a apoptose, atuando assim de modo complementar às funções de E7 (HOWIE; KATZENELLENBOGEN; GALLOWAY, 2009)

Já a proteína E5 também é capaz de auxiliar na indução da proliferação celular, levando ao aumento da sinalização pelo fator de crescimento epidermal (EGF), além de atuar no escape ao sistema imune ao sequestrar por exemplo receptores HLA (CRUSIUS; RODRIGUEZ; ALONSO, 2000). Além disso, pode contribuir no início do desenvolvimento do câncer ao estimular a proliferação e a evasão ao sistema imune, mas devido à frequente integração do genoma do HPV durante a progressão do câncer, a expressão de E5 é geralmente perdida, assim não sendo necessária para a manutenção do fenótipo transformado (MCLAUGHLIN-DRUBIN; MÜNGER, 2009a).

O ciclo de replicação viral termina nas camadas mais superficiais do epitélio, onde os virions maduros são produzidos (FRAZER, 2004). Para isso, é necessária a inibição da expressão de E6 e E7, já que a montagem e liberação das partículas virais é dependente do processo de diferenciação celular. Assim ocorre o acúmulo de E2, que passa a inibir a expressão de E6 e E7. Nesse momento ocorre a expressão dos genes tardios, com a expressão de L1 e L2 permitindo assim o empacotamento e montagem das partículas infecciosas (DOORBAR, 2006).

No entanto, durante a progressão de lesões ao tumor, devido a atuação de E6 e E7 dos HPVs de alto risco na eficiente inibição da apoptose e indução da proliferação, acredita-se que casos de infecção persistente aumentem a chance de acúmulo de mutações, propiciando a condição necessária para o desenvolvimento do câncer. Além disso, durante a progressão das lesões precursoras ao câncer é frequente a integração do genoma viral ao da célula

infectada o que, acarreta a perda ou interrupção do gene E2, levando assim, a desregulação e aumento da expressão de E6 e E7 (VON KNEBEL DOEBERITZ, 2002).

Tanto E6 quanto E7 também participam na desregulação do sistema imune inato interferindo na expressão de receptores do tipo *Toll* (*Toll-Like Receptors*, TLR), um passo importante na progressão do câncer, como descrito adiante. Além de outras interações que interferem nos mecanismos celulares antivirais, estimulam persistência e progressão de lesões e estão envolvidas com invasão, metástase e inflamação (BOCCARDO; LEPIQUE; VILLA, 2010).

1.3 Inflamação e Câncer

Apesar do processo inflamatório ser bem conhecido como uma reação protetora local do tecido contra irritação, ferimento ou infecção, vem sendo estudado seu papel em uma variedade de doenças, incluindo câncer. Enquanto inflamação aguda faz parte da resposta primária de defesa, a inflamação crônica pode estar associada ao desenvolvimento de diferentes patologias incluindo o câncer, a diabetes, e doenças cardiovasculares, pulmonares e neurológicas (AGGARWAL et al., 2006).

Diversos produtos de genes pró-inflamatórios foram identificados como mediadores de características tumorais, entre eles os membros da família do fator de necrose tumoral (TNF). TNF- α que inicialmente foi descrito como citocina antitumoral também foi identificado como produto de células tumorais, atuando como fator de crescimento autócrino estimulando a proliferação celular. A sinalização iniciada por TNF leva a ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B), que é constitutivamente expresso na maioria dos tumores e é induzido por

carcinógenos como, por exemplo, pelas oncoproteínas do HPV (AGGARWAL et al., 2006).

Já foi demonstrado que E6 modula a via de sinalização de NF- κ B e resultados sugerem que outras proteínas do HPV interferem com a expressão de GM-CSF/TNF- α através de mecanismos transcricionais e pós-transcricionais, inibindo a sinalização por NF- κ B e produção de citocinas (HAVARD et al., 2002).

O papel da inflamação na infecção por HPV é complexo, pois envolve respostas capazes de prevenir e eliminar a infecção como também promover a persistência e progressão de lesões. Diversas vias e células envolvidas na resposta inflamatória são afetadas pela infecção e podem contribuir para o desenvolvimento da doença. Entre elas, por exemplo, a via de interferon é inibida pela atuação de E6 e E7 nos fatores regulatórios de interferon 1, 2 e 3 (IRF1, 2 e 3) auxiliando na evasão ao sistema imune; já a produção de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 6 (IL-6) que poderiam atuar na eliminação da infecção, na presença de HPV atuam inibindo o sistema imune e promovendo o crescimento tumoral. (BOCCARDO; LEPIQUE; VILLA, 2010).

1.4 Toll-Like Receptors e Câncer

O sistema imune inato é a primeira linha de defesa contra micróbios patogênicos e os TLRs são uma família de receptores de membrana que participam ativamente nesse processo, reconhecendo diversos patógenos incluindo bactérias, fungos e vírus (CARPENTER; O'NEILL, 2007).

Como apresentado na Figura 1, a sinalização por TLR é iniciada por um conjunto distinto de estímulos. Os TLR são responsáveis por reconhecer especificamente padrões moleculares associados a patógenos (PAMP), como

por exemplo TLR4 reconhece lipopolissacarídeos (LPS). Após esse reconhecimento, os TLR ativam proteínas adaptadoras diferentes dependendo de qual TLR inicia a sinalização.

Os TLR2 e TLR4 utilizam o adaptador MyD88 que a seguir recruta um complexo que acarreta a ativação do fator de transcrição NF- κ B. Quando ativado, NF κ B é translocado para o núcleo onde leva à produção de citocinas pró-inflamatórias. Já TLR3, por exemplo, usa a proteína adaptadora *Toll-Interleukin-1 Receptor Domain-Containing Adapter Protein Inducing Interferon Beta* (TRIF) para ativar o fator de transcrição *interferon regulatory factor 3* (IRF3), sinalização essa independente de NF- κ B. A ativação de IRF3 induz o promotor de interferon (IFN) para aumentar a expressão de genes induzíveis por ele (CARPENTER; O'NEILL, 2007).

Independente do TLR ativado, sua sinalização acarreta a ativação de fatores de transcrição que ao serem translocados ao núcleo iniciam a transcrição de fatores envolvidos com a regulação do processo inflamatório e da resposta imune contra patógenos (CARPENTER; O'NEILL, 2007).

Além de TLR serem expressos em células normais, estão presentes em muitos tipos tumorais. Em tumores de próstata e ovário podem ser utilizados como alvos para imunoterapias utilizando-se agonistas que estimulam respostas anti-tumorais, já em tumores de mama apresentam associação com processos inflamatórios, progressão tumoral e metástases (BHATELIA; SINGH; SINGH, 2014; MUCCIOLI; BENENCIA, 2014; ZHAO et al., 2014)

Figura 1: Vias de sinalização mediadas por receptores do tipo Toll (TLR). (O'NEILL; GOLENBOCK; BOWIE, 2013) A sinalização por TLR é iniciada por um conjunto distinto de estímulos. Após esse reconhecimento, os TLR ativam proteínas adaptadoras diferentes, Myd88, TRIF, TRAM, MAL. Esses adaptadores desencadeiam cascatas de sinalização que envolvem as vias de MAP quinases, e ativação e translocação para o núcleo de fatores de transcrição, entre eles, o fator nuclear (NF-κB) e os fatores regulatórios de interferon (IRF). Os fatores de transcrição estimulam então a transcrição de genes associados à regulação do processo inflamatório e resposta imune inata.

Diferentes mutações e modelos experimentais mostraram que alterações da função de TLR estão envolvidas na suscetibilidade a infecções assim como em um grande número de doenças inflamatórias não infecciosas como câncer, alergias, doenças auto-imunes e arteriosclerose entre outras (MONTERO VEGA; DE ANDRÉS MARTÍN, 2009).

Uma das hipóteses afirma que o desenvolvimento do câncer pode ser uma forma anormal de reparo tecidual onde os mecanismos de controle perderam a funcionalidade. A presença de infecção, inflamação e dano tecidual durante diversos estágios da tumorigênese pode levar a desregulação da resposta de reparo tecidual regulada por TLR (VOULGARELIS; IOANNOU, 2010).

Diversos estudos mostraram a participação de TLRs, e de componentes intracelulares de suas vias, em processos inflamatórios além de regulação da lesão tecidual e processo de cicatrização de feridas assim como da regulação da apoptose. Entretanto, os TLRs vêm sendo investigados quanto a sua participação em desenvolvimento e progressão de tumores, já que são candidatos a mediar os efeitos do sistema imune no microambiente tumoral. Inúmeros trabalhos indicam que a sinalização por TLR contribui para o proliferação tumoral em diferentes órgãos, e sua ativação nessas células, com subsequente produção de citocinas e quimiocinas, pode promover angiogênese, sobrevivência celular, quimioresistência e, portanto progressão tumoral (GROTE; SCHÜTT; SCHIEFFER, 2011; VOULGARELIS; IOANNOU, 2010)

. A ativação de TLR4 por LPS em células tumorais murinas é capaz de induzir evasão do sistema imune, induzindo proteínas que inibem proliferação de células T e atividade de células *natural killer*, além de produzir resistência tumoral ao ataque de células T citotóxicas. Além disso, foi observado que em tumores

de ovário que expressavam MyD88 a ativação deste TLR foi capaz de induzir proliferação celular e aumento da produção de citocinas e quimiocinas (HUANG et al., 2005; KELLY et al., 2006). Já em linhagens celulares derivadas de câncer de pulmão a ativação de TLR2 induziu a ativação de MAPKs e NF- κ B, o que foi mostrado prolongar a sobrevivência dessas células (HUANG et al., 2007). Ainda mais, em câncer de próstata a estimulação por oligonucleotídeos CpG e LPS (atuando sobre TLR9 e TLR4, respectivamente) preveniu a morte celular e diminuiu a sensibilidade das células a TNF- α (KUNDU et al., 2008). Em conjunto estas observações indicam uma significativa participação da via de TLR não somente em resposta a patógenos, mas também em processos tumorigênicos,

1.5 Papel dos TLR na carcinogênese viral

Além da associação de TLR com os tumores descritos, o desenvolvimento de tumores associados a vírus também apresenta alterações nas vias de sinalização por TLR, tanto pelo processo tumorigênico quanto pela presença do agente infeccioso. Como exemplo, em tumores causados pelo poliomavírus de células de Merkel foi observada correlação entre a presença desse vírus e a diminuição de TLR9 (JOUHI et al., 2015a). Já em linfomas causados pelo herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi (HHV-8) foi mostrado que alterações na sinalização via IRAK1 e TLR estão associadas a sobrevivência tumoral (YANG et al., 2005). E no caso do vírus da Hepatite B (HBV) há aumento da liberação de IL1 β e IL10 via sinalização por TLR, devido a interação direta com uma proteína adaptadora – ECSIT – intermediário sinalizador das vias de Toll evolutivamente conservado (CHEN et al., 2015).

Alguns vírus como, vírus da imunodeficiência humana (HIV-1), vírus da hepatite C (HCV) e HPV16 causam infecção persistente que frequentemente precede o desenvolvimento de câncer. Esses vírus são pobres indutores de IFN- α além de prejudicar a função de TLR9, limitando assim a resposta imune antiviral. Perda de resposta de TLR9 não ocorre somente em tumores associados a infecções virais, mas também em tumores de mama, ovário e cabeça e pescoço sem etiologia viral. (HIRSCH et al., 2010).

A participação do sistema imune inato na resposta contra infecção por HPV foi explorada em alguns trabalhos, assim como o papel dessa infecção em modificações da expressão e ativação das vias de sinalização mediadas por TLR, conforme segue.

Buscando avaliar se respostas imunes inatas anormais do hospedeiro em pacientes com lúpus aumentariam a persistência do HPV já que esses possuíam menor expressão de TLR quando comparados a indivíduos saudáveis, mostrou-se que nesses pacientes a infecção por HPV regula ainda mais negativamente a expressão de TLR7 e 9, indicando mecanismo possível para maior persistência da infecção nos pacientes com lúpus (YU et al., 2012).

Já em um estudo prospectivo envolvendo inicialmente mulheres saudáveis sem infecção por HPV, mediu-se a expressão de diferentes TLRs ao longo do tempo naquelas que continuaram sem infecção ou que desenvolveram infecções persistentes por HPV 16. Observou-se associação significativa entre o aumento da expressão de TLR2, TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 nas amostras endocervicais e subsequente eliminação da infecção viral. Além disso, após a detecção da infecção viral, observou-se nessas mulheres alterações nos níveis de expressão de TLR1, TLR3, TLR7 e TLR8 além de mudanças nos níveis de

IFN- α 2 (DAUD et al., 2011). Interessantemente, em um estudo retrospectivo envolvendo séries históricas de lesões do colo do útero (fixadas e preservadas em parafina), o aumento da expressão de TLR4, TLR7 e TLR9 foi correlacionado positivamente com a presença de HPV 16 nas lesões, além do desenvolvimento e progressão de CIN (*cervical intraepithelial neoplasia*) a carcinoma de colo do útero (HASIMU et al., 2011).

Um dos trabalhos que descreve a associação entre TLR e câncer de colo do útero, encontrou em amostras de lesões e tumores cervicais causados por HPV uma correlação positiva entre o nível de expressão de TLR4 e a progressão tumoral. E ainda, os mesmos autores descreveram que ao tratar culturas celulares derivadas de tumores cervicais positivos para HPV com LPS, ocorre aumento da expressão de TLR4 e indução de resistência a apoptose nas células tratadas (WANG et al., 2014).

Já em outro grupo de amostras de pacientes, utilizando-se microdissecção a laser, foi descrito o aumento, com a severidade da doença, dos níveis de RNAm de TLR3 e diminuição de TLR1 em epitélios displásicos e carcinomas, enquanto no estroma observou-se uma tendência de aumento de TLR 1, 2, 5, 6, e 9. (DECARLO et al., 2012). Resultados esses que sugerem a participação diferencial da ativação das vias de TLR dependendo dos estágios da doença e dos tipos celulares envolvidos.

Resultados diferentes foram obtidos em uma série de carcinomas de células escamosas cervicais, aonde houve significativa regulação negativa de TLR3, TLR4 e TLR5 quando comparados a tecidos cervicais normais (AGGARWAL et al., 2015). Já em carcinoma de células escamosas de orofaringe, tumores HPV positivos apresentaram menor expressão de TLR9;

além disso, nos casos p16 positivos, que é um indicativo de infecção ativa por HPV, houve também menor expressão de TLR7 e maior de TLR5 (JOUHI et al., 2015b).

Em outro estudo, foi observado que mulheres com níveis detectáveis de anticorpos contra HPV16 E6, ou seja, que já possuem algum nível de resposta imune contra o vírus, apresentaram maior expressão de TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 e eliminação da infecção. Estes dados reforçam o conceito de que a resposta do sistema imune inato é importante na história natural das infecções por HPV (SCOTT et al., 2015).

Achados semelhantes foram descritos não só em casos de alfa-HPVs como os descritos acima, frequentemente associados a infecções de mucosa, mas também em culturas de células transduzidas com E6 e E7 de beta-papilomavírus HPV38, aonde se observou a regulação negativa da expressão de TLR9. Nessas culturas, a re-expressão de TLR9 leva ao acúmulo das proteínas inibidoras de ciclinas dependentes de quinase, p21 e p27, inibindo a proliferação celular, e iniciando assim uma resposta antiviral eficaz. Sendo a expressão de TLR9 importante para o funcionamento adequado da resposta imune inata antiviral, os resultados indicam mais um mecanismo onde a resposta iniciada por TLR foi significativamente alterada para possibilitar o estabelecimento de uma infecção persistente e produtiva (PACINI et al., 2015).

Em modelos de cultura de células HeLa, linhagem celular derivada de adenocarcinoma cervical positivo para HPV18, buscou-se analisar a expressão de TLR, procurando associações com a expressão de genes sabidamente relacionados com o desenvolvimento tumoral. Como resultado, estabeleceu-se uma correlação positiva entre a expressão de TLR8 e VEGF e Bcl-2, fatores

associados com angiogênese e inibição da apoptose, respectivamente (ZHANG et al., 2014). Esse estudo indica que além das vias de resposta descritas para atuação de TLR contra patógenos, esses receptores podem participar em alterações de expressões de genes relacionados a tumorigênese por vias ainda não exploradas.

Além disso, em fibroblastos e queratinócitos, a superexpressão de TLR3 e SORBS2 (*Sorbin And SH3 Domain Containing 2*) é capaz de induzir senescência e o aumento de seus níveis endógenos ocorre naturalmente quanto maior a passagem dos queratinócitos primários *in vitro*. No entanto, linhagens celulares imortalizadas por HPV são resistentes a entrar em senescência apesar da expressão desses genes (LIESENFELD et al., 2013).

O HPV16 assim como outros vírus oncogênicos evadem ou desregulam a imunidade suprimindo diversas vias, incluindo a função do sensor do sistema imune inato de DNA dupla fita TLR9, como anteriormente descrito. O mecanismo para essa alteração durante a infecção por HPV16 é a formação de um complexo inibitório de transcrição induzido por E7 que inclui NFκB. Esse complexo liga-se ao promotor de TLR9 regulando negativamente sua expressão e afetando a resposta por interferon contra infecções virais (HASAN et al., 2013).

Ao investigar a associação entre polimorfismos de TLR9 e infecção por HPV em aproximadamente 200 mulheres chinesas com câncer cervical, encontrou-se associação de TLR9 2848 SNP (*single-nucleotide polymorphisms*) e risco de câncer cervical, observando-se um risco de 13,8 vezes maior na presença da infecção por HPV16 (LAI et al., 2013). Por outro lado, estudos realizados em nosso grupo, envolvendo mulheres de um estudo epidemiológico de história natural das infecções por HPV e risco de neoplasia cervical (a coorte

Ludwig-McGill), não se observou correlação entre o rs5743836 SNP localizado no promotor do gene de TLR9 (OLIVEIRA et al., 2013).

As vias de sinalização por TLR e pelo NF- κ B já foram implicadas em diversas doenças como em câncer e doenças autoimune, mas como alterações dessas vias durante a infecção por HPV contribuem para o desenvolvimento de câncer cervical ainda precisa ser elucidado. As relações entre ativação de TLR e infecção por HPV e progressão tumoral ainda necessitam ser mais bem estudadas principalmente no que se refere aos mecanismos moleculares envolvidos, já que fica cada vez mais evidente a importância dessas vias durante a infecção e tumorigênese causadas por HPV. No presente estudo visamos analisar o efeito da expressão de proteínas de HPV na ativação e alteração da resposta imune inata mediada por TLR.

2 Objetivos

Objetivo Geral: Estudar os efeitos da infecção por HPV nas vias de sinalização de Toll Like Receptors (TLR)

Objetivos Específicos:

Utilizando-se queratinócitos humanos primários transduzidos com os genes E6 e E7 do HPV11 e HPV16, células derivadas de tumores cervicais e culturas organotípicas pretendemos:

- Caracterizar a expressão de diversos componentes das vias de TLRs utilizando-se arrays de genes específicos dessas vias;

- Validar os resultados dos arrays por Western Blot, por imunohistoquímica e imunofluorescência em linhagens celulares HPV positivas e culturas organotípicas;

- Verificar o efeito de E6 e E7 na expressão de citocinas e quimiocinas, utilizando-se array de anticorpos específicos;

- Utilizando-se silenciamento gênico, verificar o papel dos genes identificados nas linhagens derivadas de tumores cervicais HPV positivas.

3 Material e Métodos

3.1 Vetores Retrovirais

Vetores retrovirais que expressam E6 e E7 de HPV foram transduzidos em culturas de queratinócitos. Os vetores baseados em pLXSN foram gentilmente cedidos pela Dra. Denise A. Galloway (Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, USA) e os baseados em pBABE pelo Dr. Dennis J. McCance (University of New Mexico Department of Pathology, Albuquerque, New Mexico, USA), como segue.

- pLXSN: vetor retroviral contendo sítio de múltipla clonagem (Clontech).

Figura 2: Mapa esquemático do vetor retroviral pLXSN. Utilizado para produção de vetores retrovirais carregando os genes de interesse clonados no sítio múltiplo de clonagem (MCS), possui ainda gene de resistência a ampicilina para seleção em bactéria e gene de resistência a neomicina para seleção de células transduzidas utilizando-se o antibiótico geneticina.

- pLXSN16E7: vetor retroviral contendo a sequência de E7 do HPV16 (HALBERT; DEMERS; GALLOWAY, 1992).

- pLXSN16E6: vetor retroviral contendo a sequência de E6 do HPV16 (HALBERT; DEMERS; GALLOWAY, 1992).
- pLXSN16E6E7: vetor retroviral contendo a sequência de E6 e E7 do HPV16 (HALBERT; DEMERS; GALLOWAY, 1992).
- pBabe puro: vetor retroviral contendo sítio de múltipla clonagem (Cell Biolabs).

Figura 3: Mapa do vetor retroviral pBabe. Utilizado para produção de vetores retrovirais carregando os genes de interesse clonados no sítio múltiplo de clonagem (MCS), possui ainda gene de resistência a ampicilina para seleção em bactéria e gene de resistência a puromicina para seleção de células transduzidas.

- pBabe HPV11E6E7: vetor retroviral contendo a sequência de E6 e E7 do HPV11 (GUESS; MCCANCE, 2005).
- pBabe HPV11E6: vetor retroviral contendo a sequência de E6 do HPV11 (GUESS; MCCANCE, 2005).
- pBabe HPV11E7 : vetor retroviral contendo a sequência de E7 do HPV11 (GUESS; MCCANCE, 2005).

3.2 Recuperação dos vetores a partir de papel filtro

Para recuperar os vetores enviados em papel filtro, foram cortados os círculos contendo os vetores e a seguir incubados por 5 minutos em 50 µl de 10 mM Tris pH 7,6. Após breve centrifugação, o sobrenadante foi utilizado para transformar bactérias quimiocompetentes.

3.3 Quimiotransformação de bactérias competentes

Para amplificação de plasmídeos, uma alíquota de bactérias *E. coli* DH5α quimiocompetentes foram descongeladas em gelo por 15 minutos após os quais se adicionou 1 µL de DNA plasmidial. A seguir a alíquota foi deixada em repouso no gelo por 30 minutos e aplicou-se um choque térmico por 2 minutos a 42 °C. Repetiu-se o repouso em gelo por 5 minutos e então 350 µL de meio LB foi adicionado à alíquota. As células foram incubadas a 37°C por uma hora sob agitação depois dos quais 100 µL foram semeados em placas de meio LB Agar com antibiótico.

3.4 Purificação dos plasmídeos

Uma colônia isolada crescida em placa com meio seletivo, foi inoculada em tubo de cultura contendo meio LB suplementado com o antibiótico e incubada durante a noite a 37°C sob agitação. Após esse período, utilizou-se o kit de purificação *PureYield™ Plasmid System* (Promega, Wisconsin, EUA). Resumidamente, o meio de cultura foi centrifugado para sedimentar as células, a seguir essas foram ressuspensas em soluções para que ocorra a lise celular. Após nova centrifugação o sobrenadante foi passado por coluna de purificação

proveniente do kit e lavado com solução removedora de endotoxinas. A eluição foi feita adicionando-se água livre de nucleases, e centrifugação.

3.5 Cultivo de células

- NHEK / PHK: queratinócitos primários humanos originados de prepúcio de recém-nascidos (Clonetics™ KGM-Gold™ Neonatal Normal Human Epidermal Keratinocytes / Primary Human Keratinocytes, Lonza, Basel, Suíça).
- Bosc23: linhagem empacotadora que produz retrovírus ecotrópicos capazes de transduzir células de camundongo, derivada de HEK293T (PEAR et al., 1993) (ATCC® CRL-11270). Gentilmente cedido pela Dra. Louise T. Chow, Departamento de Bioquímica e Genética Molecular, Universidade do Alabama em Birmingham, Alabama, EUA.
- HEK293T: linhagem de fibroblastos embrionários de rim humano (ATCC® CRL-3216™).
- Am12: linhagem empacotadora derivada de NIH 3T3 que produz lentivírus cujo envelope anfotrópico é capaz de transduzir quase todas as células de mamíferos, incluindo células humanas; (MARKOWITZ; GOFF; BANK, 1988) Gentilmente cedido pela Dra. Louise T. Chow, Departamento de Bioquímica e Genética Molecular, Universidade do Alabama em Birmingham, Alabama, EUA.
- J2: linhagem derivada de NIH 3T3. Gentilmente cedido pela Dra. Louise T. Chow, Departamento de Bioquímica e Genética

Molecular, Universidade do Alabama em Birmingham, Alabama, EUA.

- NIH 3T3 (ATCC® CRL-1658™): linhagem celular de fibroblastos embrionários de camundongos.
- C33A: células derivadas de biópsia de câncer cervical, HPV negativas, contendo p53 e pRB alteradas. (ATCC® HTB-31™)
- HeLa: células derivadas de adenocarcinoma cervical contendo genoma de HPV18. (ATCC® CCL-2™)
- SiHa: células derivadas de carcinoma escamoso cervical contendo genoma de HPV16. (ATCC® HTB-35™)

As culturas de NHEK em monocamada foram mantidas em meio KSFM (Thermo Fisher, Massachusetts, EUA) suplementado com fator de crescimento epidérmico recombinante (5 ng/ml) e extrato de glândula pituitária bovina (50 mg/ml). As linhagens tumorais foram cultivadas em meio de cultura MEM (Thermo Fisher, Massachusetts, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Thermo Fisher, Massachusetts, EUA). Já as demais linhagens foram mantidas em DMEM contendo 10% de SFB. Todas permaneceram em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

3.6 Transdução de Vetores Retrovirais

Os vetores retrovirais contendo os genes das oncoproteínas E6 e/ou E7 foram introduzidos em células Bosc23 por transfecção com reagente FuGENE seguindo as instruções do fabricante. Em seguida, as células foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂. O sobrenadante das células Bosc23 foi coletado após 48

horas e utilizado para transduzir células da linhagem Am12 mantidas em cultura nas mesmas condições. Para transduzir, o meio contendo a produção de retrovírus foi passada em filtro de 0,45 µm e gotejada sobre a cultura de células, e acrescida de 10 µg/mL de Polibreno (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Após 24 horas de transdução o meio foi substituído por meio D10 com antibiótico específico, dependendo do vetor utilizado. Seguindo-se uma semana de seleção, as células Am12 foram mantidas em meio fresco para recuperação até verificar-se a formação de colônias. O sobrenadante destas células foi utilizado para transduzir NHEK, como anteriormente descrito, e a seguir selecionados em meio KSFM com antibiótico por 48 horas para então serem utilizados em culturas organotípicas e demais experimentos.

Tanto os queratinócitos resultantes quanto as linhagens de AM12 produtoras foram mantidas congeladas em nitrogênio líquido.

3.7 Cultura organotípica de queratinócitos (raft)

3.7.1 Preparação de células “feeders”

A linhagem de fibroblastos de camundongo J2 foi mantida em cultura utilizando meio DMEM com 10% SFB. Estas células são utilizadas como *feeders* nas culturas organotípicas, suprimindo fatores para manutenção e diferenciação da camada epidérmica.

3.7.2 Preparação do equivalente dérmico

O equivalente dérmico foi obtido mediante a mistura de células J2 (1×10^5 células/0,75ml de equivalente dérmico) ressuspensas em um volume de SFB igual a 1/20 do volume total de equivalente dérmico a ser preparado. As células

foram misturadas a uma solução composta de meio Ham's F12 10X (Thermo Fisher, Massachusetts, EUA) a 1/10 do volume final de equivalente dérmico, um volume igual de tampão de reconstituição 10X (2,2% NaHCO₃, NaOH 0,05 M, HEPES 200mM) e colágeno de cauda de rato tipo I (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) correspondente a 8/10 do volume total. A mistura foi transferida para uma placa de 24 poços (0,75 ml/poço). Após a solidificação, foi adicionado meio para raft contendo DMEM:F12 (3:1), 10% SFB, hidrocortisona (0.4 µg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 0.01 nM de toxina colérica (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), apotransferrina (5 µg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), e EGF (5 ng/ml) (1 ml/poço) e a placa foi mantida a 37°C e 5% de CO₂ até a adição das NHEK.

3.7.3 Cultura organotípica de queratinócitos

Em cada poço contendo o equivalente dérmico foram colocados 2x10⁵ NHEK (normais ou transduzidos com vetores retrovirais). Após 24 horas, as culturas foram transferidas para a interface meio-ar onde foram mantidas por 9-11 dias. Finalmente, os rafts foram fixados em formalina e incluídos em parafina ou separados do colágeno e utilizados para a obtenção de extratos proteicos e RNA.

3.8 Purificação de RNA

3.8.1 TRIzol® (Thermo Fisher, Massachusetts, EUA)

Culturas Organotípica: Foram adicionados 2ml de Trizol para cada cultura organotípica homogeneizadas com pistão.

Células em monocamada: Adicionou-se 3 ml de Trizol para cada placa de cultura confluyente e raspou-se as células com o auxílio de rodinho.

A seguir foi adicionado 200 μ L de clorofórmio para cada mL do homogeneizado, misturou-se por 15 seg. e após 5 min centrifugou-se a 14000 rpm por 15 min à 4°C. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e adicionou-se 1,5 ml de isopropanol. Armazenou-se a mistura durante a noite à -70°C. No dia seguinte centrifugou-se a 14000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com etanol 75%. Após nova centrifugação à 14000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado contendo RNA foi ressuspendido em água livre de nucleases.

3.8.2 RNA mini kit da Qiagen (Hilden, Alemanha)

Às culturas em monocamada adiciona-se 600 μ L de tampão de lise. Após a lise adiciona-se um volume de etanol 70%. O homogeneizado obtido é passado pela coluna por centrifugação por 15s a 8000 g. A seguir a coluna é lavada repetidamente e o RNA eluído com 30 μ L de água livre de RNase.

3.9 Expressão de RNAm de genes da via de TLR

Para a análise da expressão de genes envolvidos nas vias de sinalização mediadas por TLR foi utilizado o *Toll-Like Receptor Signaling Pathway PCR Array* da Qiagen (Hilden, Alemanha) que permite analisar a expressão de 84 genes relacionados a via de TLR. A reação foi realizada segundo as instruções do fabricante. Brevemente, o protocolo é composto de três partes:

- Eliminação de DNA: Em um volume final de 10 µL adiciona-se 2 µg de RNA total, 2 µL de tampão de eliminação de DNA genômico e água livre de RNase. A reação é incubada por 5 min a 42°C, e imediatamente a seguir em gelo por 1 min.

- Transcrição reversa: Após a eliminação de DNA, adiciona-se aos 10 µL resultantes o mix para a reação de transcrição reversa, contendo 4 µL de tampão 5x, 1 µL de controle P2, 2 µL de transcriptase reversa e água livre de RNase para completar 10 µL. Incuba-se a mistura a 42°C por 15 min e a reação é imediatamente interrompida a 95°C por 5 min. Adiciona-se 91 µl de água livre de RNase.

- PCR Array: Para realizar-se a PCR utiliza-se 102 µL de cDNA obtido do procedimento anterior, 1350 µL de Mastermix e 1248 µL de água livre de nucleases. Distribui-se a reação na placa fornecida pelo fabricante. As placas são amplificadas em aparelho de Real Time da Applied 7500 (California, EUA) com a seguinte programação: primeiro ciclo de 95°C por 10 min, 40 ciclos compostos por 15 seg a 95°C, 1 min a 60°C. Para análise utilizou-se programa online fornecido pela Qiagen *RT² Profiler PCR Array Data Analysis*.

O software do fabricante permite a comparação da expressão gênica entre os diferentes tipos celulares pelo método de $[\Delta][\Delta]Ct$. O termo *Ct* (*threshold cycle*) define a intersecção entre a curva de amplificação e linha de *threshold*. É uma medida relativa da concentração do gene alvo na reação de PCR. O método de $[\Delta][\Delta]Ct$ consiste na comparação dos valores de *Ct* das amostras de interesse com o do controle, sendo ambos os valores previamente normalizados pelo *Ct* de um gene *housekeeping*.

Para tanto se utiliza a seguinte relação:

$$[\Delta][\Delta]Ct = [\Delta]Ct, amostra - [\Delta]Ct, controle$$

$$[\Delta]Ct = Ct, amostra - Ct, housekeeping$$

$$\text{Nível de expressão do gene alvo} = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$$

3.9.1 Genes

As placas contêm oligonucleotídeos para 84 genes da via de sinalização por TLR, classificados a seguir por função:

Receptores do tipo Toll: CD180 (LY64), SIGIRR, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10.

Resposta a patógenos específicos:

Bacteriano: CCL2 (MCP-1), CD14, CD180 (LY64), FOS, HRAS, IL10, IL12A, IL1B, IL6, IL8, IRAK1, HMGB1, HSPA1A (HSP70 1A), JUN, LTA (TNFB), LY86 (MD-1), LY96, NFKBIA (IKBA/MAD3), PTGS2 (COX2), RELA, RIPK2, TLR2, TLR4, TLR6, TNFR1, TICAM1 (TRIF).

Viral: EIF2AK2 (PRKR), IFNB1, IFNG, IL12A, IL6, IRF3, PRKRA, RELA, TBK1, TLR3, TLR7, TLR8, TNF, TICAM1 (TRIF).

Fúngico/Parasitário: CLEC4E, HRAS, HSPA1A (HSP70 1A), IL8, TLR2, TIRAP.

Sinalização por TLR:

Regulação Negativa: SARM1, SIGIRR, TOLLIP.

TICAM1 (TRIF) -Dependente (MYD88-Independente): IRF3, MAP3K7 (TAK1), TAB1, NR2C2, PELI1, TBK1, TICAM2, TLR3, TLR4, TRAF6, TICAM1 (TRIF).

MYD88-Dependente: IRAK1, IRAK2, MAP3K7 (TAK1), TAB1, MYD88, NR2C2, TIRAP, TLR1, TLR10, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TRAF6.

Vias a jusante e genes alvos:

Via de NFκB: BTK, CASP8, CHUK (IKKα), ECSIT (SITPEC), FADD, IKBKB, IL10, IL1B, IRAK1, IRAK2, IRF3, LY96,

MAP3K1 (MEKK), MAP3K7, MAP4K4, NFKB1, NFKB2, NFKBIA (IKBA/MAD3), NFKBIL1, NFRKB, PPARA, REL, RELA, TNF, TNFR1, UBE2N, UBE2V1.

Via JNK/p38: ELK1, FOS, IL1B, JUN, MAP2K3 (MEK3), MAP2K4 (JNKK1), MAP3K1 (MEKK), MAP3K7, MAPK8 (JNK1), MAPK8IP3, TNF.

Via JAK/STAT: CCL2 (MCP-1), CSF2 (GM-CSF), IFNG, IL12A, IL2, IL6.

Via de fatores regulatórios de interferon: CXCL10 (INP10), IFNA1, IFNB1, IFNG, IRF1, IRF3, TBK1.

Via de sinalização mediada por citocinas: CCL2 (MCP-1), CSF3 (GCSF), IL1A, IL1B, IL6, IRAK1, IRAK2, RELA, SIGIRR, TNF, TNFR1.

Regulação de imunidade adaptativa: CD80, CD86, HSPD1, IFNG, IL10, IL12A, IL1B, IL2, MAP3K7, TRAF6.

Adaptadores e proteínas que interagem com TLR: BTK, CD14, HMGB1, HRAS, HSPA1A (HSP70 1A), HSPD1, LY86 (MD-1), LY96 (MD-2), MAPK8IP3, MYD88, PELI1, RIPK2, SARM1, TICAM1 (TRIF), TICAM2 (TRAM), TIRAP, TOLLIP.

Efetores: CASP8 (FLICE), EIF2AK2 (PRKR), FADD, IRAK1, IRAK2, MAP3K7 (TAK1), TAB1, NR2C2, PPARA, PRKRA, ECSIT (SITPEC), TRAF6, UBE2N, UBE2V1.

3.10 Extração proteica

A extração de proteínas das culturas celulares em monocamada foi realizada mediante lise celular em tampão de lise RIPA (150 mM de NaCl, 5 mM de EDTA, 50 mM de Tris-HCl pH8, 1% NP-40, 0,5% Na-deoxycholate, 0,1% de SDS) suplementado com inibidores de proteases e posterior separação da fração proteica solúvel dos *debris* celulares. A concentração proteica foi determinada por Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

3.11 Quantificação de proteínas

Método Bradford: Inicialmente prepara-se uma curva padrão e a amostra a ser quantificada em placas. A partir de uma solução de BSA estoque a 2 mg/mL realiza-se diluições seriadas em água destilada para a obtenção das demais concentrações, 5 mg/mL, 2,5 mg/mL, 1 mg/mL e 0,5 mg/mL, possibilitando assim a construção de uma curva. A seguir prepara-se as amostras e as diluições, adicionando-se 1 µL dessas à 200 µL do reagente de Bradford. Incubam-se as reações a temperatura ambiente por 5 minutos e mede-se a absorbância a 595 nm. Os dados obtidos são dispostos em um gráfico no programa Excel do Pacote Office, permitindo assim o cálculo da concentração da amostra.

3.12 Monitoramento da expressão de proteínas

3.12.1 SDS-PAGE

A análise da expressão proteica foi realizada através de eletroforese em gel de poliacrilamida em concentrações de 12%, sob condições desnaturantes, que garantem a completa dissociação das proteínas. Para tanto é utilizado o detergente SDS em combinação com o reagente redutor Ditionitrol (DTT).

3.12.2 Western Blot

Após as amostras percorrerem o gel de poliacrilamida, as proteínas fracionadas foram transferidas para membrana PVDF, durante 1,5 hs no máximo, em uma voltagem de 0,8 V por cm² de membrana.

Após a transferência para a membrana de *polyvinylidene fluoride* (PVDF, Amersham Biosciences, GE Healthcare, Chicago, EUA) procedeu-se ao bloqueio durante uma hora em *Phosphate Buffer Saline* (PBS) /Tween (0,1%) /

Leite em pó, desnatado (5%). Ao término desse período, essa membrana foi lavada em PBS/Tween (0,1%) por três vezes de 5 minutos. Foi então, incubada com anticorpo primário contra a proteína de interesse em diluição específica (Tabela 1), durante duas horas.

A membrana foi novamente lavada e incubada com anticorpo secundário específico anti-mouse (115-035-003) ou anti-rabbit (111-035-003) conjugado a peroxidase (Jackson ImmunoResearch, Pensilvânia, EUA). A reatividade específica do anticorpo à proteína foi analisada utilizando o kit ECL (Amersham Biosciences, GE Healthcare, Chicago, EUA), através de uma reação de quimioluminescência entre a peroxidase conjugada ao anticorpo e o seu substrato. O filme foi recortado e em condição de ausência de luz foi exposto à membrana durante um período de 1 a 10 minutos e revelado.

Tabela 1: Lista de anticorpos utilizados e respectivas concentrações.

Proteína Reconhecida	Marca do Anticorpo	Número de Catálogo	Concentração Utilizada
HMGB1	Abcam	Ab79823	1:10000
IRAK4	Abcam	Ab119942	1:1000
TBK1	Abcam	Ab40676	1:1000
UBE2N	Abcam	Ab109286	1:1000
TNFR1	Abcam	Ab19139	1:1000
CASP8	Abcam	Ab32125	1:3000
FADD	Abcam	Ab108601	1:500
MYD88	Abcam	Ab2064	1:500
TRAF6	Abcam	Ab33915	1:1000
TLR4	Abcam	Ab22048	1:500
SARM1	Abcam	Ab115561	1:3000

3.13 Imunofluorescência e Imunohistoquímica (IHQ)

Culturas em monocamada foram realizadas em lâminas de cultura (Nunc™ Lab-Tek™ Chamber Slide) e após fixação em formalina e permeabilização com metanol, foram incubadas durante a noite com anticorpo primário específico. A seguir realizou-se lavagens com PBS e nova incubação com anticorpo secundário conjugado a alexa 488 (Carlsbad, CA, USA). Usou-se também coloração nuclear com DAPI.

Para imunohistoquímica, culturas organotípicas fixadas e emblocadas em parafina foram cortadas em fatias de 4 µm. As lâminas foram desparafinizadas incubando-se a 65°C por uma hora e a seguir re-hidratadas. A recuperação antigênica foi realizada por 10 minutos em Citrato de Sódio 10mM pH 6.0 a 95°C em banho-maria. Após neutralização de peroxidase endógena, as lâminas foram incubadas em solução de bloqueio e a seguir mantidas durante a noite em câmara úmida na presença do anticorpo primário específico. A revelação da marcação seguiu o protocolo do fabricante do kit Novolink™ Polymer Detection Systems (Novocastra, Leica, Ilínois, EUA). A contra-coloração foi realizada com hematoxilina por 1 minuto. As imagens foram adquiridas com a câmera digital Olympix DP70 e microscópio Olympus Provis IX70.

3.14 Produção de Lentivírus e Silenciamento Gênico

Para o silenciamento de HMGB1 foram produzidas partículas lentivirais a partir de plasmídeos comerciais contendo sequências específicas para o silenciamento dos genes estudados ou contendo uma sequência embaralhada

(Scrambled) utilizada como controle negativo (MISSION® Lentiviral System, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Células HEK293T foram transfectadas com uma solução contendo 2,6 µg do plasmídeo comercial, 16 µl de FUGENE HD (Promega, Wisconsin, EUA), 182 µl de DMEM e 26 µl do MISSION® Lentiviral Packaging Mix (SHP001, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Coletas de meio foram realizadas após 48 e 72 hs da transfecção e estocados a -70°C até utilização.

Para realizar os silenciamentos, células SiHa, HeLa e NHEK foram transduzidas com meio filtrado proveniente da produção de lentivírus, contendo ainda 10 µg/mL de Polibreno (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Após 48 hs as células foram submetidas à seleção com 2,5 µg/mL de puromicina até a morte completa das células controle não transduzidas. As células assim selecionadas foram utilizadas em diversos experimentos.

3.15 Ensaio de Viabilidade Celular

Para medir viabilidade celular, foram plaqueadas 2000 células em placas de 96 poços e a seguir infectadas com MOI (Multiplicidade de Infecção) de 10 de lentivírus contendo uma sequência *Scrambled* ou shRNA para silenciamento de genes específicos (MISSION® Lentiviral System, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Cinco dias após a infecção, utilizou-se o reagente AlamarBlue (Thermo Fisher, Massachusetts, EUA) de acordo com as instruções do fabricante, adicionando-se uma quantidade de AlamarBlue equivalente a 10% do volume da cultura. A cada hora, durante 8 hs, a absorbância das placas foi medida em comprimentos de onda de 570nm e 600nm. Os resultados gerados em termos

de quantidade de redução de AlamarBlue, onde quanto maior a redução maior a viabilidade celular.

3.16 Ensaio clonogênico e de proliferação

Para o ensaio clonogênico, células transduzidas com *Scrambled* RNA ou silenciadas para HMGB1 foram semeadas em baixa densidade com 100 células por poço em placa de 6 poços. Após 2 semanas, o número de colônias formadas foram contadas em câmara de Neubauer. Para o ensaio de proliferação, foram semeadas 1000 células por poço em placa de 24 poços e a cada dia foram contadas triplicatas, totalizando oito dias de contagem.

3.17 Análise de produção de citocinas

A análise de expressão de citocinas foi realizada utilizando-se o kit *Proteome Profiler Human Cytokine Array Kit, Panel A* (R&D Systems, Mineápolis, EUA) segundo protocolo descrito pelo fabricante. Brevemente, as amostras previamente extraídas foram adicionadas à membrana contendo o painel de anticorpos para diversas citocinas. Acrescentou-se o coquetel de detecção de anticorpos e incubou-se durante a noite a 4°C.

Após lavagens e incubação com Estreptavidina-HRP, revela-se as membranas expondo a filmes autorradiográficos utilizando-se procedimento semelhante ao Western Blot.

As citocinas identificadas estão listadas na Tabela 2.

Tabela 2: Citocinas detectadas pelo kit *Proteome Profiler Human Cytokine Array Kit, Panel A - R&D Systems*.

Sigla	Nome
C5a	Complement Component 5
CD40 ligand	CD40 Antigen Ligand, TNF-Related Activation Protein
G-CSF	Colony Stimulating Factor 3 (Granulocyte)
GM-CSF	Colony Stimulating Factor 2 (Granulocyte-Macrophage)
CXCL1/GRO alpha	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity alpha)
CCL1/I-309	Chemokine (C-C motif) ligand 1
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IFN-gamma	Interferon, gamma
IL-1 alpha	Interleukin 1, alpha
IL-1 beta	Interleukin 1, beta
IL-1ra	Interleukin 1 Receptor, Type I
IL-2	Interleukin 2
IL-4	Interleukin 4
IL-5	Interleukin 5
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
IL-10	Interleukin 10
IL-12 p70	Interleukin 12
IL-13	Interleukin 13
IL-16	Interleukin 16
IL-17	Interleukin 17
IL-17E	Interleukin 25
IL-23	Interleukin 23
IL-27	Interleukin 27
IL-32 alpha	Interleukin 32 alpha
CXCL10/IP-10	Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 10
CXCL11/I-TAC	Chemokine (C-X-C motif) ligand 11
CCL2/MCP-1	Chemokine (C-C Motif) Ligand 2, Monocyte Chemotactic Protein 1
MIF	Macrophage Migration Inhibitory Factor
CCL3/MIP-1 alpha	Chemokine (C-C motif) ligand 3
CCL4/MIP-1 beta	Chemokine (C-C motif) ligand 4
CCL5/RANTES	Chemokine (C-C motif) ligand 5
CXCL12/SDF-1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12
Serpin E1/PAI-1	Serpin Peptidase Inhibitor, clade E
TNF-alpha	Tumor Necrosis Factor alpha
TREM-1	Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 1

3.18 Análise de Ciclo Celular

Para análise de ciclo celular, 20000 células foram plaqueadas em placas de 6 poços e no dia seguintes transduzidas com lentivírus para silenciamento de HMGB1. Após 5 dias da transdução, tanto o meio de cultura quanto as células foram centrifugadas juntas a 1200 rpm por 5 min. A seguir o pellet de células foi ressuspensão em 500 μ L de etanol 70% e armazenado a 4°C até a leitura no citômetro de fluxo BD Accuri C6 (BD Biosciences, California, EUA).

Antes da citometria de fluxo, as células foram novamente centrifugadas para retirada do etanol e lavadas com 500 μ L de PBS 1X. Após a retirada do PBS, utilizou-se 500 μ L de uma solução corante para DNA contendo: 30 μ L de Triton X100, 300 μ L RNase A 20 mg/mL, 60 μ L Iodeto de Propídeo 10 mg/mL e 29,61 mL PBS1X. Incubou-se as amostras por 30 min e a seguir foram centrifugadas e lavadas com PBS 1X, por fim, foram ressuspensas em 500 μ L de PBS 1X e passadas no citômetro de fluxo.

Foram adquiridos o maior número de eventos no citômetro e a seguir utilizados *gates* para separação da população a ser analisada como demonstrado na Figura 4. O *gate* 1 separa a população de células de *debris* no gráfico plotado seguindo as medidas de *Foward* e *Side Scatter*, que representam tamanho e granulosidade celular, respectivamente. A seguir as células contidas no *gate* 1 são plotadas utilizando-se a medida de FL2, que representa a leitura de iodeto de propídeo, e, portanto, da quantidade de DNA. FL2-A e FL2-H, representam o total e a intensidade da emissão na leitura de fluorescência respectivamente, assim separa-se células individuais de grumos celulares, pois numa mesma intensidade, leituras de áreas maiores são provenientes de grumos enquanto com áreas menores indicam células individuais com maior quantidade de DNA

como acontece por exemplo durante a duplicação de DNA no ciclo celular. Nesse ponto, usou-se o *gate* 2 para separar as células individuais. Com as leituras das células do *gate* 2, plotou-se a medida de FL2-A pelo número de células, os picos obtidos foram separados de acordo com as fases do ciclo G0-G1, S, G2-M e população hipodiplóide indicativa de apoptose. Os valores assim obtidos foram utilizados para confecção dos gráficos usando os programas FlowJo (FlowJo Enterprise, Oregon, EUA) e GraphPad Prism (GraphPad Software, Califórnia, EUA).

Ciclo Celular de HeLa

Figura 4: Configurações utilizadas para análise de amostras para ciclo celular em citômetro de fluxo. A) Eventos totais adquiridos, onde *Gate 1* delimita células e exclui debris; B) Eventos contidos somente no *gate 1*; C) Eventos do *gate 1* organizados segundo intensidade e total de fluorescência para separação de população de células individuais descontando-se grumos, delimitados assim pelo *gate 2*; D) Eventos contidos no *gate 2*; E) Histograma do total de fluorescência pelo número total de células, permite a análise da quantidade de células nas diferentes fases do ciclo celular.

4 Resultados

4.1 Análise de expressão de genes envolvidos na via de TLR

Para determinar o efeito da infecção por HPV na expressão de genes relacionados às vias de sinalização mediadas pelos diferentes TLR, inicialmente foi utilizado um *array* comercial (vide Material e Métodos). Antes, porém, a qualidade do RNA extraído, tanto das linhagens tumorais quanto dos queratinócitos transduzidos, foi determinada por gel de agarose.

Considerou-se que a qualidade de RNA na amostra era satisfatória quando foram detectadas as bandas correspondentes aos RNA ribossomais 28S e 18S sem sinal de degradação, como exemplificado na Figura 5. Quando havia indício de degradação ou quantidade de RNA insuficiente, novas ampolas de células eram descongeladas e o procedimento repetido.

Figura 5: Controle de qualidade do RNA extraído a partir de diferentes linhagens celulares. RNA total extraído de cada cultura celular foi aplicado em gel de agarose 1%. As amostras foram aplicadas na seguinte ordem 1 - NHEK; 2 - NHEK pLXSN; 3 - NHEK pBabe; 4 - NHEK pLXSN HPV16 E6E7 e visualizadas utilizando aparelho fotodocumentador BioDoc (UVP, Califórnia, EUA). As amostras consideradas íntegras apresentam a banda correspondente ao RNA ribossomal 28S mais intensa do que a correspondente a 18S.

Em primeiro lugar visamos determinar a existência de diferenças no padrão de expressão de genes envolvidos nas vias reguladas por TLR entre queratinócitos normais (NHEK) e linhagens celulares derivadas de tumores da cérvix uterina. Para isto utilizou-se como referência os resultados de expressão gênica de NHEK. A Figura 6A apresenta diagramas de Venn representando a quantidade de genes diferencialmente expressos entre as diferentes linhagens tumorais e NHEK, considerando-se somente os que apresentaram p valor menor de 0,05 e expressão 2 vezes maior ou menor que o controle.

Figura 6: Comparação da expressão de genes envolvidos nas vias de sinalização mediadas por TLR entre queratinócitos normais e linhagens celulares derivadas de tumores da cérvix uterina. Representação por Diagramas de Venn do número de genes diferencialmente expressos em cada comparação. Foram utilizados como grupo referência A) NHEK (C33A = C33A vs NHEK; SiHa = SiHa vs NHEK; HeLa = HeLa vs NHEK) ou B) C33A (SiHa = SiHa vs C33A; HeLa = HeLa vs C33A). Foram considerados apenas genes com *fold* > 2 ou *fold* < -2, e p-valor < 0,05.

Dos 84 genes representados no *Array*, 12 mostraram-se significativamente alterados nas 3 linhagens tumorais, 16 alterados exclusivamente nas linhagens HPV positivas comparadas com células normais (Fig. 6A). Desses 28 genes alterados, 24 apresentaram-se regulados negativamente e 4 positivamente em SiHa e/ou HeLa (Tab. 3 e 4). A Figura 7

agrupa os genes e amostras de acordo com o padrão de alteração da expressão, agrupando por similaridade SiHa e HeLa (grupo 3 e 2). Em anexo os resultados de expressão dos 84 genes obtidos pelo kit *PCR Array*, independente do p valor obtido.

Tabela 3: Nome, alteração relativa no nível de expressão (fold: amostra/controle) e p-valor dos genes da via de sinalização por TLR diferencialmente expressos entre as linhagens derivadas de tumores de colo do útero HPV positivas e queratinócitos normais (controle). NS: Não Significativo

	HeLa		SiHa	
	<i>Fold</i>	p valor	<i>Fold</i>	p valor
TLR1	NS	NS	-16,3299	0,043127
CD180	6,40	0,04	NS	NS
CCL2	16,37	0,0004	NS	NS
EIF2AK2	-7,83	0,02	NS	NS
IKBKB	-2,65	0,005	NS	NS
MAP3K1	-2,82	0,0004	NS	NS
PRKRA	-2,37	0,01	NS	NS
TICAM2	-3,41	0,03	NS	NS
TLR9	-5,30	0,04	NS	NS
TRAF6	-6,00	0,02	NS	NS
TLR4	38,49	0,0003	8,86	0,03
TLR10	-8,69	0,002	-4,74	0,004
REL	-4,28	0,0009	-2,98	0,001
TICAM1	-5,03	0,001	-5,63	0,001
MAP3K7	-3,18	0,004	-2,19	0,005
MAP4K4	-4,90	0,005	-2,73	0,009

Entre os genes significativamente alterados, foram identificados a maioria dos receptores do tipo *Toll*, no entanto somente o TLR4 mostrou-se

positivamente regulado. Além disso, diversos genes relacionados à via de sinalização por MAP quinases, como MAP3K7, foram regulados negativamente.

Tabela 4: Nome, alteração relativa no nível de expressão (fold: amostra/controle) e p-valor dos genes da via de sinalização por TLR diferencialmente expressos entre as linhagens derivadas de tumores de cólo de útero HPV positivas e negativas e queratinócitos normais (controle).

	C33A		HeLa		SiHa	
	<i>Fold</i>	p valor	<i>Fold</i>	p valor	<i>Fold</i>	p valor
SARM1	18,26	0,0001	6,94	0,003	116,05	0,021
RIPK2	2,44	0,0002	-5,43	0,002	-2,57	0,004
IRAK4	4,03	0,0001	-5,89	0,009	-2,99	0,04
IL12A	3,72	0,00008	-5,20	0,001	-2,65	0,001
IL1A	-2725,86	0,002	-820,29	0,002	-478,05	0,002
IL1B	-2584,79	0,005	-2407,52	0,005	-187,37	0,005
LY96	-18,88	0,03	-739,29	0,03	-99,89	0,03
PELI1	-2,96	0,01	-10,95	0,003	-6,11	0,005
PTGS2	-1356,65	0,0004	-174,04	0,0004	-19,09	0,0005
TLR2	-77,12	0,006	-560,27	0,005	-55,56	0,006
TLR3	-2,10	0,02	-12,40	0,001	-4,41	0,005
TLR5	-3,10	0,04	-27,53	0,01	-11,95	0,01

A seguir, com o intuito de identificar alterações na expressão gênica que possam estar associadas à presença do HPV foi realizada uma comparação utilizando com grupo referência a linhagem derivada de carcinoma do colo do útero, HPV-negativa, C33. Dessa maneira identificamos 62 genes significativamente alterados entre SiHa e/ou HeLa e C33A (Fig. 6B). Destes 47 genes eram comuns a ambas as linhagens HPV-positivas. Devido ao alto número de genes alterados, restringiu-se a análise aos genes que se apresentaram 4 vezes mais ou menos expressos em relação ao controle. Esses genes estão listados na Tabela 5.

Corroborando o resultado obtido na comparação anterior, novamente TLR4 aparece regulado positivamente, e genes da via de MAP quinase (MAP3K7) além de algumas interleucinas reguladas negativamente, assim como a maioria dos demais genes identificados.

Figura 7: Agrupamento das amostras em função do padrão de expressão de 84 genes envolvidos nas vias de sinalização por TLR. Dados representativos em cores da expressão gênica relativa entre as culturas estudadas Grupo controle: NHEK, Grupo 1: C33A, Grupo 2: SiHa, Grupo 3: HeLa. O vermelho indica alta expressão gênica e a cor verde indica baixa expressão.

Tabela 5: Nome, alteração relativa no nível de expressão (fold: amostra/controle) e p-valor dos genes da via de sinalização por TLR diferencialmente expressos entre as linhagens derivadas de tumores de cólo de útero HPV positivas e linhagem tumoral HPV negativa C33A (controle).

	HeLa		SiHa	
	<i>Fold</i>	p valor	<i>Fold</i>	p valor
CD86	-16,04	0,0007	-8,55	0,001
CLEC4E	-16,04	0,0007	-8,55	0,001
HMGB1	-18,17	0,001	-6,12	0,002
IFNG	-10,08	0,003	-8,68	0,001
IL12A	-19,39	0,00002	-9,87	0,00002
IL2	-8,21	0,004	-6,92	0,001
IRAK4	-23,82	0,000005	-12,07	0,00003
MAP2K3	-10,17	0,002	-5,31	0,002
MAP3K7	-5,80	0,0001	-4,00	0,00005
MAPK8	-13,27	0,0005	-4,69	0,001
RIPK2	-13,27	0,000007	-6,29	0,000005
TBK1	-11,42	0,007	-4,54	0,01
TLR10	-20,97	0,01	-11,44	0,01
TLR8	-16,04	0,0007	-4,56	0,003
UBE2N	-9,30	0,00006	-5,35	0,00006
TLR4	57,24	0,0001	13,18	0,01
TNFR1	195,24	0,002	333,88	0,006
CASP8	44,29	0,0004	64,37	0,006
FADD	7,23	0,01	7,87	0,005
JUN	14,91	0,0001	12,40	0,01

Visando determinar o efeito da expressão das proteínas E6 e E7 de HPV de alto e baixo risco oncogênico na expressão de genes envolvidos nas vias de sinalização por TLR realizamos uma análise semelhante utilizando queratinócitos transduzidos com genes que codificam as proteínas E6 e E7 de

HPV16 e HPV11. Mediante esta abordagem identificamos uma série de genes diferencialmente expressos entre as células expressando E6 e E7 de HPV e seus respectivos controles contendo vetores retrovirais vazios. Interessantemente, todos os genes diferencialmente expressos (p valor $< 0,05$) nos queratinócitos contendo E6 e E7 de HPV16 foram regulados negativamente, incluindo genes da via de MAP quinase, TLR8, o adaptador Myd88, TRAF6, TICAM1, CLEC4E, também presentes na análise das células tumorais (Tab. 6).

Tabela 6: Genes significativamente alterados em queratinócitos transduzidos com E6 e E7 de HPV16 e HPV11, utilizando-se como controle células transduzidas com vetor retroviral vazio.

	HPV11			HPV16 E6E7	
	p valor	Fold Regulation		p valor	Fold Regulation
ELK1	0,040983	2,1165	CLEC4E	0,029545	-1,573
IFNB1	0,000165	-2,7992	IRF3	0,001475	-1,3349
IRAK2	0,000128	1,6453	MAP2K4	0,013491	-1,64
IRAK4	0,047751	-1,2909	MAP3K7	0,004867	-1,5547
MAP4K4	0,027001	1,604	MAP4K4	0,006523	-1,6524
PPARA	0,036028	1,2128	MYD88	0,004835	-2,5783
PRKRA	0,006206	-1,4093	PELI1	0,046094	-1,4024
PTGS2	0,031448	1,788	PPARA	0,002602	-1,6613
REL	0,011909	-1,5458	TICAM1	0,002	-2,0116
TICAM2	0,031427	1,528	TLR8	0,029545	-1,573
TLR5	0,014851	-2,2268	TRAF6	0,019721	-1,8452
			UBE2N	0,031635	-1,765

Para complementar os resultados, extraiu-se RNA íntegro de culturas organotípicas transduzidas com vetores retrovirais. Esse tipo de cultura permite a análise da expressão dos genes da via de sinalização por TLR considerando-se um modelo de diferenciação, mais próximo das condições naturais de

infecção por HPV. Utilizou-se pLXSN e pBABE como vetores controle e pLXSN HPV16 E6E7 e pBABE HPV11 E6E7, para expressar as proteínas oncovirais de HPVs de alto e baixo risco oncogênico.

Entre os genes diferencialmente expressos fica evidente a regulação positiva na presença de E6 e E7 de HPV11, e preferencialmente negativa na presença de HPV16 (Tab. 7). Dos 10 genes diferencialmente expressos, 9 foram regulados negativamente nas culturas organotípicas que expressavam HPV16 E6E7, enquanto todos os 12 genes diferencialmente expressos foram regulados positivamente nas que expressavam HPV11 E6E7 quando comparadas aos controles.

Muitos desses genes também foram identificados nas células tumorais. Comparando-se com os resultados das tabelas anteriores repetem-se genes da via de MAP quinases, TLRs, UBE2N, CLEC4E e HMGB1.

Tabela 7: Genes significativamente alterados em culturas organotípicas com queratinócitos transduzidos com E6 e E7 de HPV16 e HPV11, utilizando-se como controle células transduzidas com vetor retroviral vazio.

HPV11			HPV16 E6E7		
	p valor	<i>Fold Regulation</i>		p valor	<i>Fold Regulation</i>
ECSIT	0,00956	1,55	CLEC4E	0,044512	-1,45
ELK1	0,005488	1,46	IFNA1	0,037152	-1,82
HMGB1	0,003904	1,39	IRF1	0,023604	-2,37
HSPA1A	0,039017	1,49	MAP2K4	0,0279	-1,64
IRAK1	0,005133	1,35	MAP3K1	0,042339	-1,38
MAP3K1	0,036053	1,76	PPARA	0,008069	1,35
MAPK8	0,049347	1,31	TAB1	0,026659	-1,33
NFKB1	0,0269	1,36	TLR6	0,013763	-3,17
NR2C2	0,021353	1,25	TLR8	0,044512	-1,45
PPARA	0,042914	1,24	UBE2N	0,045441	-2,56
TBK1	0,03145	1,32			
TNFRSF1A	0,049309	1,44			

4.2 Validação dos dados de expressão gênica por análise de proteínas

A análise de expressão gênica ao nível de RNAm permite determinar o padrão de expressão de genes associados a um processo específico. No entanto, os níveis de RNAm podem não refletir os níveis da proteína codificada. Assim, resolvemos validar alguns de nossos resultados analisando a expressão de proteínas selecionadas. Após as análises por *PCR array*, foram escolhidos, baseados em suas descrições na literatura, 13 genes para confirmação da expressão proteica através de Western Blot: FADD, Ube2N, IRAK4, TBK1, HMGB1, TRAF6, Caspase 8, TLR4, TNFR1, MyD88 e SARM1.

As Figuras 8, 9 e 10 mostram os resultados obtidos para expressão proteica desses genes. Para culturas transduzidas com vetores retrovirais, os controles foram células transduzidas com vetores vazios, já para as culturas tumorais o controle utilizado foi de células normais NHEK.

Para as moléculas adaptadoras Myd88 e SARM1, os resultados indicam maiores alterações nas linhagens tumorais. No entanto o que chama a atenção é o efeito oposto apresentado entre elas, enquanto Myd88, que é uma proteína adaptadora responsável pela ativação da via de TLR, é menos expressa nas linhagens tumorais, a proteína adaptadora SARM1 que regula negativamente a via de TLR, é muito mais expressa, inclusive nas linhagens que expressam E6E7 de HPV (Fig. 8).

Já analisando a expressão de TBK1, proteína responsável por mediar a ativação de NF κ B, a alteração mais evidente ocorreu em HeLa, com a diminuição tanto dos níveis proteicos quanto de RNAm, o que pode ser um indício de um papel mais relevante na tumorigênese desencadeada por HPV18 (Fig. 8).

A proteína TRAF6 media a sinalização tanto de receptores da família de TNF quanto da família de Toll/IL-1, e sua expressão mostrou-se muito menor nas linhagens tumorais (Fig. 8).

Ao analisar a expressão de HMGB1, proteína envolvida tanto em processos inflamatórios desencadeados por TLR quanto em remodelamento de cromatina durante reparo e transcrição de DNA, nota-se a presença de maiores níveis deste fator em extratos proteicos de linhagens tumorais e de células transduzidas com E6E7 de HPV quando comparadas com os respectivos controles (Fig. 8).

Ao analisar a expressão de FADD e Caspase 8, proteínas associadas ao desencadeamento de apoptose, não observamos fortes concordâncias entre níveis de RNAm e proteína, já que apresentaram altos níveis de RNAm e menor expressão proteica. Vale ressaltar que para FADD há menor expressão em células transduzidas com E6E7 de HPV16. E para ambas as proteínas há regulação negativa da expressão em células HPV positivas (Fig. 9).

A proteína Ube2N, assim como a TRAF6 com quem interage para a ativação da via por NF κ B, mostrou grande diminuição dos níveis de expressão nas linhagens tumorais (Fig. 9).

O receptor do fator de necrose tumoral 1 (TNFR1) regula a resposta imune e inflamatória, podendo potencializar a resposta gerada pela sinalização por TLR. Apesar de observarmos níveis maiores de mRNA para este fator nas linhagens tumorais SiHa e HeLa, a expressão proteica de TNFR1 foi muito menor na linhagem SiHa, HPV16 positiva, e sem alteração aparente em HeLa, linhagem HPV18 positiva (Fig. 10).

Já a quinase tipo 4 associada ao receptor de Interleucina 1 (IRAK-4), que também está envolvida na ativação de NF- κ B, apresentou tanto os níveis de mRNA quanto proteicos diminuídos nas linhagens tumorais HPV positivas (Fig 10).

A quantificação proteica de TLR4 mostrou maior expressão nas células tumorais assim como observado em termos de RNAm (Fig. 10).

Figura 8: Efeito da presença de HPV na expressão proteica de SARM1, Myd88, TBK1, TRAF6 e HMGB1. Foram utilizados 30 μ g de extratos proteicos totais obtidos a partir das diferentes culturas em WB. A quantificação das bandas foi realizada por densitometria e utilizou-se actina como controle de aplicação de quantidades equivalentes de proteínas. O valor das amostras controle foi considerado como 1 e usadas para calcular o valor relativo das demais amostras. Para culturas transduzidas com vetores retrovirais foram considerados como controles extratos de células transduzidas com vetores vazios, já para as culturas tumorais o controle utilizado foi correspondeu a extratos obtidos a partir de culturas de células normais. NHEK – queratinócitos humanos primários; C33A – linhagem tumoral HPV negativa; SiHa e HeLa – linhagens tumorais HPV positivas. Amostras aplicadas: 1 - NHEK pLXSN, 2 - NHEK pLXSN HPV16E6E7, 3 - NHEK pBABE, 4 - NHEK pBABE HPV11E6E7, 5- NHEK, 6 -C33A, 7 – SiHa e 8 – HeLa.

Figura 9: Efeito da presença de HPV na expressão proteica FADD, Caspase 8, Ube2N. Foram utilizados 30 µg de extratos proteicos em WB. A quantificação das bandas foi realizada por densitometria e utilizou-se tubulina como controle de aplicação. O valor das amostras controle foi considerado como 1 e usadas para calcular o valor relativo das demais amostras. Para culturas transduzidas com vetores retrovirais foram considerados como controles células transduzidas com vetores vazios, já para as culturas tumorais o controle utilizado correspondeu a extratos obtidos a partir de culturas de células normais. NHEK – queratinócitos humanos primários; C33A – linhagem tumoral HPV negativa; SiHa e HeLa – linhagens tumorais HPV positivas. Amostras aplicadas: 1 - NHEK pLXSN, 2 - NHEK pLXSN HPV16E6E7, 3 - NHEK pBABE, 4 - NHEK pBABE HPV11E6E7, 5- NHEK, 6 -C33A, 7 – SiHa e 8 – HeLa.

Figura 10: Efeito da presença de HPV na expressão proteica deTLR4, IRAK4 e TNFR1. Foram utilizados 30 µg de extratos proteicos e utilizou-se tubulina como controle de aplicação. O valor da amostra controle NHEK foi considerado como 1 e usada para calcular o valor relativo das demais amostras. NHEK – queratinócitos humanos primários; C33A – linhagem tumoral HPV negativa; SiHa e HeLa – linhagens tumorais HPV positivas.

4.3 Análise da expressão proteica em células normais transduzidas com E6 e E7 de HPV16

Objetivando determinar se os efeitos observados nas linhagens tumorais HPV positivas devem-se à expressão das oncoproteínas virais, queratinócitos primários normais foram transduzidos com retrovírus que expressam E6 e/ou E7 de HPV16.

A proteína TLR4 que apresentou maior expressão nas linhagens tumorais também mostrou expressão aumentada na presença de E6 e E7 juntos, mas não quando os genes virais foram expressos separadamente (Fig. 11). Um efeito semelhante foi observado para a proteína TNFR1, onde a diminuição ocorreu na presença de ambas as oncoproteínas assim como na linhagem tumoral HPV16 positiva SiHa (Fig 11).

Já SARM1, regulador negativo da via de TLR, além de apresentar expressão aumentada nas linhagens tumorais, também apresentou maior expressão nas células primárias expressando E6 e E7 de HPV16 ou somente E7 (Fig. 11). E para Ube2N a diminuição da expressão foi observada tanto nas linhagens tumorais quanto em NHEK expressando E7 ou E6/E7 de HPV16 (Fig. 11).

A proteína HMGB1 teve altos níveis de expressão nas células tumorais assim como nas células expressando tanto E6/E7 quanto somente E7 (Fig 12). Para determinar qual função de E7 está envolvida com esse efeito, foram utilizadas NHEK expressando diferentes mutantes de E7 (Tab. 8) (Demers *et al*, 1996; Helt & Galloway, 2001). Os mutantes de E7 de HPV16 cuja expressão não foi capaz de induzir o aumento na expressão de HMGB1 foram E7 2pro e E7 D6-

10, ambas contendo mutações que as tornam incapazes de degradar a proteína retinoblastoma (Rb) (Fig. 12).

Figura 11: Efeito de E6 e E7 de HPV16 na expressão proteica de TLR4, SARM1, Ube2N e TNFR1 em queratinócitos humanos primários. Foram utilizados 30 µg de extratos proteicos e utilizou-se tubulina como controle de aplicação. O valor da amostra controle NHEK foi considerado como 1 e usada para calcular o valor relativo das demais amostras.

Figura 12: Efeito da expressão de E6 e E7 de HPV16 na expressão de HMGB1 em culturas de queratinócitos humanos primários (NHEK). Foram utilizados 30 µg de extratos proteicos e utilizou-se tubulina como controle de aplicação. O valor da amostra controle NHEK foi considerado como 1 e usada para calcular o valor relativo das demais amostras. WT- Wildtype, controle normal; 2 pro, D6-10, 21S, CVQ, D79-83 – amostras transduzidas com E7 contendo as mutações descritas na Tabela 8.

Tabela 8: Lista de mutantes de E7 de HPV16 utilizados no estudo e suas respectivas alterações funcionais (DEMERS et al., 1996; HELT; GALLOWAY, 2001)

	Imortalização	Ultrapassar Quiescência	Responder a Dano ao DNA	Interação com Rb
E7WT	+	+	+	+
E7 2pro	-	-	-	-
E7 D6-10	-	-	-	-
E7 21S	+	+	+	+
E7 CVQ	-	+	-	+
E7 D79-83	-	+	-	+

4.4 Análise de expressão por Imunofluorescência e Imunohistoquímica

Com o objetivo de confirmar os resultados obtidos e caracterizar a localização celular das proteínas estudadas, realizou-se a seguir imunofluorescência em culturas de células tumorais e queratinócitos transduzidos com E6 e E7 de HPV16.

Confirmando os resultados de Western Blot, HMGB1 apresentou fluorescência mais intensa nas linhagens tumorais e contendo E6 e E7 de HPV16, além de localização nuclear, que pode indicar maior relevância de suas funções relativas a reparo de DNA e remodelamento de cromatina (Fig. 13A-B).

TLR4 apresentou maior fluorescência em células expressando E6 e E7 de HPV16. No entanto, não foi possível determinar se se localiza na membrana ou retido no citoplasma (Fig. 13B).

Tanto MyD88 quanto TNFR1 mostraram níveis menores na presença de E6 e E7, e TNFR1 aparenta mudança de localização celular, para uma região perinuclear, o que seria indicativo de sua incapacidade de ativar a via de sinalização *downstream* (Fig. 13B).

Utilizando-se ainda imunohistoquímica em culturas organotípicas de queratinócitos humanos primários transduzidos com vetores retrovirais que, portanto, assemelham-se a estrutura normal de um tecido infectado por HPV, observou-se maior intensidade de marcação para HMGB1 nas culturas contendo E6 e E7, e novamente com localização nuclear (Fig. 14).

B)

HTE

HTE 16E6E7

PHK

PHK 16E6E7

Figura 13: Efeito da presença de HPV na expressão e localização celular de HMGB1, Myd88, TLR4 e TNFR1 em culturas celulares tumorais e em células normas transduzidas com E6 e E7 de HPV16. A) Marcação nuclear de HMGB1. B) Comparação entre células transduzidas com o vetor vazio ou contendo E6 e E7 de HPV16 para as proteínas HMGB1, MyD88, TLR4 e TNFR1. O resultado é apresentado como *merge* da imagem obtida para marcação por DAPI com a imagem fluorescente.

Figura 14: Efeito de E6 e E7 de HPV16 na expressão proteica de HMGB1 em culturas organotípicas. As culturas coletadas foram fixadas com formalina, parafinizadas e cortadas em seções de 4 µm. Utilizou-se hematoxilina para contra-coloração.

4.5 Efeito do Silenciamento gênico de HMGB1 em linhagens HPV positivas

Considerando o papel de HMGB1 no reparo de DNA e remodelamento da cromatina, e as observações realizadas no Laboratório de Oncovirologia ICB/USP onde o silenciamento de HMGB1 diminui a viabilidade de células HeLa e SiHa, mas sem efeito em células normais (Fig 15), seguiram-se ensaios de proliferação e formação de colônia.

Após realizar a transdução com lentivírus contendo shRNA *Scrambled* ou contendo shRNA para silenciar HMGB1, as células foram selecionadas com puromicina durante uma semana e a seguir plaqueadas para os ensaios.

Figura 15: Alteração da viabilidade de células tumorais HPV positivas após silenciamento de HMGB1. Queratinócitos primários humanos (NHEK), e células tumorais SiHa e HeLa foram silenciadas para HMGB1 com dois shRNA diferentes (C9 e C11) utilizando-se transduções com 10 MOI de lentivírus. A viabilidade foi medida com ensaio colorimétrico Alamar Blue (Thermo Fisher, Massachusetts, EUA). O asterisco indica diferença significativa entre as linhagens tumorais e a linhagem normal (test t $p < 0,01$)

Em relação à proliferação, as células tumorais silenciadas para HMGB1 (si C9 e si C11) sofreram uma redução significativa comparada ao controle contendo a sequência *Scrambled*, enquanto não houve efeito nas células normais (Fig 16). Esse efeito indica que, nas células tumorais, durante o processo de infecção e tumorigênese a proteína HMGB1 passa a ter um papel importante na manutenção da proliferação celular, função essa que parece não ser essencial nas células normais. O mesmo efeito foi observado em células normais transduzidas com E6E7 ou somente E7 de HPV16 (Fig. 16), mostrando redução ao serem silenciadas, sendo mais um indicativo da relação entre E7 e HMGB1. Células normais contendo o vetor vazio ou com E6 de HPV16 ao serem transduzidas com vetores lentivirais pararam de proliferar independentemente se contendo sequência *Scrambled* ou se tiveram HMGB1 silenciado.

Figura 16: Diminuição na cinética de crescimento de culturas de células derivadas de tumores cervicais ou queratinócitos normais transduzidos com E6 e E7 de HPV16 após silenciamento de HMGB1.. Para avaliar o potencial proliferativo as células foram semeadas em placas de 24 poços 1000 células por poço e a proliferação celular foi avaliada do primeiro ao oitavo dia, pela contagem celular em câmara de Neubauer. Não foi observado redução da proliferação de NHEK silenciados para HMGB1 quando comparados ao controle (células transduzidas com o shRNA *Scrambled*). Já nas linhagens tumorais derivadas de câncer de colo uterino: HeLa e SiHa, o silenciamento de HMGB1 foi capaz de inibir a proliferação.

A redução da proliferação e viabilidade pode estar relacionada com aumento da morte celular programada. Para verificar essa possibilidade, caspase 3 ativada foi avaliada em extratos das células silenciadas através de

Western Blot. Ambas as células tumorais HeLa e SiHa apresentaram aumentos nos níveis de caspase 3 após silenciamento de HMGB1 (Fig. 17).

Figura 17: Aumento da ativação de caspase 3 em células tumorais HPV positivas silenciadas para HMGB1. A quantificação das bandas foi realizada utilizando o programa Image J.

Confirmando a presença de apoptose, a citometria de fluxo com marcação com iodeto de propídeo mostrou significativo aumento de população hipodiplóide em HeLa silenciada para HMGB1, sem alteração significativa nas demais populações correspondentes às demais fases do ciclo celular (Fig. 18). Nota-se ainda que a transdução lentiviral altera o perfil da célula, mostrando como a célula reage a presença viral independente do silenciamento. Apesar disso o silenciamento de HMGB1 tem efeito significativo tanto aumentando a população em apoptose como diminuindo o número de eventos detectados durante a citometria, nota-se a diferença de escala entre as células silenciadas e o controle, indício de um número muito menor de células nas amostras silenciadas para HMGB1.

Ciclo Celular de HeLa

Figura 18: Silenciamento de HMGB1 leva ao aumento de população hipodiplóide em células HeLa mas não altera as populações em cada fase do ciclo celular. Citometria de fluxo utilizando-se iodeto de propídeo para marcação de DNA, em amostras de células após 5 dias de silenciamento.

Uma característica importante de células tumorais é a capacidade de formação de colônia independentemente de contato célula a célula. Para determinar a importância de HMGB1 nessa característica, as células tumorais SiHa e HeLa foram testadas em ensaio de formação de colônias. As células silenciadas tiveram significativa redução do número de colônias formadas (Fig 19). Novamente, a falta de HMGB1 teve papel fundamental nas células derivadas de tumor.

Esses resultados em conjunto apontam para uma importante contribuição de HMGB1 no crescimento e sobrevivência de células tumorais, além de alterações significativas de via de sinalização por TLR que podem contribuir para persistência da infecção por HPV, fator de risco determinante do desenvolvimento de neoplasias.

Figura 19: Efeito do silenciamento de HMGB1 no potencial clonogênico de células tumorais. Ensaio clonogênico das linhagens HeLa e SiHa silenciadas para HMGB1. As células foram semeadas em placas de 6 poços (100 células por poço) e após 14 dias foram fixadas com solução de etanol e coradas com cristal violeta. Estas linhagens apresentaram menor capacidade de formação de colônias quando comparadas com as células controle (células transduzidas com o shRNA *Scrambled*). Resultado confirmado por meio de 3 experimentos independentes. $p < 0,05$

4.6 Análise de produção de citocinas

Um dos efeitos da sinalização por TLR é a produção de citocinas pró-inflamatórias, que podem tanto participar na eliminação do patógeno como auxiliar na tumorigênese dependendo do microambiente tumoral.

Para determinar se existe alteração no padrão de expressão dessas citocinas dependendo do tipo de HPV presente na célula, foram estabelecidas culturas organotípicas transduzidas com vetores retrovirais contendo E6 e E7 de HPV16 e HPV11, e seus respectivos controles.

O resultado obtido está representado na Figura 20, onde cada membrana foi incubada com extratos proteicos totais de diferentes de culturas organotípicas contendo pLXSN, pLXSN HPV16 E6E7, pBABE, pBABE HPV11 E6E7. Cada *spot* duplo representa um anticorpo específico em duplicata, identificando-se qual anticorpo pela posição relativa aos controles (2 grupos de *spots* nos cantos superiores e 1 no canto inferior esquerdo). Após quantificação, a densidade dos *spots* e o valor obtido relativo ao controle interno de cada membrana foram utilizados para análise e comparação dos níveis de expressão de citocinas das diferentes amostras. O experimento foi realizado em triplicatas biológicas independentes.

A expressão de citocinas foi baixa no geral, já que não há estímulo externo além da infecção por retrovírus e expressão das oncoproteínas de HPV (Fig. 21). Algumas diferenças são mais facilmente visualizadas, como por exemplo a maior expressão de CD54 em culturas organotípicas contendo pLXSN HPV16 E6E7 comparadas com seu respectivo controle contendo pLXSN, assim como para

IL1 α . No geral, culturas organotípicas contendo HPV11 E6E7 apresentaram regulação positiva da expressão de citocinas.

Figura 20: Exemplo de medição de expressão de citocinas pró-inflamatórias. A) Filme autorradiográfico obtido da revelação das membranas previamente incubadas com amostras de culturas organotípicas contendo pLXSN, pLXSN HPV16 E6E7, pBABE, pBABE HPV11 E6E7, ordenadas nessa ordem; B) Membranas utilizadas fornecidas pelo kit contendo *spots* em duplicata para 36 citocinas; C) Transparência fornecida pelo kit para facilitar a identificação dos *spots* de anticorpos. Nos retângulos os spots utilizados como referência para o cálculo das concentrações relativas e na elipse a posição dos controles negativos.

Figura 21: Resultados de expressão de citocinas pró-inflamatórias em amostras de culturas organotípicas transduzidas com vetores retrovirais pBABE, pBABE HPV11 E6E7, pLXSN, pLXSN HPV16 E6E7. Os valores são relativos às amostras referência.

5 Discussão

5.1 Receptores do tipo Toll e persistência da infecção por HPV

As vias de sinalização por TLR têm um importante papel na eliminação de infecções, além de estarem alteradas em processos tumorais. Por estas razões, nos propusemos a estudá-las em células e tumores causados por HPVs. O intuito foi identificar proteínas dessas vias que estivessem associadas à infecção por HPV, e que, portanto, poderiam ter um papel na persistência viral e/ou desenvolvimento e progressão do câncer cervical. Alterações significativas na expressão gênica foram identificadas em genes relacionados a diferentes níveis da via de sinalização por TLR, desde receptores até proteínas efetoras.

A ativação das vias inicia-se com o reconhecimento de padrões moleculares associados à patógenos pelos receptores do tipo *Toll* (TLR) presentes na membrana da célula ou dos endossomos. Curiosamente, dentre os receptores *Toll* significativamente alterados, somente o TLR4 mostrou-se positivamente regulado tanto nas linhagens derivadas de tumores de colo do útero quanto nas células primárias que expressavam E6 e E7 de HPV16. Isso sugere a possível participação de TLR4 tanto no início da infecção quanto no desenvolvimento tumoral.

Os estudos envolvendo TLR4 em diferentes modelos tumorais apresentam resultados conflitantes. Na carcinogênese hepatocelular a expressão de TLR4 protege contra o desenvolvimento tumoral induzindo a expressão da proteína de reparo Ku70 (WANG et al., 2013). Já em câncer de cólon está associada com a ativação de via Wnt/ β -catenina, importante no desenvolvimento neoplásico (SANTAOLALLA et al., 2013). Em outro estudo foi observado que a ativação de TLR4 por HMGB1 produz uma resposta inflamatória que está associada com o desenvolvimento tumoral em

câncer de pele (MITTAL et al., 2010), e sua ativação possui um papel modulador na inflamação crônica e tumorigênese pulmonar (BAUER et al., 2005). Entretanto, no caso dos tumores causados por HPV, não há dados que determinem com precisão o papel do aumento da expressão de TLR4, somente observações de aumento de expressão em amostras de tumor de colo uterino HPV positivas (HASIMU et al., 2011; WANG et al., 2014).

Os demais TLR identificados em células HPV-positivas estavam presentes em menores quantidades que em células HPV-negativas. Isto sugere a existência de um mecanismo importante de escape ao sistema imune inato, já que a ausência do receptor dificulta uma resposta eficaz contra a infecção viral por parte da célula. Além disso, a diminuição desses receptores pode acarretar impacto na resposta contra outros patógenos, facilitando coinfeções. De fato, em um estudo prospectivo onde genotiparam 25 tipos de HPV em 2478 mulheres sexualmente ativas, positivas para HPV, 1070 (43,2%) estavam infectadas com múltiplos tipos de HPV, ocorrência essa superior ao esperado se encontradas ao acaso (CHATURVEDI et al., 2011), o que indicaria uma propensão a coinfeções. Corroborando essas observações, mulheres com infecções persistentes (detecção de HPV em duas visitas, consecutivas ou não) do estudo de coorte Ludwig-McGill, apresentaram maiores chances de ocorrência de infecções com múltiplos tipos de HPV, sendo essa chance maior ainda quando apresentavam infecção por HPV16 ou HPV18, tipos de alto risco oncogênico (ROUSSEAU et al., 2001).

Sendo a persistência da infecção viral um fator importante para o desenvolvimento tumoral desencadeado pelo HPV, além de estar relacionado com eventos de coinfeção, poderia indicar uma resposta imune inata ineficaz da célula infectada. Seria ainda possível supor que os HPV de alto risco oncogênicos seriam

mais eficientes em inibir a resposta imune inata quando comparados com os tipos de baixo risco oncogênico, já que estão mais intimamente relacionados ao desenvolvimento tumoral, e, portanto, à persistência da infecção.

Notavelmente, ao analisar alterações nas vias de sinalização por TLR na presença de E6 e E7 de HPV16 (alto risco oncogênico) todos os genes diferencialmente expressos observados foram regulados negativamente. Padrão semelhante foi observado em culturas organotípicas, 90% dos genes identificados foram regulados negativamente nas culturas que expressavam E6 e E7 de HPV16. Por outro lado, todos os genes diferencialmente expressos em culturas que expressavam E6 e E7 de HPV11 foram regulados positivamente. Esses resultados parecem indicar que os HPVs de alto risco são capazes de inibir diversos genes envolvidos em respostas anti-virais, enquanto os de baixo risco oncogênico não apresentam a mesma habilidade, ainda mais considerando-se a utilização de um retrovírus para expressão de E6 e E7, que poderiam induzir a resposta imune da célula e aumentar a expressão de genes da via de TLR.

Não somente a expressão gênica indicou a diferença entre as alterações produzidas nas vias de TLR pelos diferentes tipos de HPV, mas também a produção de citocinas sofre alterações dependendo do tipo de HPV presente na célula ou tecido.

As citocinas são as proteínas efetoras resultantes da ativação da via de TLR e são em última análise as responsáveis por estimular uma resposta eficiente contra os patógenos. A diminuição da produção de citocinas em células contendo E6 e E7 de HPV16, quando comparadas ao controle ou a células com HPV de baixo risco, corrobora a hipótese de que estas oncoproteínas de vírus de alto risco determinam respostas anti-virais deficientes o que promove a persistência e maior chance de desenvolvimento tumoral.

5.2 Adaptadores da via de TLR

Além dos receptores, foram identificados vários intermediários das vias de sinalização por TLR significativamente alterados em células derivadas de tumores cervicais. Entre elas, as moléculas adaptadoras Myd88 e SARM1. No entanto, o que chama a atenção é o efeito oposto apresentado entre elas: enquanto Myd88 é menos expressa nas linhagens tumorais, SARM1 é muito mais abundante, inclusive nas linhagens que expressam E6 e E7 de HPV16.

Esse efeito pode estar relacionado com o papel dessas proteínas na sinalização por TLR. Enquanto Myd88 participa da ativação de vias reguladas por TLR, SARM1 atua como competidor da ligação com os receptores do tipo *Toll* e leva à interrupção da sinalização, inibindo a resposta imune inata ativada por estes receptores (BELINDA et al., 2008; PIRAS; SELVARAJOO, 2014). Assim, ambas as regulações, negativamente para Myd88 e positivamente para SARM1, levariam a inibição da ativação das vias de TLR, aumentando ainda mais o efeito de escape do sistema imune inato e permitindo um processo infeccioso mais eficiente e prolongado.

A possível interação de Myd88 e E6 de HPV16 foi verificada por imunoprecipitação pelo Dr. Ismar Haga (FAPESP 2008/53012-8) e os experimentos para identificação do sítio de interação e efeito na produção de citocinas têm sido finalizados pelo colega Lucas Boeno Oliveira (FAPESP 2010/18388-7), cujo projeto também esteve vinculado ao projeto temático a que essa tese fez parte (FAPESP 2008/03232-1).

Considerando essa interação com E6 de HPV16 e a diminuição dos níveis proteicos de Myd88 observados, uma possível consequência da interação direta com E6 seria o direcionamento de Myd88 para degradação pelo proteossomo, assim como ocorre para as proteínas p53, Bak, *E6-Targeted Protein 1* (E6TP1), Scribble e O6-

methylguanine DNA methyltransferase (BANKS et al., 2003; SCHEFFNER et al., 1990).

Já o aumento da expressão de SARM1 pode estar envolvido em outros aspectos relativos à tumorigênese, além do papel na regulação de TLR que auxiliaria no processo infeccioso. Outras funções foram descritas para SARM1 como a participação no processo de mitofagia em conjunto com TRAF6 e *PTEN-induced putative kinase 1* (PINK1) (MURATA et al., 2013); a translocação para o núcleo onde protege e estabiliza lamininas contra a degradação apoptótica em resposta ao $TNF\alpha$, reduzindo fragmentação de DNA (SETHMAN; HAWIGER, 2013); a indução de morte após produção de espécies reativas de oxigênio durante o estresse oxidativo, em nova forma de morte celular programada chamada sarmoptose (SUMMERS; DIANTONIO; MILBRANDT, 2014). No entanto não há descrição na literatura sobre a relação entre SARM1 e câncer ou com infecções por HPV, mas seu papel anti-apoptótico em tratamentos com $TNF-\alpha$ e relação com estresse oxidativo são indicativos de sua participação na carcinogênese. Ambos os processos envolvem participação mitocondrial e são de extrema importância na tumorigênese, sendo a resistência a apoptose importante para sobrevivência da célula tumoral e a produção de espécies reativas de oxigênio durante o estresse oxidativo capaz de indução de mutação do DNA e promoção de metástase durante a progressão tumoral (CHEN et al., 2016).

5.3 Ativação de NF κ B

Seguindo a via de sinalização por TLR, a ativação dos receptores leva a ativação do fator de transcrição NF- κ B (fator nuclear kappa B) e diversas proteínas

diretamente relacionadas com sua ativação foram significativamente alteradas na presença de HPV.

Inicialmente NF- κ B está no citoplasma ligado a seu inibidor I κ B, o que impede sua translocação ao núcleo. Uma gama de estímulos, como os ligantes de TLR, são capazes de ativar um complexo de quinases (IKK) responsáveis por fosforilar o inibidor de NF- κ B levando a sua degradação e liberando assim o NF- κ B para atuar como fator de transcrição (GHOSH; DASS, 2016).

No presente estudo foram identificadas diferencialmente expressas as seguintes proteínas envolvidas com a ativação do complexo IKK: fator associado ao receptor de TNF (TRAF6), enzima conjugadora de ubiquitina 2N (Ube2N) e quinase 4 associada ao receptor de interleucina 1 (IRAK4).

A proteína TRAF6 media a sinalização tanto de receptores da família de TNF quanto da família de Toll/IL-1, interagindo com o complexo Ube2N/Ubc13 e o complexo de IRAK, responsável por ubiquitinar e ativar IKK (LAMOTHE et al., 2007; LI et al., 2002). Tanto TRAF6 quanto Ube2N e IRAK4 tiveram expressão muito menor nas linhagens tumorais.

O mesmo padrão foi observado para o receptor do fator de necrose tumoral 1 (TNFR1). Assim como os TLR, esse receptor também ativa NF- κ B através dos mesmos complexos envolvendo TRAF6, e funciona num mecanismo de retroalimentação positiva com os TLR, maximizando a resposta imune contra patógenos (CHEN et al., 2008; ERMOLAEVA et al., 2008). Em conjunto, a regulação negativa de todos esses fatores indica uma forte tendência ao controle da ativação da sinalização por NF κ B nas células infectadas por HPV.

A relação entre NF- κ B e desenvolvimento tumoral é bem documentada. A ativação constitutiva de NF- κ B foi associada com promoção de proliferação tumoral,

prevenção de apoptose, e aumento do potencial angiogênico e metastático do tumor (KARIN et al., 2002).

No entanto, em células epiteliais a translocação de NF- κ B para o núcleo ocorre na camada de células suprabasal em diferenciação e não na camada basal em proliferação, sugerindo um papel de NF- κ B na mudança de um fenótipo proliferativo para um com parada de ciclo celular e em diferenciação (SEITZ et al., 1998). Além disso, inibição de NF- κ B em queratinócitos epiteliais de camundongos é capaz de causar hiperplasia e surgimento espontâneo de carcinoma de células escamosas (VAN HOGERLINDEN et al., 1999).

Ademais, em células epiteliais humanas que expressam E6 e E7 de HPV16, a atividade de NF- κ B induzida por TNF- α está inibida, e inibição adicional utilizando-se o repressor de NF- κ B (I κ B) aumenta a formação de colônias e imortalização desencadeada pelo HPV16 (VANDERMARK et al., 2012).

Considerando-se os dados em conjunto, a regulação da atividade de NF- κ B através da diminuição de expressão de TRAF6, Ube2N, IRAK4 e TNFR1, teria um papel não só na inibição da via de TLR impedindo a resposta imune contra patógenos, como também seria benéfica para a infecção viral por impedir a diferenciação e estimular a proliferação celular. Além dessas mesmas características serem importantes no processo de desenvolvimento tumoral.

5.4 High Mobility Group Box 1 (HMGB1)

Entre as proteínas efetoras secretadas após ativação de TLR em resposta a infecções está HMGB1. Diferentemente das demais citocinas envolvidas com a

resposta imune inata, HMGB1 participa em outros processos celulares dependendo de sua localização celular.

Inicialmente, HMGB1 foi identificada como uma proteína nuclear não histona, envolvida na estabilização de nucleossomos, transcrição celular, replicação e facilitando o acesso da maquinaria de reparo para regiões que sofreram danos ao DNA (BIANCHI; AGRESTI, 2005). A seguir detectou-se a presença de HMGB1 extracelularmente onde participa de processos inflamatórios, resposta imune, crescimento, proliferação e morte celular (KANG et al., 2014). A Figura 22, apresenta um resumo de todos os processos aos quais HMGB1 está envolvido.

Considerando o papel dessa proteína no processo inflamatório e no remodelamento de cromatina e reparo de DNA, essa proteína pode ser um alvo importante para alterações durante a infecção e progressão tumoral causada por HPV.

A proteína HMGB1 teve altos níveis de expressão nas células tumorais assim como nas células expressando tanto E6/E7 quanto somente E7 de HPV16. Dos mutantes de E7 de HPV16 utilizados, somente E7 2pro e E7 D6-10, ambas incapazes de degradar a proteína retinoblastoma (Rb), não foram capazes de induzir aumento de expressão de HMGB1. Isto poderia sugerir um papel direto de Rb na expressão de HMGB1, ou, alternativamente, um indício da participação do mesmo motivo da proteína E7 responsável por interagir com Rb na alteração da expressão de HMGB1.

Além das funções celulares descritas, HMGB1 participa de processos tumorais e pode atuar conjuntamente a alterações em Rb, o que explicaria sua relação com a expressão de E7. Diversos estudos indicam um papel de HMGB1 no aumento da expressão e ativação de topoisomerase II alfa em células tumorais deficientes em Rb (ŠTROS et al., 2009), sendo que esse aumento de expressão já foi previamente descrito como mal prognóstico para sobrevida em casos de câncer de mama positivos

para o receptor de estrógeno (RODY et al., 2009). Além disso, através da técnica de *phage display*, Rb foi identificado como possível candidato a interagir com HMGB1 já que possui o motivo peptídico que esse reconhece e apresentou afinidade pela interação com HMGB1 recombinante (DINTILHAC; BERNUES, 2002).

Figura 22: Resumo das funções associadas à localização celular de HMGB1. Adaptado de KANG et al., 2014.

Interessantemente, a interação entre Rb e E7 de HPV16 ocorre através do motivo LXCXE presente em Rb (HELT; GALLOWAY, 2001). Esse é o mesmo motivo descrito para interação entre Rb e HMGB1, e também está presente em HMGB2 e HMGB3 (WANG et al., 2012).

Ainda nas células tumorais estudadas, o silenciamento de HMGB1 leva a diminuição da proliferação e viabilidade, indicando que durante o processo de infecção e tumorigênese a proteína HMGB1 passa a ter um papel importante na manutenção da proliferação celular, função essa que parece não ser essencial nas células normais já que essas não são afetadas pelo silenciamento dessa proteína. O mesmo efeito foi observado em células normais transduzidas com E6E7 ou somente E7 de HPV16, mostrando redução ao serem silenciadas, sendo mais um indicativo da relação entre E7 e HMGB1.

A diminuição da proliferação, viabilidade e redução do número de colônias observadas nas células tumorais silenciadas por HMGB1 podem ocorrer tanto por parada no ciclo celular quanto por entrada em apoptose. No entanto, o silenciamento levou ao aumento de população hipodiplóide e de caspase 3 ativa, ambos indicadores de apoptose, sem alterar as populações nas diferentes fases do ciclo celular.

Esses resultados em conjunto apontam para uma importante contribuição de HMGB1 no crescimento e sobrevivência de células tumorais além de alterações significativas de via de sinalização por TLR que podem contribuir para persistência da infecção por HPV, fator de risco importante para o desenvolvimento de neoplasias. Além disso, revelaram-se inúmeras possibilidades de estudo dos outros fatores diferencialmente expressos aqui identificados.

6 Conclusões

A Figura 23 apresenta um resumo dos resultados mais relevantes de expressão nas linhagens tumorais de proteínas da via de sinalização por TLR estudados nesse estudo. As proteínas confirmadas com expressão aumentada estão representadas em vermelho e as com expressão reduzida em azul.

Figura 23: Representação simplificada da via de sinalização por TLR4 e proteínas identificadas no presente trabalho. Proteínas identificadas com maior expressão nas linhagens derivadas de tumores cervicais HPV positivos estão assinaladas em vermelho e com menor expressão em azul.

Nas linhagens tumorais os níveis de RNAm dos:

- Receptores do tipo Toll foram regulados negativamente com exceção de TLR4.
- Adaptadores: menor expressão de MyD88 (regulador positivo); e maior expressão de SARM1 (regulador negativo)

Já nos queratinócitos transduzidos observamos:

- Em monocamada, 100% dos genes identificados regulados negativamente na presença de E6 e E7 de HPV16 e 55% positivamente com E6 e E7 de HPV11
- Em cultura organotípica, 90% regulados negativamente com E6 e E7 de HPV16 e 100% positivamente com HPV11.

Na análise dos níveis protéicos nas células tumorais e transduzidas com HPV concluímos que:

- Houve aumento de expressão de TLR4 na presença de HPV.
- Os adaptadores MyD88 e SARM1 apresentaram diminuição e aumento, respectivamente, nos níveis de expressão.
- Os ativadores de NF- κ B identificados (TRAF6, Ube2N, RAK4 e TNFR1) apresentaram menores níveis protéicos
- E a proteína efetora pró-inflamatória HMGB1 teve aumento significativo nas linhagens tumorais e transduzidas com HPV.

Considerando-se os dados obtidos para a proteína HMGB1 observamos:

- Altos níveis de expressão nuclear.
- Células transduzidas com mutantes de E7, E7 2pro e E7 D6-10 (incapazes de degradar Rb), não são capazes de induzir aumento de expressão de HMGB1.

- O silenciamento de HMGB1 leva: a redução de proliferação; viabilidade; formação de colônias independente de contato célula a célula; formação de colônias independente de substrato sólido; e ao aumento de população hipodiplóide e de caspase 3 ativa, indícios esses de apoptose.

Portanto podemos inferir que a infecção por HPV interfere em diferentes níveis nas vias de TLR, sendo que a maioria das alterações poderiam inviabilizar a ativação da via funcionando como um potencial escape ao sistema imune inato. Além do que a regulação diferencial entre HPV de alto e baixo risco oncogênico poderia indicar uma possível explicação para suas diferentes correlações com a progressão e desenvolvimento tumoral. E finalizando, a identificação de HMGB1 permitiu comprovar seu papel como fator essencial para sobrevivência das células tumorais HPV positivas tornando-a um excelente alvo para posteriores estudos como alvo terapêutico ou biomarcador tumoral.

Referências

AGGARWAL, B. B. et al. Inflammation and cancer: How hot is the link? **Biochemical Pharmacology**, v. 72, n. 11, p. 1605–1621, 2006.

AGGARWAL, R. et al. Characterization of Toll-like receptor transcriptome in squamous cell carcinoma of cervix: A case-control study. **Gynecologic Oncology**, v. 138, n. 2, p. 358–362, 2015.

BANKS, L. et al. Viruses and the 26S proteasome: hacking into destruction. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 28, n. 8, p. 452–459, ago. 2003.

BAUER, A. K. et al. Toll-like receptor 4 in butylated hydroxytoluene-induced mouse pulmonary inflammation and tumorigenesis. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 97, n. 23, p. 1778–81, 7 dez. 2005.

BELINDA, L. W. et al. SARM: a novel Toll-like receptor adaptor, is functionally conserved from arthropod to human. **Mol Immunol**, v. 45, n. 6, p. 1732–1742, 2008.

BHATELIA, K.; SINGH, K.; SINGH, R. TLRs: Linking inflammation and breast cancer. **Cell Signal**, v. 26, n. 11, p. 2350–2357, 2014.

BIANCHI, M. E.; AGRETI, A. HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation. **Current opinion in genetics & development**, v. 15, n. 5, p. 496–506, out. 2005.

BOCCARDO, E.; LEPIQUE, A. P.; VILLA, L. L. The role of inflammation in HPV carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 11, p. 1905–1912, 2010.

BOSCH, F. X.; DE SANJOSÉ, S. Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer—burden and assessment of causality. **Journal of the National Cancer Institute. Monographs**, n. 31, p. 3–13, 2003.

CARPENTER, S.; O'NEILL, L. A. J. How important are Toll-like receptors for antimicrobial responses? **Cellular Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 1891–1901, 2007.

CHATURVEDI, A. K. et al. Human papillomavirus infection with multiple types: pattern of coinfection and risk of cervical disease. **The Journal of infectious diseases**, v. 203, n. 7, p. 910–20, 1 abr. 2011.

CHEN, N.-J. et al. Beyond tumor necrosis factor receptor: TRADD signaling in toll-like receptors.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 105, n. 34, p. 12429–12434, 2008.

CHEN, W. N. et al. Hepatitis B virus X protein increases the IL-1 β -induced NF- κ B activation via interaction with evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathways (ECSIT). **Virus Research**, v. 195, p. 236–245, 2015.

CHEN, Y. et al. Mitochondrial Redox Signaling and Tumor Progression. **Cancers**, v. 8, n. 4, p. 40, 25 mar. 2016.

CRUSIUS, K.; RODRIGUEZ, I.; ALONSO, A. The human papillomavirus type 16 E5 protein modulates ERK1/2 and p38 MAP kinase activation by an EGFR-independent process in stressed human keratinocytes. **Virus genes**, v. 20, n. 1, p. 65–9, 2000.

DAUD, I. I. et al. Association between toll-like receptor expression and human papillomavirus type 16 persistence. **Int J Cancer**, v. 128, n. 4, p. 879–886, 2011.

DE VILLIERS, E. M. et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17–27, 2004.

DECARLO, C. A. et al. Toll-like receptor transcriptome in the HPV-positive cervical cancer microenvironment. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, p. 1–9, 2012.

DEMERS, G. W. et al. Abrogation of growth arrest signals by human papillomavirus type 16 E7 is mediated by sequences required for transformation. **Journal of virology**, v. 70, n. 10, p. 6862–9, 1996.

DINTILHAC, A.; BERNUES, J. HMGB1 Interacts with Many Apparently Unrelated Proteins by Recognizing Short Amino Acid Sequences. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 9, p. 7021–7028, 1 mar. 2002.

DOORBAR, J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 110, n. 5, p. 525–41, 2006.

DYSON, N. et al. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. **Science**, v. 243, n. 4893, p. 934–937, 17 fev. 1989.

ERMOLAEVA, M. A et al. Function of TRADD in tumor necrosis factor receptor 1 signaling and in TRIF-dependent inflammatory responses. **Nature immunology**, v. 9, n. 9, p. 1037–1046, 2008.

FERLAY, J. et al. **GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase. No. 11 [Internet].**

FRAZER, I. H. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. **Nature reviews. Immunology**, v. 4, n. 1, p. 46–54, 2004.

GARCIA-CHACON, R. et al. Immunobiology of HPV Infection. **Archives of Medical Research**, v. 40, n. 6, p. 443–448, 2009.

GHOSH, S.; DASS, J. F. P. Study of pathway cross-talk interactions with NF- κ B leading to its activation via ubiquitination or phosphorylation: A brief review. **Gene**, v. 584, n. 1, p. 97–109, jun. 2016.

GROTE, K.; SCHÜTT, H.; SCHIEFFER, B. Toll-like receptors in angiogenesis. **TheScientificWorldJournal**, v. 11, p. 981–991, 2011.

GUESS, J. C.; MCCANCE, D. J. Decreased Migration of Langerhans Precursor-Like Cells in Response to Human Keratinocytes Expressing Human Papillomavirus Type 16 E6/E7 Is Related to Reduced Macrophage Inflammatory Protein-3 Production. **Journal of Virology**, v. 79, n. 23, p. 14852–14862, 1 dez. 2005.

HALBERT, C. L.; DEMERS, G. W.; GALLOWAY, D. A. The E6 and E7 genes of human papillomavirus type 6 have weak immortalizing activity in human epithelial cells. **Journal of virology**, v. 66, n. 4, p. 2125–34, 1992.

HASAN, U. A. et al. The human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein induces a transcriptional repressor complex on the Toll-like receptor 9 promoter. **The Journal of experimental medicine**, v. 210, n. 7, p. 1369–87, 2013.

HASIMU, A. et al. 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**, v. 30, n. 5, p. 344–350, 5 maio 2011.

HAVARD, L. et al. Differential production of cytokines and activation of NF- κ B in HPV-transformed keratinocytes. **Virology**, v. 298, n. 2, p. 271–285, 2002.

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

HIRSCH, I. et al. Impaired Toll-like receptor 7 and 9 signaling: From chronic viral infections to cancer. **Trends in Immunology**, v. 31, n. 10, p. 391–397, 2010.

HO, G. Y. F. et al. Persistent Genital Human Papillomavirus Infection as a Risk Factor for Persistent

Cervical Dysplasia. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 87, n. 18, p. 1365–1371, 20 set. 1995.

HOWIE, H. L.; KATZENELLENBOGEN, R. A.; GALLOWAY, D. A. Papillomavirus E6 proteins. **Virology**, v. 384, n. 2, p. 324–334, 2009.

HUANG, B. et al. Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance. **Cancer Research**, v. 65, n. 12, p. 5009–5014, 2005.

HUANG, B. et al. *Listeria monocytogenes* promotes tumor growth via tumor cell toll-like receptor 2 signaling. **Cancer Research**, v. 67, n. 9, p. 4346–4352, 2007.

JEMAL, A. et al. Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin**, v. 61, n. 2, p. 69–90, 2011.

JOUHI, L. et al. The expression of toll-like receptors 2, 4, 5, 7 and 9 in merkel cell carcinoma. **Anticancer Research**, v. 35, n. 4, p. 1843–1850, 2015a.

JOUHI, L. et al. Expression of toll-like receptors in HPV-positive and HPV-negative oropharyngeal squamous cell carcinoma-an in vivo and in vitro study. **Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, 2015b.

KANG, R. et al. HMGB1 in health and disease. **Mol Aspects Med**, 2014.

KARIN, M. et al. NF- κ B IN CANCER: FROM INNOCENT BYSTANDER TO MAJOR CULPRIT. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 4, p. 301–310, 1 abr. 2002.

KELLY, M. G. et al. TLR-4 signaling promotes tumor growth and paclitaxel chemoresistance in ovarian cancer. **Cancer research**, v. 66, n. 7, p. 3859–68, 2006.

KUNDU, S. D. et al. The toll-like receptor pathway: a novel mechanism of infection-induced carcinogenesis of prostate epithelial cells. **Prostate**, v. 68, n. 2, p. 223–229, 2008.

LAI, Z. Z.-Z. et al. Toll-like receptor 9 (TLR9) gene polymorphisms associated with increased susceptibility of human papillomavirus-16 infection in patients with cervical cancer. **Journal of International Medical ...**, v. 41, n. 4, p. 1027–36, 2013.

LAMOTHE, B. et al. Site-specific Lys-63-linked tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 auto-ubiquitination is a critical determinant of I kappa B kinase activation. **J Biol Chem**, v. 282, n. 6, p. 4102–4112, 2007.

LI, S. et al. IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 8, p. 5567–5572, 2002.

LIESENFELD, M. et al. SORBS2 and TLR3 induce premature senescence in primary human fibroblasts and keratinocytes. **BMC cancer**, v. 13, p. 507, 2013.

MARKOWITZ, D.; GOFF, S.; BANK, A. Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line. **Virology**, v. 167, n. 2, p. 400–6, dez. 1988.

MCLAUGHLIN-DRUBIN, M. E.; MÜNGER, K. **Oncogenic activities of human papillomaviruses** **Virus Research**, 2009a.

MCLAUGHLIN-DRUBIN, M. E.; MÜNGER, K. The human papillomavirus E7 oncoprotein. **Virology**, v. 384, n. 2, p. 335–344, 2009b.

MITTAL, D. et al. TLR4-mediated skin carcinogenesis is dependent on immune and radioresistant cells. **The EMBO Journal**, v. 29, n. 13, p. 2242–2252, 7 jul. 2010.

MONTERO VEGA, M. T.; DE ANDRÉS MARTÍN, A. The significance of toll-like receptors in human diseases. **Allergologia et Immunopathologia**, v. 37, n. 5, p. 252–263, 2009.

MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 8, p. 550–560, 1 ago. 2010.

MUCCIOLI, M.; BENENCIA, F. Toll-like Receptors in Ovarian Cancer as Targets for Immunotherapies. **Front Immunol**, v. 5, p. 341, 2014.

MUÑOZ, N. et al. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 6, p. 518–527, 6 fev. 2003.

MURATA, H. et al. SARM1 and TRAF6 bind to and stabilize PINK1 on depolarized mitochondria. **Mol Biol Cell**, v. 24, n. 18, p. 2772–2784, 2013.

O'NEILL, L. A. J.; GOLENBOCK, D.; BOWIE, A. G. The history of Toll-like receptors — redefining innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 6, p. 453–460, 17 maio 2013.

OLIVEIRA, L. B. et al. 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. 1858–1864, 2013.

PACINI, L. et al. Downregulation of Toll-Like Receptor 9 Expression by Beta Human Papillomavirus 38 and Implications for Cell Cycle Control. **Journal of Virology**, v. 89, n. 22, p. 11396–11405, 15 nov. 2015.

PEAR, W. S. et al. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection (retroviral packaging cells/gene therapy). **Cell Biology**, v. 90, p. 8392–8396, 1993.

PIRAS, V.; SELVARAJOO, K. Beyond MyD88 and TRIF Pathways in Toll-Like Receptor Signaling. **Front Immunol**, v. 5, p. 70, 2014.

RODY, A. et al. Gene expression of topoisomerase II alpha (TOP2A) by microarray analysis is highly prognostic in estrogen receptor (ER) positive breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 113, n. 3, p. 457–466, 14 fev. 2009.

ROUSSEAU, M. et al. Cervical Coinfection with Human Papillomavirus (HPV) Types as a Predictor of Acquisition and Persistence of HPV Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 184, n. 12, p. 1508–1517, 15 dez. 2001.

SANTAOLALLA, R. et al. TLR4 Activates the β -catenin Pathway to Cause Intestinal Neoplasia. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. e63298, 14 maio 2013.

SCHEFFNER, M. et al. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. **Cell**, v. 63, n. 6, p. 1129–36, 21 dez. 1990.

SCOTT, M. E. et al. Expression of nucleic acid-sensing Toll-like receptors predicts HPV16 clearance associated with an E6-directed cell-mediated response. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 10, p. 2402–2408, 2015.

SEITZ, C. S. et al. Alterations in NF-kappaB function in transgenic epithelial tissue demonstrate a growth inhibitory role for NF-kappaB. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 5, p. 2307–12, 3 mar. 1998.

SETHMAN, C. R.; HAWIGER, J. The innate immunity adaptor SARM translocates to the nucleus to stabilize lamins and prevent DNA fragmentation in response to pro-apoptotic signaling. **PLoS one**, v. 8, n. 7, p. e70994, 2013.

ŠTROS, M. et al. HMGB1 and HMGB2 proteins up-regulate cellular expression of human topoisomerase II α . **Nucleic Acids Research**, 2009.

SUMMERS, D. W.; DIANTONIO, A.; MILBRANDT, J. Mitochondrial dysfunction induces sarm1-

dependent cell death in sensory neurons. **J Neurosci**, v. 34, n. 28, p. 9338–9350, 2014.

SUN, A. et al. From G0 to S phase: A view of the roles played by the retinoblastoma (Rb) family members in the Rb-E2F pathway. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 102, n. 6, p. 1400–1404, 15 dez. 2007.

VAN HOGELINDEN, M. et al. Squamous cell carcinomas and increased apoptosis in skin with inhibited Rel/nuclear factor-kappaB signaling. **Cancer research**, v. 59, n. 14, p. 3299–303, 15 jul. 1999.

VANDERMARK, E. R. et al. Human papillomavirus type 16 E6 and E 7 proteins alter NF-kB in cultured cervical epithelial cells and inhibition of NF-kB promotes cell growth and immortalization. **Virology**, v. 425, n. 1, p. 53–60, 30 mar. 2012.

VON KNEBEL DOEBERITZ, M. **New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections** **European Journal of Cancer**, 2002.

VOULGARELIS, M.; IOANNOU, S. **Toll-like receptors, tissue injury, and tumorigenesis** **Mediators of Inflammation**, 2010.

WANG, L.-L. et al. High-Mobility Group Boxes Mediate Cell Proliferation and Radiosensitivity via Retinoblastoma-Interaction-Dependent and -Independent Mechanisms. **Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals**, v. 27, n. 5, p. 329–335, jun. 2012.

WANG, Y. et al. Expression and functional analysis of Toll-like receptor 4 in human cervical carcinoma. **The Journal of membrane biology**, v. 247, n. 7, p. 591–9, 2014.

WANG, Z. et al. Toll-like receptor 4 activity protects against hepatocellular tumorigenesis and progression by regulating expression of DNA repair protein Ku70 in mice. **Hepatology**, v. 57, n. 5, p. 1869–1881, maio 2013.

WRIGHT, T. C. et al. Chapter 30: HPV vaccines and screening in the prevention of cervical cancer; conclusions from a 2006 workshop of international experts. **Vaccine**, v. 24, p. S251–S261, 2006.

YANG, R. et al. B Lymphocyte Activation by Human Papillomavirus-Like Particles Directly Induces Ig Class Switch Recombination via TLR4-MyD88. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 12, p. 7912–7919, 2005.

YU, S.-L. et al. Antagonist-mediated down-regulation of Toll-like receptors increases the prevalence of human papillomavirus infection in systemic lupus erythematosus. **Arthritis research & therapy**, v. 14,

n. 2, p. R80, 2012.

ZHANG, Y. et al. The expression of toll-like receptor 8 and its relationship with VEGF and Bcl-2 in cervical cancer. **International Journal of Medical Sciences**, v. 11, n. 6, p. 608–613, 2014.

ZHAO, S. et al. Toll-like receptors and prostate cancer. **Front Immunol**, v. 5, p. 352, 2014.

ZUR HAUSEN, H. Viruses in human cancers. **Science**, v. 254, n. 5035, p. 1167–1173, 1991.

Lista de Anexos

Anexo I Resultados da expressão de genes da via de TLR nas linhagens derivadas de câncer cervical quando comparadas a células normais.	98
Anexo II: Resultados da expressão de genes da via de TLR nas linhagens derivadas de câncer cervical HPV positivas quando comparadas a células HPV negativas. ...	100
Anexo III: Súmula Curricular.....	102
Anexo IV: Manuscrito em Elaboração	105

Anexo I Resultados da expressão de genes da via de TLR nas linhagens derivadas de câncer cervical quando comparadas a células normais.

	C33A		HeLa		SiHa	
	Fold Change	p Valor	Fold Change	p Valor	Fold Change	p Valor
BTK	0,50	0,27	0,37	0,31	0,51	0,27
CASP8	0,01	0,00	0,53	0,00	0,77	0,28
CCL2	0,12	0,09	16,37	0,00	0,25	0,13
CD14	0,39	0,22	1,20	0,78	167,65	0,05
CD180	1,27	0,15	6,41	0,05	0,77	0,40
CD80	1,30	0,86	0,19	0,23	0,37	0,26
CD86	0,03	0,24	0,00	0,24	0,00	0,24
CHUK	1,70	0,04	0,60	0,36	0,78	0,48
CLEC4E	2,71	0,05	0,17	0,08	0,32	0,12
CSF2	0,07	0,15	0,04	0,14	0,06	0,15
CSF3	0,00	0,24	0,00	0,24	0,00	0,25
CXCL10	0,02	0,27	0,00	0,27	0,03	0,27
ECSIT	1,46	0,66	1,51	0,58	1,57	0,54
EIF2AK2	1,03	0,91	0,13	0,03	0,52	0,16
ELK1	1,14	0,89	2,92	0,12	6,68	0,05
FADD	0,43	0,33	3,12	0,25	3,40	0,18
FOS	0,08	0,21	0,02	0,19	0,26	0,26
HMGB1	5,51	0,00	0,30	0,04	0,90	0,55
HRAS	0,60	0,41	1,00	0,61	2,02	0,74
HSPA1A	1,44	0,40	6,13	0,08	13,05	0,07
HSPD1	2,84	0,00	2,97	0,04	1,75	0,01
IFNA1	0,12	0,02	0,41	0,06	0,10	0,02
IFNB1	1,02	0,78	0,09	0,10	0,47	0,23
IFNG	1,31	0,86	0,13	0,24	0,15	0,23
IKBKB	1,43	0,04	0,38	0,01	0,57	0,12
IL10	1,11	0,91	0,21	0,17	0,46	0,25
IL12A	3,73	0,00	0,19	0,00	0,38	0,00
IL1A	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
IL1B	0,00	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01
IL2	1,99	0,06	0,24	0,10	0,29	0,06
IL6	0,04	0,09	2,83	0,05	20,55	0,12
IL8	0,03	0,04	0,11	0,06	0,38	0,20
IRAK1	0,83	0,52	1,92	0,41	0,78	0,77
IRAK2	0,06	0,21	0,21	0,25	0,40	0,32
IRAK4	4,04	0,00	0,17	0,01	0,33	0,05
IRF1	0,55	0,31	0,42	0,25	1,80	0,43
IRF3	2,80	0,00	0,23	0,00	1,04	0,88
JUN	0,09	0,32	1,40	0,60	1,17	0,55

LTA	0,80	0,27	1,12	0,68	1,67	0,72
LY86	0,85	0,53	0,22	0,24	0,53	0,31
LY96	0,05	0,04	0,00	0,03	0,01	0,03
MAP2K3	2,32	0,12	0,23	0,11	0,44	0,18
MAP2K4	2,18	0,00	0,29	0,01	0,75	0,32
MAP3K1	0,72	0,01	0,35	0,00	0,91	0,62
MAP3K7	1,82	0,00	0,31	0,00	0,46	0,01
MAP4K4	0,57	0,03	0,20	0,01	0,37	0,01
MAPK8	3,19	0,00	0,24	0,00	0,68	0,12
MAPK8IP3	0,84	0,61	0,98	0,67	2,82	0,25
MYD88	0,04	0,04	0,14	0,05	0,30	0,08
NFKB1	0,63	0,39	0,41	0,25	1,49	0,74
NFKB2	0,87	0,57	0,32	0,13	1,17	0,95
NFKBIA	0,23	0,05	0,26	0,06	1,71	0,19
NFKBIL1	0,88	0,26	314,45	0,37	11,37	0,38
NFRKB	2,84	0,00	0,47	0,01	1,06	0,74
NR2C2	1,12	0,59	0,83	0,24	0,89	0,68
PELI1	0,34	0,01	0,09	0,00	0,16	0,01
PPARA	0,81	0,43	0,48	0,11	0,84	0,56
PRKRA	1,85	0,00	0,42	0,02	0,70	0,05
PTGS2	0,00	0,00	0,01	0,00	0,05	0,00
REL	1,06	0,69	0,23	0,00	0,33	0,00
RELA	1,33	0,19	0,68	0,14	0,99	0,99
RIPK2	2,44	0,00	0,18	0,00	0,39	0,00
SARM1	18,26	0,00	6,95	0,00	116,06	0,02
SIGIRR	0,22	0,12	0,21	0,15	0,34	0,16
TAB1	1,38	0,74	1,10	0,91	1,74	0,42
TBK1	5,18	0,01	0,45	0,10	1,14	0,78
TICAM1	0,57	0,03	0,20	0,00	0,18	0,00
TICAM2	0,52	0,08	0,29	0,03	0,49	0,07
TIRAP	1,36	0,99	0,83	0,52	2,42	0,34
TLR1	0,50	0,16	0,88	0,65	0,06	0,04
TLR10	2,41	0,07	0,12	0,00	0,21	0,00
TLR2	0,01	0,01	0,00	0,01	0,02	0,01
TLR3	0,47	0,03	0,08	0,00	0,23	0,01
TLR4	0,67	0,27	38,50	0,00	8,86	0,04
TLR5	0,32	0,05	0,04	0,01	0,08	0,01
TLR6	0,13	0,05	1,86	0,18	0,16	0,06
TLR7	1,61	0,77	0,18	0,24	0,47	0,32
TLR8	2,71	0,05	0,17	0,08	0,59	0,28
TLR9	0,95	0,66	0,19	0,05	0,34	0,09
TNF	0,03	0,11	0,01	0,11	0,00	0,11
TNFR1	0,01	0,25	2,48	0,64	4,24	0,18
TOLLIP	0,45	0,34	0,24	0,26	1,39	0,99
TRAF6	1,18	0,72	0,17	0,03	0,33	0,05
UBE2N	2,90	0,00	0,31	0,02	0,54	0,06

Anexo II: Resultados da expressão de genes da via de TLR nas linhagens derivadas de câncer cervical HPV positivas quando comparadas a células HPV negativas.

	Hela		Siha	
	Fold Change	p Valor	Fold Change	p Valor
BTK	0,75	0,83	1,02	0,98
CASP8	44,30	0,00	64,38	0,01
CCL2	133,05	0,00	2,02	0,26
CD14	3,08	0,02	431,08	0,05
CD180	5,05	0,05	0,61	0,10
CD80	0,15	0,09	0,29	0,10
CD86	0,06	0,00	0,12	0,00
CHUK	0,35	0,02	0,46	0,01
CLEC4E	0,06	0,00	0,12	0,00
CSF2	0,47	0,17	0,80	0,04
CSF3	0,14	0,00	2,38	0,29
CXCL10	0,14	0,01	1,52	0,02
ECSIT	1,04	0,76	1,08	0,50
EIF2AK2	0,12	0,00	0,50	0,02
ELK1	2,57	0,02	5,87	0,04
FADD	7,24	0,01	7,87	0,01
FOS	0,29	0,01	3,24	0,02
HMGB1	0,06	0,00	0,16	0,00
HRAS	1,67	0,05	3,39	0,00
HSPA1A	4,26	0,09	9,07	0,07
HSPD1	1,05	0,74	0,62	0,01
IFNA1	3,40	0,02	0,84	0,30
IFNB1	0,09	0,00	0,47	0,01
IFNG	0,10	0,00	0,12	0,00
IKBKB	0,26	0,00	0,40	0,01
IL10	0,19	0,01	0,41	0,02
IL12A	0,05	0,00	0,10	0,00
IL1A	3,32	0,02	5,70	0,00
IL1B	1,07	0,87	13,79	0,00
IL2	0,12	0,00	0,14	0,00
IL6	65,01	0,00	472,26	0,11
IL8	3,70	0,14	13,44	0,13
IRAK1	2,32	0,11	0,94	0,75
IRAK2	3,36	0,01	6,44	0,02
IRAK4	0,04	0,00	0,08	0,00
IRF1	0,77	0,07	3,29	0,03
IRF3	0,08	0,00	0,37	0,00
JUN	14,92	0,00	12,40	0,01
LTA	1,40	0,45	2,08	0,10

LY86	0,27	0,11	0,63	0,07
LY96	0,03	0,05	0,19	0,08
MAP2K3	0,10	0,00	0,19	0,00
MAP2K4	0,13	0,00	0,35	0,00
MAP3K1	0,50	0,00	1,27	0,21
MAP3K7	0,17	0,00	0,25	0,00
MAP4K4	0,36	0,00	0,64	0,00
MAPK8	0,08	0,00	0,21	0,00
MAPK8IP3	1,17	0,75	3,37	0,15
MYD88	3,96	0,02	8,63	0,00
NFKB1	0,64	0,02	2,35	0,01
NFKB2	0,36	0,01	1,35	0,13
NFKBIA	1,12	0,45	7,34	0,00
NFKBIL1	357,67	0,37	12,93	0,37
NFRKB	0,16	0,00	0,37	0,00
NR2C2	0,74	0,18	0,80	0,43
PELI1	0,27	0,01	0,49	0,02
PPARA	0,59	0,04	1,03	0,80
PRKRA	0,23	0,00	0,38	0,00
PTGS2	7,79	0,02	71,04	0,07
REL	0,22	0,01	0,31	0,01
RELA	0,51	0,00	0,74	0,23
RIPK2	0,08	0,00	0,16	0,00
SARM1	0,38	0,00	6,35	0,03
SIGIRR	0,95	0,74	1,52	0,30
TAB1	0,80	0,22	1,27	0,42
TBK1	0,09	0,01	0,22	0,01
TICAM1	0,35	0,01	0,31	0,01
TICAM2	0,56	0,03	0,93	0,64
TIRAP	0,61	0,00	1,78	0,27
TLR1	1,76	0,15	0,12	0,00
TLR10	0,05	0,02	0,09	0,02
TLR2	0,14	0,00	1,39	0,25
TLR3	0,17	0,01	0,48	0,06
TLR4	57,25	0,00	13,18	0,01
TLR5	0,11	0,03	0,26	0,04
TLR6	14,61	0,00	1,30	0,29
TLR7	0,11	0,01	0,29	0,01
TLR8	0,06	0,00	0,22	0,00
TLR9	0,20	0,00	0,35	0,02
TNF	0,29	0,00	0,12	0,00
TNFR1	195,25	0,00	333,89	0,01
TOLLIP	0,55	0,00	3,13	0,09
TRAF6	0,14	0,00	0,28	0,00
UBE2N	0,11	0,00	0,19	0,00

Anexo III: SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Mirian Gallote Morale

Local e data de nascimento: São Paulo, 20 de maio de 1984

EDUCAÇÃO

Colégio São José, São Paulo. 2002

Ensino Fundamental e Médio

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Graduação: Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas, 2007.

Iniciação Científica: Clonagem de epítomos do HIV1 e do HRSV em vetores de expressão eucariótico e bacteriano, para imunização de camundongos.

Orientador: Armando Morais Ventura

Bolsista PIBIC, CNPq

Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Mestrado em Ciências Biológicas (Bioquímica), 2010

Desenvolvimento de vacina terapêutica contra HPV16

Orientador: Paulo Lee Ho.

Bolsista FAPESP

Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Doutorado em Ciências Biológicas (Bioquímica), em curso.

Efeito da infecção por HPV nas vias de sinalização por Toll Like Receptors

Orientadora: Luisa Lina Villa

Co-Orientador: Enrique Mario Boccardo Pierulivo

Bolsista FAPESP

PUBLICAÇÕES

Artigos Completos

TAMURA, R. E.; PACCEZ, J. D.; DUNCAN, K. C.; MORALE, M. G.; SIMABUCO, F. M.; DILLON, S.; CORREA, R. G.; GU, X.; LIBERMANN, T. A.; ZERBINI, L. F. GADD45 α and γ interaction with CDK11p58 regulates SPDEF protein stability and SPDEF-mediated effects on cancer cell migration. *OncoTarget*, v. 7, p. 5, 2016.

BUGNON VALDANO, M.; STEENBERGEN, R.; MARZIALI, F.; DE SOUZA LINO, V.; MORALE, M. G.; CAVATORTA, A. L.; GARDIOL, D.; BOCCARDO, E. Disc Large 1 expression is altered by Human Papillomavirus E6/E7 proteins in organotypic cultures of human keratinocytes.. Journal of General Virology (Print), v. 97, p. 453-462, 2015.

DE OLIVEIRA, L. M. F.*; MORALE, M. G.*; CHAVES, A. A. M.; CAVALHER, A. M.; LOPES, A. S.; DINIZ, M. DE O.; SCHANOSKI, A. S.; DE MELO, R. L.; FERREIRA, L. C. DE S.; DE OLIVEIRA, M. L. S.; DEMASI, M.; HO, P. L. Design, Immune Responses and Anti-Tumor Potential of an HPV16 E6E7 Multi-Epitope Vaccine. Plos One, v. 10, p. e0138686, 2015.

* Contributed equally to this work.

Resumos em Congressos

MORALE M. G.; ABJAUDE W. S.; TOMAZELLA, T.; NUNES R. A. L.; LEPIQUE A. P.; TERMINE L.; VILLA L. L.; BOCCARDO E. Expression of HPV oncoproteins induce major changes in Toll like Receptors signaling pathways. DNA Tumour Virus Meeting. Expression of HPV oncoproteins induce major changes in Toll Like Receptors signaling pathways. 2015.

MORALE M. G.; OLIVEIRA L. B.; TOMAZELLA, T.; VILLA L. L.; BOCCARDO E. Study of E6 and E7 proteins from HPV and its effects on Toll like receptors signaling pathways. 29th International Papillomavirus Conference. Study of E6 and E7 proteins from HPV and its effects on Toll like receptors signaling pathways. 2014.

MORALE M. G.; TOMAZELLA, T.; VILLA L. L.; BOCCARDO E. Effect of HPV on Toll like receptors signaling pathways. Third International Conference on Polyamides: Biochemical, Physiological and Clinical Perspectives. Effect of HPV on Toll like receptors signaling pathways. 2014.

MORALE, M. G.; BOCCARDO E.; VILLA L. L. Estudo dos efeitos de E6 e E7 de HPV nas vias de sinalização iniciadas por toll like receptors (TLR). 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia. 2013.

MORALE, M. G.; CHAVES, A. A. M.; HO, P. L. Development of a Chimeric Protein from HPV16. In: XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2009, Águas de Lindóia. Anais da XXXVIII Annual Meeting of SBBq, 2009.

MORALE, M. G.; CHAVES, A. A. M.; HO, P. L. Desenvolvimento de vacina terapêutica contra HPV16. In: X Reunião Científica Anual do Instituto Butantan, 2008, São Paulo. Memórias do Instituto Butantan, 2008. v. 65.

MORALE, M. G.; ARCIERI, L. E. F. ; TAMURA, R. E. ; HO, P. L. ; VENTURA, A. M. . Clonagem de epítomos do HIV1 e do HRSV em vetores de expressão eucariótico e bacteriano, para imunização de camundongos.. In: 14º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, 2006, Ribeirão Preto. Anais do 14º SIICUSP, 2006.

MORALE, M. G.; ARCIERI, L. E. F. ; TAMURA, R. E. ; HO, P. L. ; VENTURA, A. M. . Clonagem de epítomos do HIV1 e do HRSV em vetores de expressão eucariótico e bacteriano, para

imunização de camundongos.. In: 13º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, 2005, Ribeirão Preto. Anais do 13º SIICUSP, 2005.

ORGANIZAÇÃO DE EVENTOS

SILVA, D. F. E. ; MORALE, M. G. ; FLORA, A. B. ; CAVALHO, C. F. ; FONTES, L. C. ; SILVA, M. P. ; OLIVEIRA, R. C. ; HERBSTER, S. ; PIMENTEL, V. F. ; ABJAUDE, W. S. ; TABORDA, C. P. . I Curso de Inverno em Microbiologia e Biologia Molecular Aplicada. 2014.

Anexo IV: Manuscrito em Elaboração

Effects of HPV infection on TLR signaling pathway

Mirian Galliotte Morale¹, Walason da Silva Abjaude², Tatiane Karen Cabeça Tomazella², Rafaella Almeida Lima Nunes⁴, Ana Paula Lepique³, Lara Termini⁴, Luisa Lina Villa⁴, Enrique Boccardo²

¹ Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

² Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

³ Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

⁴ Centre of Translational Oncology, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), São Paulo, Brazil; Department of Radiology and Oncology, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Abstract

It has been previously shown that both E6 and E7 of HPV are involved in innate immune system dysregulation, causing alterations on Toll-like receptors (TLR) expression. However, many of the mechanisms leading to HPV infection clearance or persistence are still unknown and matter of active investigation, and TLR might have an important role on these processes. We analyzed in cervical cancer cell lines genes from TLR pathway; several were differentially expressed between tumor cells lines and normal keratinocytes, including TLR adaptors molecules and genes associated with MAP kinase pathway, NFkappaB activation and antiviral immune response. About 90% of these genes were down regulated. Among them HMGB1 which expression contributes to tumor cell viability and proliferation. Altogether, our data indicate the presence of important alterations in TLR signaling pathway in cells expressing HPV oncogenes.

Introduction

Papillomavirus (PV) infect the epithelia from skin and mucosa and are associated with the development of lesions that can range from benign warts to invasive carcinoma.[1]

Persistent human papillomavirus (HPV) infection is a key event in cervical carcinogenesis, one of the major causes of death by cancer in women worldwide. Although high-risk HPV infection is the cause of cervical cancer, both local and systemic immune response against this virus is not well understood [2]

Furthermore, the fact that most infected women effectively eliminate the virus and only a minority is at risk of developing cancer, underscores the existence of complex mechanisms in this female population allowing the progression of HPV infection. Regardless of local or systemic, innate or adaptive immune responses induced in women with chronic infection are inefficient to eliminate the virus, resulting in persistent viral infection [2]. However, many of the mechanisms leading to HPV infection clearance or persistence are still unknown and matter of active investigation.

E6 and E7 oncoproteins are responsible for alterations in several signaling pathways of the host cell, including those involved in preventing cell differentiation and apoptosis and stimulating cell proliferation [3]. These proteins are known to be constitutively expressed in cervical tumors and required for its transformed estate maintenance [4].

The innate immune system is the first line of defense against pathogens and TLR are a family of membrane receptors that actively participate in this process, responsible for recognizing many pathogens including bacteria, fungi and viruses [5].

TLRs are responsible for recognizing molecular patterns present in pathogens, such as LPS, dsRNA and danger signals. Its activation leads to a signaling cascade, starting

with adaptors molecules and ending with transcription factors activation/translocation and cytokines production.

Considering TLR pathway function, it would be advantageous for a virus to manipulate the response of this pathway so it can persist in cells without being detected by the immune system or to modulate this response to create a better environment for infection persistence.

Both E6 and E7 are also involved in innate immune system dysregulation, causing alterations on Toll-like receptors (TLR) expression, an important step in cancer progression [6]. Besides, these proteins interfere with several cellular antiviral mechanisms, and their continue expression promotes persistence and progression of lesions and play a role in invasion and metastasis [7].

Different studies have shown that HPV16 clearance in naturally infected individuals was associated with increased expression of TLR2, TLR3, TLR7, TLR8 and TLR9 [8]. Conversely, correlation was also observed between the expression of TLR4, TLR7 and TLR9 and development and progression of CIN (cervical intraepithelial neoplasia) and cervical carcinoma in presence of HPV16 [9].

The participation of the Toll like Receptors (TLR) pathways, in cervical cancer has not been studied in depth. The aim of our study was to analyze the effects of HPV infection in TLR signaling pathways, focusing on the role of HPV high and low risk E6 and E7 proteins.

We analyzed in cervical cancer cell lines genes from TLR pathway. Several genes were differentially expressed between tumor cells lines and normal keratinocytes, including TLR adaptors molecules and genes associated with MAP kinase pathway, NFkappaB activation and antiviral immune response. About 90% of these genes were

down regulated. Among them HMGB1 which expression contributes to tumor cell viability and proliferation. Altogether, our data indicate the presence of important alterations in TLR signaling pathway in cells expressing HPV genes.

Materials and Methods

Cell culture and Retroviral Vectors

Cultures of primary human keratinocytes (NHEK Clonetics™ KGM-Gold™ Neonatal Normal Human Epidermal Keratinocytes) were performed in KSFM medium (Thermo Fisher, Massachusetts, EUA) supplemented with recombinant epidermal growth factor (5ng / ml) and bovine pituitary extract (50 mg / ml) at 37 ° C and 5% CO₂. C33A (ATCC® HTB-31™), HeLa (CCL-2 ATCC®™) and SiHa (ATCC® HTB-35™) tumor cell lines were cultured in MEM culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum (M10 medium). Cultures were performed in monolayer and transduced with retroviral vectors encoding the E6 and E7 proteins of HPV. Recombinant pLXSN retroviruses vectors containing HPV-16 E6/E7 were kindly provided by Dr. Denise Galloway (Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA) and are described elsewhere [10].

RNA Purification and PCR Array

For each sample, total RNA was extracted using RNeasy Mini Kit columns (Qiagen), according to manufacturer's directions. For measuring mRNA levels, RNA Toll-Like Receptor Signaling Pathway PCR Array (Qiagen) was used following manufacture's protocol. Analysis was performed using RT² Profiler PCR Array Data Analysis online software provided by Quiagen with samples in independent triplicates.

Protein extraction and Immunoblotting

The extraction of proteins from cell culture monolayer is accomplished by cell lysis in lysis buffer supplemented with protease inhibitors and subsequent separation of the soluble protein fraction of cell debris by centrifugation. The protein concentration is determined by Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Immunoblotting was performed as described elsewhere (Boccardo et al., 2004). Abcam primary antibodies used include anti-HMGB1 antibody [EPR3507] (ab79823), anti-Ube2N / Ubc13 antibody [EPR5162] (ab109286), anti-MyD88 antibody (ab2064), anti-TRAF6 antibody [EP591Y] (ab33915), anti-TLR4 antibody [76B357.1] (ab22048) and anti-SARM antibody (ab115561).

Immunofluorescence procedure

Monolayer cultures were performed in Nunc™ Lab-Tek™ Chamber Slide and after formalin fixation were probed during a night with anti-HMGB1 antibody (Abcam ab79823). The chambers were then washed with phosphate-buffered saline and reprobed with fluorescent anti-mouse immunoglobulin G (IgG) conjugated with alexa 546 (1:1000, Molecular Probes, Carlsbad, CA). A nuclear counterstain (DAPI; 1:1000 in PBS) was used. The images were captured with an Olympix DP70 digital camera attached to an Olympus Provis IX70 microscope.

Results

To determine the overall effect of HPV infection on TLR pathway we analyzed the mRNA expression levels of 84 genes involved in TLR signaling by qPCR in cervical cancer derived cell lines C33A (HPV negative), HeLa (HPV18) and SiHa (HPV16) using normal keratinocytes (NHEK) as the reference group. We observed that 12 of 84 genes were differentially expressed in all three tumor cell lines while 15 were altered

in one or both HPV positive cell lines. Of these 27 genes, 23 were down-regulated and 4 up-regulated in SiHa and/or HeLa (Table 1).

In our analysis, TLR1, 2, 3, 4, 5, 9 and 10 were differentially expressed. Of these, only TLR4 was up-regulated. We also observed that the expression of SARM 1, a negative regulator of the TLR pathway, was up-regulated in tumor cells. In addition, several genes related to MAP kinases signaling, part of a downstream pathway activated by TLR, were down-regulated.

We then performed a second analysis in order to identify genes differentially expressed in HPV transformed cells. For this purpose we performed all comparisons using C33A as the reference group. Using this approach we observed that 47 genes were differentially expressed in SiHa and HeLa cells. Of these, 20 genes exhibited fold-expression changes equal or greater than 4 (either up or down) compared to control (Table 2). Again, TLR4 appeared upregulated, as well as genes of MAP kinase pathway, some interleukins and most other genes were regulated negatively.

Based on our results and previously reported involvement of these genes in TLR signaling some were selected for validation, namely: Ube2N, TBK1, HMGB1, TRAF6, TLR4, MyD88 and SARM1.

Immunoblot analysis of protein expression showed changes in tumor cell lines for adapter molecules, Myd88 and SARM1. While Myd88 was less expressed in tumor cell lines, SARM1 had a higher expression levels in tumors cells and in primary keratinocytes acutely expressing HPV16 E6/E7. For TLR4 there was a trend towards a higher expression level in HPV positive tumor cells (Figure 1).

We observed that TRAF6 expression was much lower in tumor cell lines. The same pattern was observed for Ube2N protein, showing a large decrease in expression

levels (Figure 1), both proteins belong to the same complex involved in NFkappaB activation.

Analyzing HMGB1, a higher protein expression level was observed in tumor cell lines, when compared to controls. HMGB1 has very different roles, participating in DNA repair and regulation of inflammation after TLR activation.

In order to get insights on the cellular localization of HMGB1 in HPV positive cells we analyzed this protein by immuno fluorescence. As presented in Figure 2A, all tumor cells had higher fluorescence nuclear signal compared to normal keratinocytes. Using transduced keratinocytes we observed that HPV16 E6/E7 expressing cells had higher nuclear expression levels (Fig. 2B)

We tested if HMGB1 had an effect on cell viability and proliferation, since it is important for DNA repair. Silencing HMGB1 resulted in decreased viability in HPV positive tumor cells, and furthermore these tumor cells had a lower proliferation level while normal cells were not affected (Fig. 3A-B). Considering the ability of colony formation of tumor cells, HMGB1 silenced cell lines SiHa and HeLa showed a significant reduction of colony numbers formed (Fig. 3C). Our results indicate an important contribution of HMGB1 on tumor cells growth and survival.

Discussion

Measuring mRNA levels, of all Toll-like receptors differentially expressed only TLR4 was up-regulated. A higher TLR4 expression in tumors was also found in another study recently published, showing association with tumor progression in HPV related cervical lesions and tumors samples [11]. Besides, TLR9 was down regulated, as previously

shown by Hasan and co-workers using clinical samples [6]. We also observed that the expression of SARM 1, a negative regulator of the TLR pathway, was up-regulated in tumor cells. Interestingly, using keratinocytes expressing HPV16 E6 and E7 proteins, all differentially expressed genes were down-regulated, including genes of MAP kinase pathway, TLR8, the adapter MyD88, TRAF6, TICAM1, CLEC4E also present in the analysis of the tumor cell lines

On the basis of these results we identified a group of genes that are differentially regulated in between normal keratinocytes and cells expressing HPV genes. Collectively, these genes expression pattern could be associated with some of the evasion mechanisms exhibited by HPV infected cells. Based on their reported involvement in TLR signaling some genes were selected for validation, namely: Ube2N, TBK1, HMGB1, TRAF6, TLR4, MyD88 and SARM1.

We observed changes in tumor cell lines for adapter molecules, Myd88 and SARM1. While Myd88 was less expressed in tumor cell lines, SARM1 had a higher expression level. Interestingly, these molecules present opposite effects on TLR signaling. Myd88 participates in TLR pathway activation whereas SARM1 acts as a competitor for TLR binding and leads to signal disruption, inhibiting innate immune response triggered by TLR [12,13]. Our observations suggest that SARM1 up-regulation and MyD88 down-regulation may be involved in HPV immune evasion

TRAF6 protein mediates signaling of both TNF and Toll/IL-1 receptor family, interacting with a protein complex composed by UBE2N/UBC13. This interaction is essential to IKK activation and consequently to NF κ B downstream signaling [14]. We observed that both TRAF6 and Ube2N expression were much lower in tumor cell lines. This

observation suggests the existence of important alterations to control NF κ B signaling activation in cervical cancer cells lines.

Cancer cells usually have deficient DNA repair systems, resulting in chromosomal abnormalities and mutation occurrence, nevertheless some proteins involved in DNA repair and DNA damage response become essential for cell survival, partially supplying missing activity of other proteins. Tumors caused by HPV persistence already have less effective p53 dependent DNA repair system, since E6 oncoprotein leads p53 to degradation, therefore is possible that other proteins involved in DNA repair now have a major role on tumor viability and survival.

HMGB1 has very different roles: it participates in DNA repair and chromatin organization in the cell nucleus. Besides, this protein can be secreted from the cells and participate in the regulation of inflammation. Considering the role of this protein in inflammation and in chromatin remodeling during the DNA repair process, this could be an interesting target for changes during HPV infection and tumor progression [15].

Our results of HMGB1 silencing showed a decreased viability in HPV positive tumor cells. Furthermore, these tumor cells had a lower proliferation level while normal cells were not affected. Our results indicate an important contribution of HMGB1 on tumor cells growth and survival and several alterations all over TLR pathway that could contribute to HPV infection and persistence.

References

- 1 de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H: Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004;324:17-27.
- 2 Garcia-Chacon R, Velasco-Ramirez SF, Flores-Romo L, Daneri-Navarro A: Immunobiology of hpv infection. *Archives of medical research* 2009;40:443-448.
- 3 Frazer IH: Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nature reviews Immunology* 2004;4:46-54.

- 4 Goodwin EC, DiMaio D: Repression of human papillomavirus oncogenes in hela cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000;97:12513-12518.
- 5 Carpenter S, O'Neill LA: How important are toll-like receptors for antimicrobial responses? *Cellular microbiology* 2007;9:1891-1901.
- 6 Hasan UA, 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. *Journal of immunology* 2007;178:3186-3197.
- 7 Boccardo E, Lepique AP, Villa LL: The role of inflammation in hpv carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2010;31:1905-1912.
- 8 Daud, II, Scott ME, Ma Y, Shiboski S, Farhat S, Moscicki AB: Association between toll-like receptor expression and human papillomavirus type 16 persistence. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2011;128:879-886.
- 9 Hasimu A, Ge L, Li QZ, Zhang RP, Guo X: Expressions of toll-like receptors 3, 4, 7, and 9 in cervical lesions and their correlation with hpv16 infection in uighur women. *Chinese journal of cancer* 2011;30:344-350.
- 10 Helt AM, Galloway DA: Destabilization of the retinoblastoma tumor suppressor by human papillomavirus type 16 e7 is not sufficient to overcome cell cycle arrest in human keratinocytes. *Journal of virology* 2001;75:6737-6747.
- 11 Wang Y, Weng Y, Shi Y, Xia X, Wang S, Duan H: Expression and functional analysis of toll-like receptor 4 in human cervical carcinoma. *The Journal of membrane biology* 2014;247:591-599.
- 12 Belinda LW, Wei WX, Hanh BT, Lei LX, Bow H, Ling DJ: Sarm: A novel toll-like receptor adaptor, is functionally conserved from arthropod to human. *Molecular immunology* 2008;45:1732-1742.
- 13 Piras V, Selvarajoo K: Beyond myd88 and trif pathways in toll-like receptor signaling. *Frontiers in immunology* 2014;5:70.
- 14 Lamothe B, Besse A, Campos AD, Webster WK, Wu H, Darnay BG: Site-specific lys-63-linked tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 auto-ubiquitination is a critical determinant of i kappa b kinase activation. *The Journal of biological chemistry* 2007;282:4102-4112.
- 15 Kang R, Chen R, Zhang Q, Hou W, Wu S, Cao L, Huang J, Yu Y, Fan XG, Yan Z, Sun X, Wang H, Wang Q, Tsung A, Billiar TR, Zeh HJ, 3rd, Lotze MT, Tang D: Hmgb1 in health and disease. *Molecular aspects of medicine* 2014

Figure S1: Representation using Venn diagrams of differentially expressed genes between the cell lines analyzed. A) Number of genes differentially expressed between tumor cell lines, considering PHK as reference, B) Number of genes differentially expressed between HPV positive cell lines using C33A (HPV negative) as reference.

Figure S2: TLR gene expression. Samples were clustered by gene expression similarity. Data is shown as fold change compared to control. Control Group: NHEK; Group 1: C33A; Group 2: HeLa; Group 3: SiHa.

Table 1: Differentially expressed TLR pathway genes between HPV positive cell lines and normal cells.

	HeLa	p valor	SiHa	p valor
	Fold Regulation		Fold Regulation	
TLR1			-16,3299	0,043127
CD180	6,4086	0,045922		
CCL2	16,374	0,000419		
EIF2AK2	-7,8354	0,029994		
IKBKB	-2,6512	0,005166		
MAP3K1	-2,8219	0,000499		
PRKRA	-2,3729	0,017085		
TICAM2	-3,4105	0,032758		
TLR9	-5,3025	0,046891		
TRAF6	-6,0071	0,028971		
TLR4	38,4968	0,000309	8,8637	0,038814
TLR10	-8,6939	0,002249	-4,741	0,004898
REL	-4,2871	0,000901	-2,9885	0,001503
TICAM1	-5,0397	0,001533	-5,6368	0,001282
MAP3K7	-3,1821	0,004372	-2,1965	0,005102
MAP4K4	-4,9019	0,005128	-2,7319	0,009046

	C33A		HeLa		SiHa	
	Fold Regulation	p valor	Fold Regulation	p valor	Fold Regulation	p valor
SARM1	18,2628	0,000167	6,9483	0,003589	116,056	0,021559
RIPK2	2,441	0,00028	-5,439	0,002107	-2,5779	0,004401
IRAK4	4,0395	0,000162	-5,8971	0,009925	-2,9904	0,046068
IL12A	3,7257	0,00008	-5,2054	0,001139	-2,6503	0,001863
IL1A	-2725,868	0,002619	-820,296	0,002627	-478,054	0,002635
IL1B	-2584,7935	0,005522	-2407,52	0,005522	-187,375	0,005618
LY96	-18,885	0,038116	-739,292	0,032008	-99,8918	0,032759
PELI1	-2,9673	0,013267	-10,9536	0,003752	-6,1177	0,00509
PTGS2	-1356,6504	0,000401	-174,047	0,00041	-19,0958	0,000579
TLR2	-77,1271	0,006191	-560,278	0,005957	-55,5681	0,006316
TLR3	-2,1079	0,025469	-12,4092	0,001999	-4,4118	0,00518
TLR5	-3,1077	0,045124	-27,5376	0,011405	-11,9529	0,012987

Table 2: : Differentially expressed TLR pathway genes between HPV positive tumor cell lines and HPV negative tumor cells (C33A).

	HeLa		SiHa	
	Fold Regulation	p valor	Fold Regulation	p valor
CD86	-16,0463	0,000782	-8,5505	0,001185
CLEC4E	-16,0463	0,000782	-8,5505	0,001185
HMGB1	-18,1786	0,001462	-6,1237	0,002273
IFNG	-10,0852	0,003523	-8,6899	0,001893
IL12A	-19,3935	0,000024	-9,8741	0,000025
IL2	-8,2107	0,004273	-6,9299	0,001227
IRAK4	-23,8211	0,000005	-12,0795	0,000032
MAP2K3	-10,1788	0,002001	-5,3134	0,002747
MAP3K7	-5,8058	0,000113	-4,0074	0,000059
MAPK8	-13,2768	0,000535	-4,6931	0,001351
RIPK2	-13,2768	0,000007	-6,2927	0,000005
TBK1	-11,4254	0,007294	-4,5406	0,012039
TLR10	-20,9784	0,016579	-11,44	0,019495
TLR8	-16,0463	0,000782	-4,5672	0,003118
UBE2N	-9,3017	0,000061	-5,3587	0,000068
TLR4	57,2485	0,000185	13,1812	0,010956
TNFR1	195,2484	0,002258	333,888	0,006062
CASP8	44,2979	0,000459	64,3754	0,006568
FADD	7,2392	0,014137	7,8725	0,005284
JUN	14,9199	0,000123	12,4003	0,011237

Figure 1: Protein levels of differentially expressed TLR pathway genes in tumor derived cell lines. RNA levels were determined by qPCR and protein levels by Western Blot, from cell culture extracts. Signals obtained were quantified using ImageJ software and presented as expression relative to housekeeping genes.

Figure 2: Nuclear localization of HMGB1 in monolayer cell cultures. A) Tumor cell lines and primary human keratinocytes (PHK) B) PHK transduced with empty retrovirus vector or E6E7 HPV16 containing vector. For each cell line was seeded a total of 10000 cells and formalin fixed after 60h.

Figure 3: HMGB1 silencing effect on tumor cells. Inhibition of cell viability, proliferation and colony formation was evident for SiHa and HeLa cells when compared to primary keratinocytes (Student t-test p) A lentiviral shRNA (MISSION®) was used to silence specific genes in cervical cancer cell lines. Cells were seeded in 96 wells plates (2000 cells/well) and infected with lentiviral particles expressing specific shRNAs after 24 hours. All infections were performed in triplicate. A) Viability of silenced cell lines by Alamar Blue reduction. After 120 hours of infection, Alamar Blue was added (10 μ L/well). After 4 hours Alamar Blue reduction was determined by measuring absorbance at 570 and 600 nm. B) Proliferation curve showed an effect of HMGB1 silencing on SiHa and HeLa but no change on normal keratinocytes (PHK) proliferation. After seeding, number of cells were counted for 5 days in triplicates. C) Clonogenic Assay realized with SiHa and HeLa presented a lower colony percentage when silenced compared with scramble. All values are presented as relative to those observed in control cells (cells from the respective type transduced with a scramble shRNA).

Figure 1

Figure 2

Figure 3